



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.15

(21) Номер заявки
201590459

(22) Дата подачи заявки
2013.09.12

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) СПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ОСТРОВКОВОМУ АМИЛОИДНОМУ ПОЛИПЕПТИДУ ЧЕЛОВЕКА (hIAPP) И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 12184134.0; 61/700,110

(32) 2012.09.12

(33) EP; US

(43) 2015.11.30

(86) PCT/EP2013/068907

(87) WO 2014/041069 2014.03.20

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НЕЙРИММБЮН ХОЛДИНГ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Гримм Ян (CH), Хейтс Фабрис (FR),
Чэн Фэн, Комбалузьер Иоанна (CH)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A2-03092619
WO-A1-2011151833

TOMITA TATSLJO: "Islet amyloid polypeptide in pancreatic islets from type 2 diabetic subjects.", ISLETS 2012 MAY-JUN, vol. 4, no. 3, May 2012 (2012-05), pages 223-232, XP008159123, ISSN: 1938-2022 the whole document

MA Z ET AL: "ALTERED IMMUNOREACTIVITY OF ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE (IAPP) MAY REFLECT MAJOR MODIFICATIONS OF THE IAPP MOLECULE IN AMYLOIDOGENESIS", DIABETOLOGIA, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 40, no. 7, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 793-801, XP001055864, ISSN: 0012-186X, DOI:10.1007/S001250050751 the whole document

1997 (1997-01-01), pages 793-801, XP001055864, ISSN: 0012-186X, DOI:10.1007/S001250050751 the whole document

MA Z ET AL: "AMYLOID IN HUMAN ISLETS OF LANGERHANS: IMMUNOLOGIC EVIDENCE THAT ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE IS MODIFIED IN AMYLOIDOGENESIS", PANCREAS, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 21, no. 2, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 212-218, XP001055947, ISSN: 0885-3177, DOI:10.1097/00006676-200008000-00015 the whole document

LIN CHIA-YU ET AL: "Toxic human islet amyloid polypeptide (h-IAPP) oligomers are intracellular, and vaccination to induce anti-toxic oligomer antibodies does not prevent h-IAPP-induced beta-cell apoptosis in h-IAPP transgenic mice.", DIABETES MAY 2007, vol. 56, no. 5, May 2007 (2007-05), pages 1324-1332, XP002690146, ISSN: 1939-327X the whole document

PHELPS J L ET AL: "DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR AMYLIN", HYBRIDOMA, LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 15, no. 5, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 379-386, XP009066762, ISSN: 0272-457X the whole document

WO-A2-2005000193
WO-A2-03063760

(57) Предложены новые специфические антитела против островкового амилоидного полипептида человека, также известного как амилин и IAPP и proIAPP соответственно, а также их фрагменты, производные и варианты, а также способы, относящиеся к ним. Также описаны анализы, наборы и твердые носители, связанные с антителом, специфическим по отношению к IAPP и/или proIAPP. Антитело, иммуноглобулиновая(ые) цепь(и), а также их связывающие фрагменты, производные и варианты можно применять в фармацевтических и диагностических композициях для IAPP- или proIAPP-специфической иммунотерапии и диагностики соответственно.

Область изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к новым молекулам, специфически связывающимся с островковым амилоидным полипептидом человека (hIAPP), также известным как амилин, и/или с его предшественником - островковым амилоидным прополипептидом человека (proIAPP), в частности, к антителам человека, а также их фрагментам, производным и вариантам, распознающим белки IAPP, pro-IAPP, агрегированные формы IAPP, агрегированные формы proIAPP и/или фибриллы IAPP. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим и диагностическим композициям, содержащим такие связывающие молекулы, антитела и их миметики, пригодные в качестве диагностического инструмента для идентификации IAPP, proIAPP, агрегированного IAPP, разновидностей proIAPP и/или фибрилл IAPP в плазме, а также в стратегиях пассивной вакцинации для лечения нарушений, связанных с агрегированным IAPP, агрегированным proIAPP и фибриллами IAPP, например, сахарного диабета 2 типа (СД2) и отторжением островков после клинической трансплантации островков поджелудочной железы людям с сахарным диабетом 1 типа (СД1).

Уровень техники

Накопление, модификации и агрегация белка являются патологическими аспектами многих обменных заболеваний, включая широко известные нейродегенеративные заболевания, например, болезни Хантингтона, Альцгеймера (БА) и Паркинсона (БП) (Taylor et al., Science 296 (2005), 1991-1995). Патологическая агрегация белка также вовлечена в такие обменные заболевания, как сахарный диабет 2 типа (СД2) и отторжение островков после клинической трансплантации островков поджелудочной железы людям с сахарным диабетом 1 типа (СД1)). Неправильный фолдинг и агрегация белков приводят к развитию отложений амилоида и, по-видимому, непосредственно связаны с клеточной токсичностью при этих заболеваниях. Островковый амилоидный полипептид (IAPP или амилин) - физиологический пептид, секретируемый вместе с инсулином Р-клетками в поджелудочной железе, образует фибриллярные агрегаты в островках поджелудочной железы (также называемых островками Лангерганса) пациентов с сахарным диабетом 2 типа и, как предполагается, участвует в развитии данного заболевания (Westermark et al. (2011), Physiol. Rev. 91(3): 795-826). Кроме того, как упоминалось ранее, агрегаты IAPP обнаружены в островках поджелудочной железы после трансплантации отдельных островков у пациентов с сахарным диабетом 1 типа (СД1).

IAPP человека (hIAPP) - пептидный гормон, состоящий из 37 аминокислот и содержащий дисульфидный мостик между остатками цистеина 2 и 7 и амидированный С-конец. Островки поджелудочной железы на 65-80% состоят из β -клеток, которые продуцируют и секретируют инсулин и IAPP, имеющие важное значение для регуляции уровня глюкозы в крови и клеточного метаболизма. IAPP образуется в результате процессинга препрогормона ppreIAPP, предшественника из 89 аминокислот, продуцируемого в β -клетках поджелудочной железы.

PpreIAPP быстро после трансляции расщепляется на островковый амилоидный прополипептид, пептид из 67 аминокислот, который подвергается дополнительному протеолизу и посттрансляционной модификации с образованием hIAPP. Экспрессия hIAPP регулируется вместе с инсулином, поскольку повышение продукции инсулина приводит к повышению уровня hIAPP. hIAPP высвобождается из β -клеток поджелудочной железы в кровоток и участвует в регуляции гликемии за счет контроля опорожнения желудка и насыщения, синергично с инсулином.

Хотя hIAPP действует как регулятор клеточного метаболизма в физиологических условиях, hIAPP может агрегировать и образовывать амилоидные фибриллы (IAPP-амилоидоз), что связано с недостаточностью β -клеток, усиленной гибелью β -клеток и пониженной массой β -клеток. Есть несколько оснований считать hIAPP-амилоидоз основным пусковым фактором патогенеза СД2. Во-первых, отложение фибрилл hIAPP обнаруживается у более чем 90% пациентов с сахарным диабетом 2-го типа (Zraika et al. (2010), Diabetologia 53(6): 1046-1056). Во-вторых, агрегация hIAPP токсична для β -клеток и коррелирует со снижением количества инсулинпродуцирующих β -клеток (Butler et al. (2003), Diabetes 52(9): 2304-2314; Ritzel et al. (2007), Diabetes 56(1): 65-71; Jurgens et al. (2011), Am. J. Pathol. 178(6): 2632-2640). В-третьих, на моделях с использованием трансгенных мышей, экспрессирующих hIAPP, показано отложение амилоида в островках поджелудочной железы и спонтанное развитие СД2 (Janson et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(14): 7283-7288; Hoppener et al. (1999), Diabetologia 42(4): 427-434; Hull et al. (2003), Diabetes 52(2): 372-379; Butler et al. (2004), Diabetes 53(6): 1509-1516; Matveyenko et al. (2006), ILAR J. 47(3): 225-233; Hoppener et al. (2008), Exp. Diabetes Res. 697035). Они воспроизводят заболевание человека с дисфункцией β -клеток, недостаточностью массы β -клеток и гибелью β -клеток, сравнимыми с явлениями, наблюдаемыми в тканях пациентов с СД2. Экспрессия hIAPP и образование амилоида прямо коррелируют с апоптозом β -клеток и развитием диабета в этих моделях, что является свидетельством вклада IAPP человека в развитие данного заболевания. Кроме того, лечение, мешающее агрегации hIAPP, улучшало диабетический фенотип и увеличивало продолжительность жизни животного (Aitken et al. (2009), Diabetes 59(1): 161-171). Агрегация hIAPP и амилоидоз являются предпосылками токсичности. IAPP грызунов, не образующий амилоида (gIAPP), который не может образовывать фибриллы в результате замены шести аминокислот, нетоксичен для β -клеток. При развитии заболевания патологическая агрегация hIAPP, обнаруженная в островках поджелудочной железы человека, может привести к дис-

функции β -клеток и смерти, связанной с нарушением секреции инсулина. Кроме того, компенсаторное увеличение массы β -клеток и секреции инсулина и амилина с целью поддержания нормального уровня глюкозы в крови может способствовать образованию токсичных олигомеров hIAPP и отложению фибрилл hIAPP. Хотя основными цитотоксическими молекулами считаются исходные олигомеры hIAPP, конечные фибриллы hIAPP также могут играть роль в гибели β -клеток (Meier et al. (2006), *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291(6): E1317-1324; Haataja et al. (2008), *Endocr. Rev.* 29(3): 303-316; Engel et al. (2008), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(16): 6033-6038). Фибриллы hIAPP также наблюдались в изолированных островках поджелудочной железы доноров и ассоциировались с гибелью β -клеток после клинической трансплантации островков поджелудочной железы лицам с диабетом 1 типа (Andersson et al. (2008), *Exp. Diabetes Res.* 562985; Udayasankar et al. (2009), *Diabetologia* 52(1): 145-153; Bohman et al. (2012), *Amyloid* 19(2): 87-93). Точный механизм, ведущий к агрегации hIAPP и амилоидозу при СД2, неизвестен. Инсулинорезистентность при СД2 увеличивает потребность в секреции инсулина вместе с высвобождением содержащихся в клетках proIAPP и hIAPP, что может вызвать амилоидоз, поскольку образование фибрилл hIAPP зависит от концентрации. Еще один предполагаемым механизмом является накопление и агрегация proIAPP, не подвергшегося процессингу N-конца, вызванное нарушением протеолиза в условиях инсулинорезистентности, поскольку в отложениях амилоида обнаруживаются частично подвергшиеся процессингу формы proIAPP, в частности, промежуточный proIAPP₁₋₄₈, содержащий 48 остатков (Marzban et al. (2006), *Diabetes* 55(8): 2192-2201). В данном контексте аномальный процессинг proIAPP может выступать в качестве пускового фактора hIAPP-амилоидоза и увеличивать образование амилоида (Paulsson et al. (2005), *Diabetes* 54(7): 2117-2125; Paulsson et al. (2006), *Diabetologia* 49(6): 1237-1246; Marzban et al. (2006), *Diabetes* 55(8): 2192-2201). Поэтому proIAPP также рассматривается в качестве подходящей терапевтической мишени.

Клиническими особенностями СД2 являются высокий уровень глюкозы в крови и резистентность к инсулину и/или его недостаточность. Сахарный диабет представляет собой группу метаболических заболеваний, включающую СД1, СД2 и диабет беременных. СД2, также называемый диабетом зрелого возраста, диабетом, связанным с ожирением, и инсулиннезависимым сахарным диабетом (ИНСД), является наиболее распространенной формой диабета, составляющей примерно 90% всех случаев (Gerich et al. (1998), *Endocr. Rev.* 19(4): 491-503). СД2 характеризуется снижением количества функциональных инсулинпродуцирующих β -клеток. По мере прогрессирования патологии это может привести к долгосрочным осложнениям, например, сердечно-сосудистым заболеваниям, диабетической ретинопатии, ведущей к слепоте, почечной недостаточности, частым инфекциям, а также ампутациям вследствие плохой циркуляции. Как следствие, СД2 связан с пониженной продолжительностью жизни. Указанное заболевание поражает более 300 миллионов человек в мире и ежегодно приводит к более чем миллиону смертельных случаев. Развитие заболевания обусловлено как генетическими детерминантами, так и факторами окружающей среды, причем ожирение, гиподинамия и старение считаются основной причиной (Kahn et al. (2006), *Nature* 444(7121): 840-846).

Современные способы лечения СД2 включают контроль за образом жизни (диету и физические упражнения) и фармакологическое вмешательство, например, прием метформина и инсулина с целью снижения уровня глюкозы в крови путем стимуляции высвобождения инсулина из поджелудочной железы или усиления реакции на инсулин. Эти способы лечения основаны на симптоматическом непродолжительном улучшении диабета. Показано, что фактически ни один из доступных способов лечения не противодействует агрегации hIAPP и гибели β -клеток поджелудочной железы. Новые стратегии лечения, использующие аналоги глюкагон-подобного пептида 1 (GLP-1) (Butler et al. (2009), *Diabetologia* 53(1): 1-6) и ингибиторы GLP-1-инактивирующего фермента дипептидилпептидазы 4 (DDP4), основаны на мощном инсулинотропном действии GLP-1 и его способности усиливать пролиферацию β -клеток. Важно отметить, что усиленное высвобождение инсулина также сопряжено с усиленным высвобождением амилина. Экспериментально показано, что стимуляция секреции инсулина усиливает развитие островкового амилоидоза на животных моделях, и можно ожидать подобных эффектов у людей (Aston-Mourney et al. (2011), *Diabetologia* 54(7): 1756-1765). Таким образом, эти способы лечения потенциально могут усугубить островковый амилоидоз. Более современные и перспективные стратегии предполагают разработку противовоспалительных препаратов или антител, направленно действующих на путь ИЛ-1 β (Donath et al. (2008), *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 4(5): 240-241; Ehes et al. (2009), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(33): 13998-14003; Owyang et al. (2010), *Endocrinology* 151(6): 2515-2527; Dinarello et al. (2010), *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 17(4): 314-321; Boni-Schnetzler et al. (2011), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93(10): 4065-4074; Boni-Schnetzler et al. (2012), *Br. J. Clin. Pharmacol.*; Cavelti-Weder et al. (2012), *Diabetes Care*). Важно отметить, что последние исследования показывают, что hIAPP специфически индуцирует инфламасому - систему ИЛ-1 β , активирующую врожденную иммунную систему (Masters et al. (2010), *Nat. Immunol.* 11(10): 897-904; Mandrup-Poulsen et al. (2010), *Nat. Immunol.* 11(10): 881-883), тем самым поддерживая терапевтическую стратегию, направленную на агрегацию hIAPP.

Эти выводы подчеркивают потенциальное благоприятное действие, ассоциированное с подходами активной или пассивной иммунотерапии, мишенями которой являются hIAPP или proIAPP.

Резюмируя вышесказанное, существует неотложная необходимость в терапевтических стратегиях, направленно действующих на агрегированные белки hIAPP, proIAPP и/или олигомеры и/или фибриллы hIAPP посредством эффективной и безопасной терапии. Пассивная иммунизация с применением антител человека, эволюционно оптимизированных и аффинно созревших с использованием иммунной системы человека, должна обеспечить перспективное новое терапевтическое направление, с высокой вероятностью обладающее превосходной эффективностью и безопасностью.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение позволяет использовать hIAPP-специфический иммунный ответ здоровых субъектов-людей для выделения природных hIAPP-специфических моноклональных антител человека. В частности, эксперименты, проведенные в соответствии с настоящим изобретением, успешно позволили выделить моноклональные hIAPP- или proIAPP-специфические антитела из пула здоровых субъектов-людей или из пула пациентов, страдающих ожирением, и других групп пациентов с повышенным риском развития СД2, у которых во время выделения антител отсутствовали признаки СД2.

Таким образом, настоящее изобретение направлено на антитела человека, антигенсвязывающие фрагменты и аналогичные антигенсвязывающие молекулы, способные специфически распознавать IAPP и/или proIAPP. Если не указано иное, термины "специфически распознающий IAPP или proIAPP", "антитело, специфическое к/по отношению к IAPP и/или proIAPP" и "антитело против IAPP и/или против proIAPP" означают конкретно, в основном и в целом антитела к нативной мономерной форме IAPP; антитела к proIAPP - форме-предшественнику IAPP; антитела, специфически связывающиеся с формами IAPP и proIAPP; антитела, связывающиеся с агрегированными, олигомерными, фибриллярными или нефибриллярными разновидностями IAPP и/или proIAPP. В настоящей заявке предложены антитела человека, селективные к полноразмерным и/или агрегированным формам, например, олигомерным, фибриллярным и нефибриллярным агрегированным формам IAPP и/или proIAPP.

В особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует иммунологические связывающие характеристики антитела, характеризующегося переменными областями V_H и/или V_L , представленными на фиг. 1 или фиг. 2.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть одноцепочечным Fv-фрагментом, F(ab')-фрагментом, F(ab)-фрагментом и F(ab')₂-фрагментом, или любым другим антигенсвязывающим фрагментом. В конкретном варианте реализации, приведенном ниже, антитело или его фрагмент является антителом человека изотипа IgG. В альтернативном варианте антитело представляет собой химерное антитело человека-грызуна или родентизированное антитело, например, антитело мыши или муринизированное антитело, антитело крысы или ратинизированное антитело, причем варианты антител грызунов особенно полезны для диагностических методик и исследований на животных.

Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим антитело в соответствии с настоящим изобретением или его активные фрагменты, и к иммунотерапевтическим и иммунодиагностическим способам, в которых такие композиции применяются в профилактике, диагностике или лечении нарушений, связанных с IAPP, например, СД2, при которых эффективное количество композиции вводят пациенту, нуждающемуся в этом.

Естественно, настоящее изобретение распространяется на иммортализованные В-лимфоциты памяти и В-клетки человека, соответственно, которые продуцируют антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающие особыми и уникальными характеристиками, определенными ниже.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим по меньшей мере переменную область иммуноглобулиновой цепи антитела согласно изобретению. В предпочтительном варианте указанная переменная область содержит по меньшей мере одну гиперпеременную область (CDR) V_H и/или V_L переменной области, заданной на фиг. 1 или 2.

Таким образом, настоящее изобретение также охватывает векторы, содержащие указанные полинуклеотиды, и клетки-хозяева, трансформированные ими, а также их применение для получения антитела и эквивалентных связывающих молекул, специфических к IAPP и/или proIAPP. Средства и способы рекомбинантной продукции антител и их миметиков, а также способы скрининга конкурентных связывающих молекул, которые могут быть или не быть антителами, известны в данной области техники. В то же время, как описано в настоящем документе, в частности, в отношении терапевтического медицинского применения, антитело согласно настоящему изобретению является антителом человека в том смысле, что применение указанного антитела по существу не приводит к иммунному ответу, направленному против такого антитела, в иных случаях наблюдаемому для химерных и даже гуманизированных антител.

Кроме того, в настоящем документе описаны композиции и способы, которые можно применять для выявления IAPP и/или proIAPP в образцах и/или *in vivo*. Описанные антитела против IAPP и/или proIAPP или их фрагменты, связывающие IAPP и/или proIAPP, можно применять для скрининга крови, плазмы, сыворотки, слюны, перитонеальной жидкости, спинномозговой жидкости ("СМЖ") и мочи человека на наличие IAPP и/или proIAPP в образцах, например, с помощью анализа на основе ИФА или поверхностно-адаптированного анализа. В одном варианте реализации настоящего изобретения относится к способу диагностики или мониторинга прогрессирования нарушения, связанного с IAPP и/или proIAPP

у субъекта, причем указанный способ включает определение присутствия олигомеров, агрегатов или фибрилл IAPP и/или proIAPP в образце от диагностируемого субъекта с применением по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению или молекулы, связывающей IAPP и/или proIAPP, обладающей по существу такой же специфичностью связывания, как и любое из них, где присутствие олигомеров, агрегатов или фибрилл IAPP и/или proIAPP является показателем нарушения.

Кроме того, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложены описанные антитела против IAPP и/или proIAPP или их фрагменты, связывающие IAPP и/или proIAPP, и/или молекулы, связывающие IAPP и/или proIAPP, содержащие по меньшей мере один CDR антитела согласно настоящему изобретению, для изготовления композиции для обнаружения *in vivo* (также называемого визуализацией *in vivo*) или направленного действия терапевтического или диагностического агента на IAPP и/или proIAPP в организме человека или животного. Способы и композиции, описанную в настоящей заявке, можно применять при нарушениях, связанных с IAPP и характеризующихся, например, возникновением олигомерных, фибриллярных и нефибриллярных агрегированных форм IAPP и/или proIAPP, например, диагнозе СД2, а также можно применять для мониторинга прогрессирования заболевания и терапевтической эффективности лечения, оказываемого субъекту, например, в способах диагностики, связанных с визуализацией *in vivo*. Таким образом, в одном варианте реализации представлена молекула, связывающая IAPP и/или proIAPP согласно настоящему изобретению, где указанное обнаружение (визуализация) *in vivo* включает позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭТ), оптическую визуализацию в ближнем инфракрасном спектре (NIR) или магнитно-резонансную томографию (МРТ).

Таким образом, отдельной задачей настоящего изобретения является обеспечение способов лечения, диагностики или профилактики заболеваний, связанных с фибриллярным и/или нефибриллярным олигомерным агрегированным IAPP и/или proIAPP, например, диабета 2 типа (СД2). Указанные способы включают введение эффективной концентрации антитела или производного от антитела человека субъекту, где мишенью антитела является IAPP и/или proIAPP.

В еще одном аспекте настоящего изобретения представлен пептид, содержащий эпитоп IAPP и/или proIAPP, специфически распознаваемый антителом согласно настоящему изобретению. Указанный пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной ниже в разделах "Подробное описание" и "Примеры" или ее модифицированной последовательности, в которой заменены, удалены и/или добавлены одна или большее число аминокислот. Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ диагностики СД2 или риска развития СД2 у субъекта, включающий этап определения присутствия антитела, связывающего указанный пептид в биологическом образце от указанного субъекта.

Дополнительные варианты реализации настоящего изобретения станут очевидны из следующего описания и примеров.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности варибельной области, т.е. тяжелой цепи и каппа/лямбда легкой цепи антител человека против IAPP NI-203.9A2 (A), NI-203.19H8 (B), NI-203.26C11 (C), NI-203.8E3 (D), NI-203.11B12 (E), NI-203.205F8 (F), NI-203.9B3 (G), NI-203.19F2 (H) и NI-203.15C7 (I). Указаны каркасные (FR) и гиперварибельные участки (CDR), причем CDR выделены подчеркиванием. Кроме того, указаны J-области тяжелой (JH) и легкой цепи (JK). Благодаря стратегии клонирования аминокислотная последовательность на N-конце тяжелой и легкой цепи потенциально может содержать внесенные за счет праймера замены в FR1, которые не оказывают существенного влияния на биологическую активность антитела. Для обеспечения консенсусного антитела человека нуклеотидные и аминокислотные последовательности исходного клона выровняли с и отредактировали в соответствии с подходящими последовательностями варибельной области эмбриональной линии человека, содержащимися в базе данных; см., например, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), размещенную в Центре белковой инженерии MRC (Кембридж, Великобритания). Аминокислотная последовательность антител человека указана, если считается, что N-концевые аминокислоты потенциально отличаются от консенсусной последовательности эмбриональной линии из-за ПЦР-праймера и, соответственно, заменены путем праймер-индуцированной корректирующей мутации (PIMC). PIMC-модифицированные аминокислоты выделены в последовательности жирным шрифтом.

Фиг. 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности варибельной области, т.е. тяжелой цепи и каппа/лямбда-легкой цепи антител человека против proIAPP NI-203.1D10 (A), NI-203.2A11 (B), NI-203.10C4 (C), NI-203.20H9 (D), NI-203.26D2 (E) и NI-203.60H3 (F). Указаны каркасные (FR) и гиперварибельные участки (CDR), причем CDR выделены подчеркиванием. Кроме того, указаны J-области тяжелой (JH) и легкой цепи (JK). Благодаря стратегии клонирования аминокислотная последовательность на N-конце тяжелой и легкой цепи потенциально может содержать внесенные за счет праймера замены в FR1, которые не оказывают существенного влияния на биологическую активность антитела. В целях представления консенсусного антитела человека нуклеотидные и аминокислотные последовательности исходного клона выровняли и настроили в соответствии с подходящими последовательностями варибельной области эмбриональной линии человека, содержащимися в базе данных; см., например, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), размещенную в центре белковой инженерии MRC (Кембридж,

Великобритания). Аминокислотная последовательность антител человека указана, если считается, что N-концевые аминокислоты потенциально отличаются от консенсусной последовательности эмбриональной линии из-за ПЦР-праймера и, таким образом, замещены путем праймер-индуцированной корректирующей мутации (РМС). РМС-модифицированные аминокислоты выделены в последовательности жирным шрифтом.

Фиг. 3. IAPP-связывающая специфичность рекомбинантных антител человека, оцениваемая с помощью прямого твердофазного ИФА. (А) Электронная микрофотография раствора IAPP (2 мг/мл), использованного для покрытия планшета для твердофазного ИФА. Масштабная линейка: 1 мкм. (В) Рекомбинантные антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.8E3 продемонстрировали специфическое связывание с IAPP человека (10 мкг/мл). БСА (10 мкг/мл) использовали в качестве контроля для определения неспецифического связывания. Данные выражены в виде значений ОП при длине волны 450 нм.

Фиг. 4. Определение EC_{50} рекомбинантных антител человеческого происхождения против IAPP в отношении IAPP и proIAPP. (А) Электронные микрофотографии растворов IAPP и proIAPP (2 мг/мл), использованных для покрытия планшета для твердофазного ИФА. Масштабная линейка: 1 мкм. (В) Планшеты инкубировали с указанной концентрацией рекомбинантных антител человеческого происхождения NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 или NI-203.8E3. Антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.8E3 связывались с IAPP человека (■, 10 мкг/мл) с высоким сродством и EC_{50} , равной 9, 22, 6 и 4 нМ, соответственно. NI-203.26C11 также связывало proIAPP (□, 10 мкг/мл) с EC_{50} , равной 260 нМ. Измерения выполняли в двух повторах и вычитали фоновый сигнал на БСА. Данные выражены в виде средних значений ОП при длине волны 450 нм.

Фиг. 5. Антитела человеческого происхождения против IAPP специфичны к фибриллам IAPP. (А) Электронные микрофотографии растворов IAPP (2 мг/мл) и нефибриллярного IAPP (500 мкг/мл), использованных для покрытия планшета для твердофазного ИФА. В то время как раствор IAPP содержит фибриллы, фибриллы IAPP отсутствуют в растворе нефибриллярного IAPP. Масштабная линейка: 1 мкм. (В) Планшеты инкубировали с указанной концентрацией рекомбинантных антител человеческого происхождения NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 или NI-203.8E3. Антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.8E3 связываются с фибриллами IAPP (раствор IAPP, ■, 10 мкг/мл) с высоким сродством, а с нефибриллярным IAPP (△, 10 мкг/мл) - с очень низким сродством, что указывает на специфичность по отношению к фибриллам IAPP. Измерения выполняли в двух повторах и вычитали фоновый сигнал на БСА. Данные выражены в виде средних значений ОП при длине волны 450 нм.

Фиг. 6. IAPP-связывающие эпитопы рекомбинантных антител человека, исследованные с помощью пепскан-анализа. (А) Пепскан-изображения рекомбинантных антител человеческого происхождения NI203.19H8 и NI-203.26C11 (1 мкг/мл). Связывание NI-203.19H8 происходило по пептидам 6 и 7 (строка А), включающим аминокислоты 19-25 (пептид 6: 16-LVHSSNNFGA-25 SEQ ID NO: 6, пептид 7: 19-SSNNFGAILS-28 SEQ ID NO: 8, консенсусная связывающая последовательность: 19-SSNNFGA-25 SEQ ID NO: 4). Связывание NI-203.26C11 происходило по пептиду 1 (строка А), охватывающему аминокислоты 1-10 (пептид 1: 1-KCNTATCATQ-10 SEQ ID NO: 9), но не по пептиду 2, охватывающему аминокислоты 4-13 (пептид 2: 4-TATCATQRLA-13 SEQ ID NO: 10). Замена на аланин остатков 2-8 в пептидах 33-39 и 41 (строка С) нарушала связывание NI-203.26C11 (мутация пептида 33: С2А, мутация пептида 34: N3А, мутация пептида 35: Т4А, мутация пептида 36: А5G, мутация пептида 37: А5Р, мутация пептида 38: Т6А, мутация пептида 39: С7А, мутация пептида 41: А8Р). Вторичный ПХ-конъюгированный Fcy осла против IgG человека отдельно от других реагентов (1:20000; вторичное Ab) использовали в качестве контроля. (В) Связывающие эпитопы различных IAPP-специфических антител человеческого происхождения, выявленные в области указанных аминокислот белковой последовательности IAPP человека. Верхняя панель: аминокислотная последовательность полноразмерного IAPP человека (аминокислоты 1-37). NI: связывающий эпитоп не выявлен.

Фиг. 7. Антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 специфически распознают патологический амилоид IAPP в поджелудочной железе пациентов с диагнозом "Сахарный диабет 2 типа (СД2)". Антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 демонстрируют окрашивание островков поджелудочной железы при СД2, нагруженных фибриллами IAPP (амилоидом) (А, В), но не островков поджелудочной железы при СД2 без фибрилл IAPP (С, D). (А) Окрашивание амилоида тиофлавином S (ThioS, левая панель) и конго красным (CR, правая панель) в островках поджелудочной железы пациента с СД2. (В) Обнаружение фибрилл IAPP в амилоид-положительных островках поджелудочной железы при СД2 помощью антител NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 (коричневые, CR) в концентрации 50 нМ (большая панель и нижняя левая вставка) и 5 нМ (нижняя правая вставка). (С) Отсутствие амилоида в островках поджелудочной железы пациента с СД2, определенное по отрицательному окрашиванию тиофлавином S (ThioS, левая панель) и конго красным (CR, правая панель). (D) Отсутствие окрашивания в амилоид-отрицательных островках поджелудочной железы при СД2 антителами NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 в концентрации 50 нМ. Вторичное конъюгированное с ПХ антитело осла против антител человека отдельно от других реагентов (вторичное Ab) использовали в качестве контроля. Нижние вставки: изображения отдельных островков поджелудочной железы человека при большом уве-

личении. Островки поджелудочной железы человека окрашивали антителом против инсулина (синие в исходном образце (i.o.), сильное окрашивание на данном изображении) и выполняли докрасивание для визуализации ядер клеток (бледно-синие окрашивание i.o., слабое окрашивание на данном изображении).

Фиг. 8. Антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 не распознают физиологический IAPP в контрольных образцах поджелудочной железы человека. Антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 (50 нМ) демонстрируют слабое окрашивание контрольных островков человека по сравнению с контрольным антителом против IAPP (1:100; контрольное Ab). Вторичное конъюгированное с ПХ антитело осла против антител человека отдельно от других реагентов (вторичное Ab) использовали в качестве контроля. Островки поджелудочной железы человека окрашивали антителом против инсулина (синие в исходном образце (i.o.), сильное окрашивание на данном изображении) и выполняли докрасивание для визуализации ядер клеток (бледно-синие i.o., слабое окрашивание на данном изображении).

Фиг. 9. Антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 распознают патологические фибриллы IAPP в поджелудочной железе кошки при диабете. Обнаружение фибрилл IAPP в островках поджелудочной железы кошки с СД2 с помощью антител NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 (50 нМ, коричневый-CR). Фибриллы IAPP (амилоид) окрашивали конго красным (CR). Вторичное конъюгированное с ПХ антитело осла против антител человека отдельно от других реагентов (вторичное Ab) использовали в качестве контроля. Нижние левые вставки: изображения отдельных островков поджелудочной железы кошки при большом увеличении. Островки поджелудочной железы кошки окрашивали антителом против инсулина (синие в исходном образце (i.o.), сильное окрашивание на данном изображении) и выполняли докрасивание для визуализации ядер клеток (бледно-синие i.o., слабое окрашивание на данном изображении).

Фиг. 10. Антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 не распознают патологические отложения A β в головном мозге человека при болезни Альцгеймера. Отсутствие окрашивания антителами NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 (50 нМ) по сравнению с A β -специфическим антителом 6E10 (1:2000; контрольное Ab). Вторичное конъюгированное с ПХ антитело осла против антител человека отдельно от других реагентов (вторичное Ab) использовали в качестве контроля. Выполняли докрасивание для визуализации ядер клеток (бледно-синие i.o., слабое окрашивание на данном изображении).

Фиг. 11. Рекombинантное химерное антитело человека и мыши NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 с одинаковым сродством связывается с IAPP человека. (A) Определение EC₅₀ рекombинантных химерных антител человека и мыши против IAPP по отношению к IAPP (■, 10 мкг/мл) и БСА (◇, 10 мкг/мл). Планшеты инкубировали с указанными концентрациями антител. Измерения выполняли в двух повторах. Данные выражены в виде средних значений ОП при длине волны 450 нм. (B, C) Значения EC₅₀ химерных антител человека и мыши.

Фиг. 12. Рекombинантное химерное антитело мыши NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 распознает патологические фибриллы IAPP в поджелудочной железе пациентов с диагнозом "Сахарный диабет 2 типа (СД2)". Обнаружение фибрилл IAPP в островках поджелудочной железы двух пациентов-людей с СД2 (1 и 2) с помощью химерных антител NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 в концентрации 50 нМ (коричневые i.o., сильное темное или черное окрашивание на данном изображении). Островки поджелудочной железы человека окрашивали антителом против инсулина (синие i.o., сильное окрашивание на данном изображении) и выполняли докрасивание для визуализации ядер клеток (бледно-синие i.o., слабое окрашивание на данном изображении).

Подробное описание изобретения

При сахарном диабете 2 типа (СД2) генетические детерминанты и факторы окружающей среды приводят к развитию резистентности к инсулину с последующим компенсаторным увеличением массы бета-клеток и секреции инсулина и амилина (hIAPP) для поддержания нормального уровня глюкозы в крови. Полученные высокие концентрации амилина способствуют образованию токсичных олигомеров островкового амилоидного полипептида человека (hIAPP) и отложению фибрилл hIAPP, обнаруживаемых более чем у 90% пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Отложение hIAPP коррелирует со снижением количества инсулинпродуцирующих бета-клеток и, предположительно, также играет роль в гибели β -клеток островков поджелудочной железы, трансплантированных лицам с диабетом 1 типа. Несколько антител человеческого происхождения из пулов здоровых доноров или доноров, страдающих ожирением, с высоким риском развития диабета 2 типа, но отсутствием заболевания, идентифицированы и охарактеризованы *in vitro*, клонированы и рекombинантно продуцированы с применением RTM-технологии Neurimmune, как подробно описано в международной заявке WO2008/081008 и в данной заявке. Ведущие кандидаты проходят валидацию на трансгенных мышах, экспрессирующих hIAPP и получающих питание с высоким содержанием жиров. Терапевтическую эффективность оценивают путем определения массы бета-клеток и нагрузки hIAPP-амилоида в поджелудочной железе, а также уровня hIAPP в плазме и функциональных анализов метаболизма глюкозы и секреции инсулина.

Сахарный диабет типа 2 является наиболее распространенной формой диабета, на которую приходится около 90% всех случаев. Указанное заболевание поражает более 200 миллионов человек в мире и ежегодно приводит к более чем миллиону смертей от диабета. В Швейцарии этим заболеванием страда-

ют более 300000 пациентов. Распространенность сахарного диабета резко растет как в развитых, так и в развивающихся странах из-за роста численности населения, старения, урбанизации и роста распространенности ожирения и недостатка физической активности. Глобальный рынок сахарного диабета 2 типа составляет 25 млрд долларов США и, по прогнозам, достигнет 35 млрд долларов США в 2016 году при совокупном темпе годового роста 6,4% в период между 2009 и 2016 гг. Современные способы лечения включают контроль рациона и фармакологическое вмешательство, действующее на различные метаболические пути с целью снижения уровня глюкозы в крови за счет повышения чувствительности к инсулину или стимуляции высвобождения инсулина из поджелудочной железы. В то же время, ни один из имеющихся способов лечения не способен противодействовать агрегации hIAPP и гибели бета-клеток поджелудочной железы. Новые стратегии лечения диабета 2 типа включают аналоги глюкагон-подобного пептида 1 (GLP-1) и ингибиторы дипептидилпептидазы 4 (ДПП-4), фермента, который деактивирует эндогенный GLP-1. Указанные стратегии основаны на мощном инсулинотропном действии GLP-1 и его способности усиливать пролиферацию бета-клеток. Важно отметить, что усиленное высвобождение инсулина также сопряжено с усиленным высвобождением амилина. Экспериментально показано, что стимуляция секреции инсулина усиливает развитие островкового амилоидоза в животных моделях, и можно ожидать подобных эффектов у людей. Поэтому, помимо конкретного применения IAPP-связывающих молекул согласно настоящему изобретению, дополнительно предлагаемый терапевтический подход может представлять собой перспективную комбинированную терапию с применением указанных молекул и указанных выше новых способов лечения.

I. Определения.

Если не указано иное, термину, используемому в настоящем документе, дается определение, предусмотренное в Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, редакция от 2000 г., репринтное издание 2003 г., ISBN 0198506732.

Следует отметить, что формы единственного числа объекта, относящиеся к одному или большему количеству указанных объектов, например, "антителу", следует понимать как представляющие одно или более антител. Фактически, формы единственного числа, а также термины "один или более" и "по меньшей мере один" могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо.

Если иное не указано специально, термин "IAPP" взаимозаменяемо используется для специфического обозначения нативной мономерной, олигомерной, нефибриллярной и фибриллярной форм островкового амилоидного полипептида (IAPP). Термин "IAPP" также используется в качестве общего определения других конформеров IAPP, например, олигомеров и агрегатов IAPP, например, фибрилл IAPP. Термин "IAPP" обычно используется для обозначения всех типов и форм IAPP в целом. Термин "proIAPP" взаимозаменяемо используется для конкретного обозначения нативной мономерной, олигомерной, фибриллярной и/или агрегированной формы пептида-предшественника островкового амилоидного полипептида (proIAPP). Буквы, добавляемые перед терминами IAPP или proIAPP, используются для обозначения организма, из которого происходит конкретный ортолог, например, hIAPP для IAPP человека или mIAPP для IAPP мышшиного происхождения.

Аминокислотная последовательность из 37 АК для IAPP человека выглядит следующим образом:

KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSSTNVGSNTY (SEQ ID NO: 1)

и содержит дисульфидный мостик между остатками цистеина 2 и 7 и амидированный C-конец.

IAPP образуется в результате процессинга препрогормона rpreproIAPP, предшественника из 89 аминокислот, продуцируемого в β -клетках поджелудочной железы. Белковая последовательность rpreproIAPP человека выглядит следующим образом:

MGILKLQVFLIVLSVALNHLKATPIESHQVEKRKCNTATCATQRLANFLVHSSNFG

GAILSSTNVGSNTYGKRNAVEVLKREPLNYLPL (SEQ ID NO: 2);

указанную последовательности можно найти также в соответствующих базах данных, например, в базе UniProt: UniProtID: P10997 (IAPP_HUMAN).

RpreproIAPP быстро расщепляется после трансляции до островкового амилоидного прополипептида. Белковая последовательность proIAPP человека выглядит следующим образом:

PIESHQVEKRKCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSSTNVGSNTYGKRNAVEV

LKREPLNYLPL (SEQ ID NO: 3);

она подвергается дополнительному протеолизу и посттрансляционным модификациям с образованием hIAPP.

Аминокислотные последовательности IAPP, proIAPP и rpreproIAPP человека "дикого типа" или их рекомбинантные последовательности представлены указанными выше последовательностями согласно SEQ ID NO: 1-3.

Антитела человека против IAPP и proIAPP антител, описанные в настоящем документе, специфически связывают IAPP и/или proIAPP и их эпитопы и связываются с различными конформациями IAPP и/или proIAPP и их эпитопов. Например, в настоящем документе описаны антитела, специфически связывающие патологические агрегированные формы IAPP и/или proIAPP, например, нефибриллярные олигомеры и/или фибриллярные олигомеры/фибриллы и/или агрегаты, состоящие из их смешанных форм.

Термин "(патологически) агрегированные/агрегаты IAPP и/или proIAPP" взаимозаменяемо используется для специфического обозначения указанных выше форм. Термин "(патологические) агрегированные формы" или "агрегаты", используемый в настоящем документе, описывает продукты накопления или формирования кластеров в результате ошибочного/патологического взаимодействия IAPP и/или proIAPP друг с другом. Эти агрегаты, скопления или кластерные формы могут являться, в основном состоять из или состоять из IAPP и/или proIAPP и их нефибриллярных олигомеров и/или фибриллярных олигомеров и фибрилл. В настоящем документе упоминание антитела, которое "специфически связывает", "избирательно связывает" или "предпочтительно связывает" (преимущественно связывает) IAPP и/или proIAPP, относится к антителу, которое не связывает других неродственных белков. В одном примере антитело против IAPP и/или proIAPP, описанное в настоящем документе, может связывать IAPP и/или proIAPP или их эпитоп и не демонстрирует связывания с другими белками, приблизительно двукратно превышающего фоновое связывание. Антитело, "специфически связывающее" или "избирательно связывающее" конформер IAPP и/или proIAPP, относится к антителу, связывающему не все конформации IAPP и/или proIAPP, т.е. не связывающему по меньшей мере один из других конформеров IAPP и/или proIAPP. Например, в настоящем документе описаны антитела, которые могут предпочтительно связываться с агрегированными формами IAPP и/или proIAPP как *in vitro*, так и в тканях, полученных от пациентов с выраженным СД2 или с риском развития СД2. Поскольку антитела человека против IAPP и/или proIAPP согласно настоящему изобретению выделены из пула здоровых субъектов-людей или из пула пациентов, страдающих ожирением, и других групп пациентов с повышенным риском развития СД2, у которых во время выделения антител не было признаков СД2 и проявлений IAPP- и/или proIAPP-специфического иммунного ответа, антитела против IAPP и/или proIAPP согласно настоящему изобретению также можно называть "аутоантителами человека" с целью подчеркнуть, что указанные антитела действительно экспрессировались субъектами и не были выделены из, например, фаговой библиотеки, экспрессирующей иммуноглобулины человека, что до сих пор являлось одним из распространенных способов получения антител, подобных антителам человека.

Подразумевается, что термин "пептид" включает термины "полипептид" и "белок" (которые порой в настоящем документе могут использоваться как взаимозаменяемые) в пределах их значений. Аналогичным образом, фрагменты белков и полипептидов в настоящем документе также можно рассматривать как пептиды и называть "пептидами". Тем не менее, термин "пептид" предпочтительно обозначает полимер из аминокислот, содержащий по меньшей мере 5 последовательных аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 10 последовательных аминокислот, более предпочтительно - по меньшей мере 15 последовательных аминокислот, еще более предпочтительно - по меньшей мере 20 последовательных аминокислот и особенно предпочтительно - по меньшей мере 25 последовательных аминокислот. Кроме того, пептид согласно настоящему изобретению обычно содержит не более 100 последовательных аминокислот, предпочтительно менее 80 последовательных аминокислот и более предпочтительно - менее 50 последовательных аминокислот.

Полипептиды.

В настоящем документе подразумевается, что термин "полипептид" охватывает единственный "полипептид", а также множественные "полипептиды" и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот и не относится к продуктам определенной длины. Таким образом, "пептиды", "дипептиды", "трипептиды", "олигопептиды", "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, входит в определение "полипептида", и термин "полипептид" можно использовать вместо, или взаимозаменяемо с любым из этих терминов.

Кроме того, термин "полипептид" относится также к продуктам постэкспрессионной модификации полипептида, включая, без ограничения, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование и модификацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию неприродными аминокислотами. Полипептид может быть получен из природного биологического источника или продуцирован посредством рекомбинантных технологий, но не обязательно транслирован с заданной нуклеотидной последовательности. Его можно получить любым способом, в том числе путем химического синтеза.

Полипептид согласно изобретению может быть размером 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 25 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 200 или более, 500 или более, 1000 или более, или 2000 или более аминокислот. Полипептиды могут иметь определенную трехмерную структуру, хотя они не обязательно имеют такую структуру. Полипептиды с определенной трехмерной структурой называются свернутыми, а полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, а могут иметь большое количество различных конформаций, называют несвернутыми. В настоящем документе термин "гликопротеин" относится к белку, связанному с по меньшей мере одним углеводным остатком, присоединенным к белку через кислородсодержащую или азотсодержащую боковую цепь аминокислотного остатка, например остатка серина или аспарагина.

Под "выделенным" (изолированным) полипептидом или его фрагментом, вариантом или производ-

ным понимают полипептид, который не находится в своей естественной среде. Особый уровень очистки не требуется. Например, выделенный полипептид может быть извлечен из его нативной или естественной среды. Рекомбинантно продуцированные полипептиды и белки, экспрессированные в клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей изобретения, как нативные или рекомбинантные полипептиды, отделенные, фракционированные либо частично или по существу очищенные посредством любой подходящей методики.

Термин "рекомбинантные пептиды, полипептиды или белки" относится к пептидам, полипептидам или белкам, продуцированным посредством методик рекомбинантной ДНК, т.е. продуцированным клетками микроорганизмов или млекопитающих, трансформированными экзогенным рекомбинантным экспрессирующим ДНК-конструктом, кодирующим гибридный белок, включающий желателный пептид. Белки или пептиды, экспрессируемые в большинстве бактериальных культур обычно не содержат гликанов. Белки и полипептиды, экспрессируемые в дрожжах, могут характеризоваться профилем гликозилирования, отличающимся от полипептидов, экспрессируемых в клетках млекопитающих.

В определении полипептида согласно настоящему изобретению входят фрагменты, производные, аналоги или варианты указанных полипептидов, а также любые их комбинации. Термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог" включают пептиды и полипептиды, обладающие аминокислотной последовательностью, достаточно сходной с аминокислотной последовательностью природного пептида. Термин "достаточно сходный" означает первую аминокислотную последовательность, содержащую достаточное или минимальное количество аминокислотных остатков, идентичных или эквивалентных остаткам второй аминокислотной последовательности, так что первая и вторая аминокислотные последовательности содержат общий структурный домен и/или обладают общей функциональной активностью. Например, аминокислотные последовательности, содержащие общий структурный домен, идентичный по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или по меньшей мере приблизительно на 100%, в настоящем документе определяются как достаточно сходные. В предпочтительном варианте варианты являются достаточно сходными с аминокислотной последовательностью предпочтительных пептидов согласно настоящему изобретению, в частности, IAPP и/или pro-IAPP или фрагментов, вариантов, производных или аналогов любого из них. Такие варианты обычно сохраняют функциональную активность пептидов согласно настоящему изобретению. Варианты включают пептиды, аминокислотная последовательность которых отличается от нативных пептидов и пептидов дикого типа, соответственно, за счет одной или более аминокислотных делеции(й), добавления(й) или замены(ы). Они могут быть природными, а также искусственно созданными вариантами.

Кроме того, термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог", когда речь идет об антителах или полипептидах антител согласно настоящему изобретению, включают любые полипептиды, сохраняющие по меньшей мере в некоторой степени антигенсвязывающие свойства соответствующей нативной связывающей молекулы, антитела или полипептида. Фрагменты полипептидов согласно настоящему изобретению включают протеолитические фрагменты, а также делеционные фрагменты, помимо специфических фрагментов антител, обсуждаемых в других разделах настоящего документа. Варианты антител и полипептиды антител согласно настоящему изобретению включают описанные выше фрагменты, а также полипептиды с аминокислотными последовательностями, измененными за счет аминокислотных замен, делеций или вставок. Варианты могут возникать естественным образом или быть неприродными. Неприродные варианты, могут быть получены с применением методик мутагенеза, известных в данной области техники. Варианты полипептидов могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеций или добавления. Производные IAPP- и/или proIAPP-специфических связывающих молекул, например, антител и полипептидов антител согласно настоящему изобретению, являются полипептидами, модифицированными с целью проявления дополнительных свойств, отсутствующих у нативного полипептида. Примеры включают гибридные белки. Варианты полипептидов в настоящем документе могут также называться "аналогами полипептидов". В настоящем документе термин "производное" связывающей молекулы или ее фрагмента, антитела или полипептида антитела относится к рассматриваемому полипептиду, содержащему один или более остатков, химически модифицированных путем реакции по функциональной боковой группе. Кроме того, "производные" включают пептиды, содержащие одно или более природных аминокислотных производных 20 стандартных аминокислот. Например, 4-гидроксипролин может заменять пролин; 5-гидроксилизин может заменять лизин; 3-метилгистидин может заменять гистидин; гомосерин может заменять серии; а орнитин может замещать лизин.

Определение сходства и/или идентичности молекул.

"Сходство" между двумя пептидами определяют путем сравнения аминокислотной последовательности одного пептида с последовательностью второго пептида. Аминокислота одного пептида сходна с соответствующей аминокислотой второго пептида, если она идентична или является консервативной аминокислотной заменой. Консервативные замены включают замены, описанные в Dayhoff, M.O., ed., *The Atlas of Protein Sequence and Structure 5*, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. (1978), и в Argos, *EMBO J.* 8 (1989), 779-785. Например, аминокислоты, принадлежащие к одной из следующих групп, представляют собой консервативные изменения или замены: -Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr; -Cys, Ser, Tyr, Thr; -Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; -Lys, Arg, His; -Phe, Tyr, Trp, His; и -Asp, Glu.

"Сходство" между двумя полинуклеотидами определяют путем сравнения нуклеотидной последовательности одного полинуклеотида с последовательностью второго полинуклеотида. Нуклеиновая кислота одного полинуклеотида сходна с соответствующей нуклеиновой кислотой второго полинуклеотида, если она идентична или если нуклеиновая кислота является частью кодирующей последовательности, и соответствующий триплет, содержащийся в нуклеиновой кислоте, кодирует ту же аминокислоту или консервативную аминокислотную замену.

Определение процентной идентичности или сходства между двумя последовательностями предпочтительно осуществляют с использованием математического алгоритма Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 5873-5877. Такой алгоритм включен в программы BLASTn и BLASTp Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, доступные на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Определение процентной идентичности или сходства осуществляется с применением стандартных параметров программ BLASTn и BLASTp, как рекомендовано на веб-странице NCBI и в "Руководстве по выбору программы BLAST" по отношению к последовательностям определенной длины и состава.

BLAST-поиск по полинуклеотидам выполняют с помощью программы BLASTn. Для общих параметров, поле "Макс, последовательностей-мишеней" может быть равным 100, поле "Короткие запросы" может быть отмечено, поле "Ожидаемый порог" может быть задано равным 1000, а поле "Размер слова" может быть задано равным 7, как рекомендуется для коротких последовательностей (менее 20 оснований) на веб-странице NCBI. Для более длинных последовательностей поле "Ожидаемый порог" может быть задано равным 10, а поле "Размер слова" может быть задано равным 11. Для балльных параметров поле "Совпадающие/несовпадающие баллы" может быть задано равным 1-2, а поле "Стоимость пропуска" может быть задано линейным. Для параметров фильтрации и масок поле "Области низкой сложности" может быть не отмечено, поле "Видоспецифичные повторы" может быть не отмечено, поле "Маска только для таблицы подстановки" может быть отмечено, "Параметры фильтра DUST" может быть отмечено, и поле "Маска строчных букв" может быть не отмечено. В целом в этой связи можно использовать "Поиск коротких почти точных совпадений", который обеспечивает большую часть указанных параметров. Дополнительную информацию об этом можно найти в "Руководстве по выбору программы BLAST" опубликованном на веб-странице NCBI.

BLAST-поиск по белкам выполняют с помощью программы BLASTp. Для общих параметров, поле "Макс, последовательностей-мишеней" может быть равным 100, поле "Короткие запросы" может быть отмечено, поле "Ожидаемый порог" может быть задано равным 10, а поле "Размер слова" может быть задано равным "3". Для балльных параметров поле "Матрица" может быть задано как "BLOSUM62", а поле "Стоимость пропуска" может быть задано как "Наличие: 11 Расширение: 1", поле "Композиционная коррекция" может быть задано как "Условная композиционная балльная коррекция матрицы". Для параметров фильтрации и масок поле "Области низкой сложности" может быть не отмечено, поле "Маска только для таблицы подстановки" может быть не отмечено, а поле "Маска строчных букв" может быть не отмечено.

Изменения в обеих программах, например, по отношению к длине искомым последовательностей, выполняют в соответствии с рекомендациями в "Руководстве по выбору программы BLAST", опубликованном в HTML- и PDF-версиях на веб-странице NCBI.

Полинуклеотиды:

Предполагается, что термин "полинуклеотид" охватывает одиночную нуклеиновую кислоту, а также множественные нуклеиновые кислоты, и относится к выделенной нуклеотидной молекуле или конструктору, например, матричной РНК (мРНК) или плазмидной ДНК (пДНК). Полинуклеотид может содержать обычную фосфодиэфирную связь или нетрадиционную связь (например, амидную связь, встречающуюся в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Термин "нуклеиновая кислота" относится к любому одному или большему числу сегментов нуклеиновых кислот, например, фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде. Под "выделенной" нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом понимают молекулу нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, извлеченную из ее нативной среды. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий антитело, содержащийся в векторе, считается выделенным для целей настоящего изобретения. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, поддерживаемые в гетерологических клетках-хозяевах или очищенные (частично или в значительной степени) полинуклеотиды в растворе. Выделенные молекулы РНК включают РНК-транскрипты полинуклеотидов согласно настоящему изобретению, полученные *in vivo*

или *in vitro*. Кроме того, выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению включают такие молекулы, полученные путем синтеза. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота могут являться или могут содержать регуляторный элемент, например, промотор, сайт связывания рибосом или терминатор транскрипции.

В настоящем документе "кодирующая область" представляет собой часть нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) не транслируется в аминокислоту, его можно считать частью кодирующей области, однако любые фланкирующие последовательности, например, промоторы, сайты связывания рибосомы, терминаторы транскрипции, интроны и т.п. не являются частью кодирующей области. Две или более кодирующие области согласно настоящему изобретению могут быть представлены в виде единого полинуклеотидного конструкта, например, одиночного вектора, или отдельных полинуклеотидных конструктов, например, отдельных (разных) векторов. Кроме того, любой вектор может содержать одну кодирующую область или может состоять из двух или более кодирующих областей, например, один вектор может отдельно кодировать вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулинов и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина. Кроме того, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота согласно изобретению может кодировать гетерологичные кодирующие области, объединенные или не объединенные с нуклеиновой кислотой, кодирующей связывающую молекулу, антитело или их фрагмент, вариант или производное. Гетерологичные кодирующие области включают, без ограничений, специализированные элементы или мотивы, например, секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В случае ДНК полинуклеотид состоит из нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который в норме может включать промотор и/или другие элементы, контролирующие транскрипцию или трансляцию, функционально связанные с одной или более кодирующими областями. Функциональная связь представляет собой ситуацию, когда область, кодирующая продукт гена, например, полипептид, связана с одной или более регуляторными последовательностями таким образом, что экспрессия продукта гена находится под влиянием или контролем регуляторной(ых) последовательности(ей). Два фрагмента ДНК (например, область, кодирующая полипептид, и промотор, связанный с ней) являются "функционально ассоциированными" или "функционально связанными", если индукция функции промотора приводит к транскрипции мРНК, кодирующей целевой продукт гена, и если характер связи между двумя фрагментами ДНК не мешает способности регуляторной последовательности управлять экспрессией продукта гена или не мешает транскрипции матричной ДНК. Так, область промотора является функционально связанной с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если промотор может осуществлять транскрипцию указанной нуклеиновой кислоты. Промотор может быть клеточно-специфичным промотором, который управляет транскрипцией ДНК в основном только в заранее определенных клетках. Другие элементы контроля транскрипции, кроме промотора, например, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминирования транскрипции, могут быть функционально связаны с полинуклеотидом для управления клеточно-специфичной транскрипцией. Подходящие промоторы и другие области, контролирующие транскрипцию, описаны в настоящем документе.

Специалистам в данной области техники известны многочисленные области, контролирующие транскрипцию. Они включают, без ограничения, области, контролирующие транскрипцию, функционирующие в клетках позвоночных, например, без ограничений, промоторные и энхансерные сегменты цитомегаловирусов (немедленный ранний промотор, в сочетании с интроном А), вируса обезьян 40 (ранний промотор) и ретровирусов (например, вируса саркомы Рауса). Другие области, контролирующие транскрипцию, включают элементы, происходящие от генов позвоночных, например, актина, белка теплового шока, гормона роста крупного рогатого скота и β -глобина кролика, а также других последовательностей, способных контролировать экспрессию генов в клетках эукариот. Дополнительные подходящие области, контролирующие транскрипцию, включают тканеспецифичные промоторы и энхансеры, а также лимфокин-индуцибельные промоторы (например, промоторы, индуцируемые интерферонами или интерлейкинами).

Аналогично, специалистам в данной области техники известны многочисленные элементы, контролирующие трансляцию. Они включают сайты связывания рибосом, кодоны инициации и терминирования трансляции и элементы, происходящие от пикорнавирусов (в частности, сайт внутренней посадки рибосом, или IRES, также называемый CITE-последовательностью), но не ограничиваются ими.

В других вариантах реализации полинуклеотид согласно настоящему изобретению представляет собой РНК, например, в форме матричной РНК (мРНК).

Кодирующие области полинуклеотидов и нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению могут быть связаны с дополнительными областями, кодирующими секреторные или сигнальные пептиды, управляющие секрецией полипептида, кодируемого полинуклеотидом согласно настоящему изобретению. Согласно сигнальной гипотезе белки, секретируемые клетками млекопитающих, содержат сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, отщепляющуюся от зрелого белка после инициации экспорта растущей цепи белка из шероховатого эндоплазматического ретикула. Спе-

специалистам в данной области техники известно, что полипептиды, секретируемые клетками позвоночных, обычно содержат сигнальный пептид, присоединенный к N-концу полипептида, который отщепляется от полного или "полноразмерного" полипептида с образованием секретируемой или "зрелой" формы полипептида. В некоторых вариантах реализации используют нативный сигнальный пептид, например, сигнальный пептид тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, или функциональное производное этой последовательности, сохраняющее способность управлять секрецией полипептида, функционально связанного с ним. В альтернативном варианте можно использовать гетерологичный сигнальный пептид млекопитающих или его функциональное производное. Например, лидерную последовательность дикого типа можно заменить лидерной последовательностью тканевого активатора плазминогена (ТРА) человека или β -глокуронидазы мыши.

Термин "связывающая молекула" в контексте настоящего изобретения относится главным образом к антителам и их фрагментам, но может также относиться к другим молекулам, не являющимся антителами, которые связываются с IAPP и/или proIAPP, включая гормоны, рецепторы, лиганды, молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС), шапероны, например, белки теплового шока (HSP), а также молекулы межклеточной адгезии, например, члены суперсемейств кадгеринов, интегринов, лектинов С-типа и иммуноглобулинов (Ig), но не ограничиваясь ими. Таким образом, только в целях ясности и без ограничения области действия настоящего изобретения, большая часть следующих вариантов реализации обсуждается по отношению к антителам и антитело-подобным молекулам, которые представляют собой предпочтительные связывающие молекулы для разработки диагностических и терапевтических агентов.

Антитела.

Термины "антитело" и "иммуноглобулин" в настоящем документе используются взаимозаменяемо. Антитело или иммуноглобулин представляет собой IAPP- и/или proIAPP-связывающую молекулу, которая содержит по меньшей мере переменный домен тяжелой цепи и обычно содержит по меньшей мере переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи. Базовые структуры иммуноглобулинов позвоночных сравнительно хорошо изучены; см., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988).

В соответствии с более подробным обсуждением, приведенным ниже, термин "иммуноглобулин" включает несколько широких классов полипептидов, различающихся с биохимической точки зрения. Специалисты в данной области техники знают, что тяжелые цепи подразделяются на гамма, мю, альфа, дельта и эpsilon-цепи (γ , μ , α , δ , ϵ), внутри которых есть несколько подклассов (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Природа указанных цепей определяет "класс" антитела IgG, IgM, IgG, IgA или IgE соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, IgA1 и т.д. хорошо изучены; известно, что они обладают функциональной специализацией. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко распознаются специалистом в данной области техники с учетом данного описания и, соответственно, входят в область настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов явным образом относятся к настоящему изобретению, однако последующее обсуждение в целом относится к молекулам иммуноглобулинов класса IgG. Что касается IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой около 23000 дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой 53000-70000. Указанные четыре цепи обычно соединены дисульфидными связями в "Y"-конфигурацию, где легкие цепи сгруппированы с тяжелыми цепями, начиная с горловины указанной "Y"-конфигурации и на протяжении всей переменной области.

Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда (κ , λ). Тяжелая цепь любого класса может быть связана с легкой цепью каппа или лямбда. В общем случае, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, и "хвостовые" фрагменты двух тяжелых цепей соединены друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, если иммуноглобулины получены с использованием гибридом, В-клеток или рекомбинантных клеток-хозяев. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи ориентирована от N-конца на разветвленной оконечности "Y"-конфигурации до C-конца в нижней части каждой цепи.

Легкие и тяжелые цепи делятся на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константный" и "переменный" используются с функциональной точки зрения. В этом отношении следует учитывать, что переменные домены как легкой (V_L), так и тяжелой цепи (V_H) определяют распознавание антигена и специфичность. И наоборот, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, например, способность к секреции, переходу через плацентарный барьер, связывание с Fc-рецептором, связывание комплемента и т.д. Принято, что нумерация доменов константной области увеличивается по мере их удаления от антигенсвязывающего сайта или N-конца антитела. N-концевая часть является переменной областью, а C-концевая часть - константной областью; CH3- и CL-домены фактически содержат C-конец тяжелой и легкой цепи, соответственно.

Как указывалось выше, переменная область позволяет антителу селективно распознавать и спе-

цифически связывать эпитопы антигенов. Т.е. домен V_L и домен V_H или подмножество гипервариабельных участков (CDR) антитела в совокупности образуют вариабельную область, которая задает трехмерный антигенсвязывающий сайт. Это четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, находящийся на конце каждого плеча "Y". Конкретнее, антигенсвязывающий сайт определяется тремя CDR на каждой из V_H - и V_L -цепей. Любой фрагмент антитела или иммуноглобулина, который содержит структуру, достаточную для специфического связывания с IAPP и/или proIAPP, взаимозаменяемо называется в настоящем документе "связывающим фрагментом" или "иммуноспецифическим фрагментом".

Природные антитела содержат шесть гипервариабельных участков, иногда называемых "участками, определяющими комплементарность" или "CDR", которые присутствуют в каждом антигенсвязывающем домене и представляют собой короткие несмежные аминокислотные последовательности, определенным образом расположенные и образующие антигенсвязывающий домен при принятии антителом его трехмерной конфигурации в водной среде. "CDR" фланкированы четырьмя относительно консервативными "каркасными" участками или "FR", которые демонстрируют менее выраженную межмолекулярную изменчивость. Каркасные области по большей части принимают конформацию β -листа, а CDR образуют петли, которые соединяют β -листовые структуры и в некоторых случаях входят в их состав. Таким образом, каркасные области образуют каркас, который обеспечивает позиционирование CDR в правильной ориентации за счет нековалентных взаимодействий между цепями. Антигенсвязывающий домен, образованный определенным образом расположенными CDR, задает поверхность, комплементарную эпитопу иммунореактивного антигена. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с родственным ему эпитопом. Специалист в данной области техники может легко определить аминокислоты, составляющие CDR и каркасные области, соответственно, для любой заданной вариабельной области тяжелой или легкой цепи, поскольку существует их точное определение; см. "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылок.

В случае существования двух или более определений термина, который используется и/или принят в данной области техники, подразумевается, что определение термина, используемое в настоящем документе, включает все такие значения, если явно не указано иное. Конкретным примером является использование термина "гипервариабельный участок" или "CDR" для описания несмежных антигенсвязывающих сайтов в пределах вариабельной области полипептидов тяжелых и легких цепей. Эта конкретная область была описана в работах Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) и Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, которые включены в настоящий документ посредством ссылок, где определения включают перекрывание или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, подразумевается, что применение любого определения по отношению к CDR антитела или его вариантов находится в рамках указанного термина в соответствии с его определением и использованием в настоящем документе. Соответствующие аминокислотные остатки, входящие в состав CDR согласно определению в каждом из приведенных выше источников, приведены ниже в табл. 1 для сравнения. Точные номера остатков, входящих в конкретный CDR, зависят от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники легко могут определить, какие остатки составляют конкретный гипервариабельный участок или CDR антитела человека подтипа IgG, на основании аминокислотной последовательности вариабельной области антитела.

Таблица I. Определения CDR¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

Нумерация всех определенных CDR в табл. I осуществляется согласно правилу нумерации, установленному Kabat et al. (см. ниже).

Kabat et al., также определили систему нумерации для последовательностей вариабельных доменов, которая применима к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначно применить эту систему "нумерации по Kabat" для любой последовательности вариабельного домена, не используя никаких экспериментальных данных, кроме самой последовательности. В настоящем документе "нумерация по Kabat" относится к системе нумерации, установленной в работе Kabat et al., U.S. Dept. of

Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Если не указано иное, упоминание нумерации положений определенных аминокислотных остатков в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, варианте или производном согласно настоящему изобретению соответствует системе нумерации по Kabat, которая, однако, является теоретической и не может в равной степени использоваться для каждого антитела согласно настоящему изобретению. Например, в зависимости от положения первого CDR следующие CDR могут сдвигаться в любом направлении.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, иммуноспецифические фрагменты, варианты или производные согласно изобретению включают поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, гуманизированные, приматизированные, муринизированные или химерные антитела или антитела человека, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, Fv, связанные дисульфидными связями (sdFv), фрагменты, содержащие V_L или V_H-домен, фрагменты, получаемые с использованием библиотеки, экспрессирующей Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела к антителам, описанным в настоящем документе), но не ограничиваются ими. Молекулы scFv известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в патенте США 5892019. Молекулы иммуноглобулина или антитела согласно изобретению могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекул иммуноглобулинов.

В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению не является IgM или его производным с пентавалентной структурой. В частности, в конкретных вариантах применения настоящего изобретения, особенно терапевтического применения, IgM менее полезны, чем IgG и другие двухвалентные антитела или соответствующие связывающие молекулы, поскольку IgM из-за своей пентавалентной структуры и отсутствия созревания сродства часто демонстрируют неспецифическую перекрестную реакционную способность и очень низкое сродство.

В особенно предпочтительном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению не является поликлональным антителом, т.е. оно состоит по существу из одной конкретной разновидности антитела, а не смеси, полученной из образца иммуноглобулинов плазмы.

Фрагменты антител, включая одноцепочечные антитела, могут содержать переменную(ые) область(и) по отдельности или в комбинации с полными или частичными шарнирной областью, доменами CH1, CH2 и CH3. Кроме того, настоящее изобретение включает IAPP- и/или proIAPP-связывающие фрагменты, содержащие любую комбинацию переменных областей с шарнирной областью, доменами CH1, CH2 и CH3. Антитела или их иммуноспецифические фрагменты согласно настоящему изобретению могут происходить от любого животного, в том числе от птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела являются антителами человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В еще одном варианте реализации переменная область может происходить от хрящевых рыб (например, от акул).

В одном аспекте антитело согласно настоящему изобретению является моноклональным антителом человека, выделенным из организма человека.

Необязательно каркасную область антитела человека выравнивают и настраивают в соответствии с подходящими последовательностями переменной области эмбриональной линии человека, содержащимися в базе данных; см., например, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), размещенную в центре белковой инженерии MRC (Кембридж, Великобритания). Например, аминокислоты, считающиеся потенциально отклоняющимися от истинной последовательности эмбриональной линии, могут возникать из-за последовательности ПЦР-праймера, выстраивающейся в ходе клонирования. По сравнению с искусственно созданными антителами, подобными антителам человека, например, фрагментами одноцепочечных антител (scFv), полученных из библиотеки фагового дисплея или ксеногенных мышей, моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению характеризуется:

(i) тем, что оно получено с использованием иммунного ответа человека, а не животных-суррогатов, т.е. указанное антитело получено в ответ на природный IAPP или proIAPP в конформациях, характерных для них в организме человека,

(ii) тем, что оно защищает человека или по меньшей мере является существенным для наличия IAPP и/или proIAPP и

(iii) тем, что поскольку антитело имеет человеческое происхождение, риск перекрестной реакционной способности с аутоантигенами сводится к минимуму.

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением термины "моноклональное антитело человека", "моноклональное аутоантитело человека", "антитело человека" и т.п. используются для обозначения IAPP- и/или proIAPP-связывающей молекулы человеческого происхождения, т.е. выделенной из клетки человека, например, В-клетки или гибридомной клетки или кДНК которой непосредственно клонирована из мРНК клетки человека, например, В-клетки памяти человека. Антитела человека остаются "антителами человека" даже при внедрении аминокислотных замен в антитело, например, для улучшения характеристик связывания.

Антитела, полученные из библиотек иммуноглобулинов человека или из животных, трансгенных по

одному или более иммуноглобулинам человека, не экспрессирующим эндогенных иммуноглобулинов, как описано ниже и, например, в патенте США 5939598, принадлежащем Kucherlapati et al., называются антителами, подобными антителам человека, чтобы отличать их от истинных антител человека согласно настоящему изобретению.

Например, соединение тяжелых и легких цепей антител, подобных антителам человека, например, синтетических и полусинтетических антител, обычно выделяемых методом фагового дисплея, не обязательно отражает истинное объединение, происходящее в исходных В-клетках человека. Соответственно, Fab- и scFv-фрагменты, полученные из рекомбинантных экспрессирующих библиотек, широко используемых в данной области техники, могут рассматриваться как искусственные со всеми возможными присущими эффектами в отношении иммуногенности и стабильности.

В противоположность этому, в настоящем изобретении представлены выделенные антитела со зрелой аффинностью выбранных субъектов-людей, характеризующиеся возможностью терапевтического применения и переносимостью для человека.

В настоящем документе термин "родентизированное антитело" или "родентизированный иммуноглобулин" относится к антителу, содержащему одну или несколько CDR антитела человека согласно настоящему изобретению и каркасную область человека, содержащую аминокислотные замены и/или делеции и/или инсерции на основе последовательности антитела грызуна. При упоминании грызунов предпочтительно применяют последовательности мышей и крыс, причем антитела, содержащие такие последовательности, называются "муринизированными" или "ратинизированными", соответственно. Иммуноглобулин человека, из которого получены CDR, называется "исходным" или "акцепторным", а антитело грызуна, на основе которого получены изменения каркаса, называется "донорным". Константные области не обязательно должны присутствовать, но если они есть, они обычно по существу идентичны константным областям антитела грызуна, т.е. идентичны им по меньшей мере примерно на 85- 90%, предпочтительно примерно на 95% или более. Следовательно, в некоторых вариантах реализации полноразмерная муринизированная тяжелая или легкая цепь иммуноглобулина человека содержит константную область мыши, CDR человека и каркас, по существу характерный для человека, который содержит ряд "муринизированных" аминокислотных замен. Как правило, "муринизированное антитело" является антителом, содержащим переменную муринизированную область легкой и/или тяжелой цепи. Например, муринизированное антитело не должно включать, например, типичные химерные антитела, поскольку вся переменная область химерного антитела не является переменной областью мыши. Модифицированное антитело, "муринизированное" в процессе "муринизации", связывается с тем же антигеном, что и исходное антитело, из которого получены CDR, и обычно менее иммуногенно в организме мыши по сравнению с исходным антителом. Приведенные выше объяснения по отношению к "муринизированному" антителу аналогичным образом применимы для других "родентизированных" антител, например, "ратинизированных антител", в которых используются последовательности крысы вместо последовательностей мыши.

В настоящем документе термин "часть, соответствующая тяжелой цепи", включает аминокислотные последовательности, полученные из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий часть, соответствующая тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один из следующих элементов: домен СН1, шарнирный (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю шарнирную область) домен, домен СН2, домен СН3 или их вариант или фрагмент. Например, связывающий полипептид для применения в настоящем изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую домен СН1; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН2; полипептидную цепь, содержащую домен СН1 и домен СН3; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН3, или полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен СН2 и домен СН3. В еще одном варианте реализации полипептид согласно изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен СН3. Кроме того, в связывающем полипептиде для применения в настоящем изобретении может отсутствовать по меньшей мере часть домена СН2 (например, домен СН2 полностью или частично). Как изложено выше, специалисту в данной области техники понятно, что указанные домены (например, участки тяжелой цепи) могут быть модифицированы таким образом, чтобы их аминокислотная последовательность отличалась от природной молекулы иммуноглобулина.

В некоторых антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных, описанных в настоящем документе, участки тяжелой цепи одной полипептидной цепи мультимера идентичны участкам, расположенным на второй полипептидной цепи мультимера. В альтернативном варианте мономеры, содержащие участки тяжелой цепи согласно изобретению не являются идентичными. Например, каждый мономер может содержать свой мишень-связывающий сайт, образуя, например, биспецифическое антитело или диатело.

В еще одном варианте реализации антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, описанные в настоящем документе, содержат одну полипептидную цепь, например, scFv, и должны экспрессироваться внутри клеток (интратела) для возможности терапевтического и диагностического применения *in vivo*.

Участки тяжелой цепи связывающего полипептида для применения в диагностических и терапевтических способах, описанных в настоящем документе, могут происходить из различных молекул иммуноглобулинов. Например, часть, соответствующая тяжелой цепи, полипептида может содержать домен СН1, происходящий из молекулы IgG1, и шарнирную область, происходящую из молекулы IgG3. В еще одном примере часть, соответствующая тяжелой цепи, полипептида может содержать шарнирную область, частично происходящую из молекулы IgG1, и частично - из молекулы IgG3. В еще одном примере часть, соответствующая тяжелой цепи, полипептида может содержать химерный шарнир, частично происходящую из молекулы IgG1, и частично - из молекулы IgG4.

В настоящем документе термин "часть, соответствующая легкой цепи" включает аминокислотные последовательности, полученные из легкой цепи иммуноглобулина. В предпочтительном варианте участок легкой цепи содержит по меньшей мере один V_L или CL-домен.

Минимальным размером эпитопа пептида или полипептида для антитела считается примерно четыре-пять аминокислот. Эпитопы пептида или полипептида предпочтительно содержат по меньшей мере семь, более предпочтительно по меньшей мере девять и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 15-30 аминокислот. Поскольку CDR может распознавать антигенный пептид или полипептид в его третичной форме, аминокислоты, составляющие эпитоп, не обязательно должны быть последовательными, и в некоторых случаях даже могут находиться не на одной и той же пептидной цепи. В настоящем изобретении эпитоп пептида или полипептида, распознаваемый антителом согласно настоящему изобретению, содержит последовательность из по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, более предпочтительно по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, или примерно 15-30 последовательных или не последовательных аминокислот IAPP или proIAPP.

Под терминами "специфически связывающийся" или "специфически распознающий", которые в настоящем документе используются взаимозаменяемо, обычно подразумевают, что связывающая молекула, например, антитело, связывается с эпитопом через его антигенсвязывающий домен, и что указанное связывание влечет за собой некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно указанному определению, говорят, что антитело "специфически связывается" с эпитопом, если оно связывается с указанным эпитопом через свой антигенсвязывающий домен легче, чем в случае связывания со случайным, неспецифическим эпитопом. Термин "специфичность" используется в настоящем документе для оценки относительного сродства, с которым определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело "А" обладает более высокой специфичностью к данному эпитопу, чем антитело "В", или можно сказать, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью, чем с родственным эпитопом "D".

Термин "характеристики иммунологического связывания", или другие характеристики связывания антитела с антигеном, во всех его грамматических формах, относится к специфичности, сродству, перекрестной реактивности и другим характеристикам связывания антитела.

Под термином "преимущественно связывающий(ся)" подразумевают, что связывающая молекула, например, антитело специфически связывается с эпитопом более легко, чем с родственным, сходным, гомологичным или аналогичным эпитопом. Таким образом, антитело, которое "преимущественно связывается" с данным эпитопом, должно связываться с указанным эпитопом с большей вероятностью, чем с родственным эпитопом, даже если такое антитело может перекрестно реагировать с родственным эпитопом.

В неограничивающем примере связывающая молекула, например, антитело, может считаться преимущественно связывающей первый эпитоп, если она связывает указанный первый эпитоп с меньшей константой диссоциации (K_D), чем K_D антитела для второго эпитопа. В еще одном неограничивающем примере антитело может считаться преимущественно связывающим первый антиген, если оно связывает указанный первый эпитоп со сродством, по меньшей мере на порядок меньшим, чем K_D антитела для второго эпитопа. В еще одном неограничивающем примере антитело может считаться преимущественно связывающим первый эпитоп, если оно связывает указанный первый эпитоп со сродством, по меньшей мере на два порядка меньшим, чем K_D антитела для второго эпитопа.

В еще одном неограничивающем примере связывающая молекула, например, антитело, может считаться преимущественно связывающей первый эпитоп, если она связывает указанный первый эпитоп с меньшей скоростью диссоциации ($k(off)$), чем ($k(off)$) антитела для второго эпитопа. В еще одном неограничивающем примере антитело может считаться преимущественно связывающим первый эпитоп, если оно связывает указанный первый эпитоп со сродством, по меньшей мере на порядок меньшим, чем $k(off)$ антитела для второго эпитопа. В еще одном неограничивающем примере антитело может считаться преимущественно связывающим первый эпитоп, если оно связывает указанный первый эпитоп со сродством, по меньшей мере на два порядка меньшим, чем $k(off)$ антитела для второго эпитопа.

Связывающая молекула, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, описанное в настоящем документе, может называться связывающей IAPP и/или proIAPP или их фрагмент, вариант или специфическую конформацию со скоростью диссоциации ($k(off)$), меньшей или равной $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, 10^{-2} c^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-3} c^{-1} . Более предпочтительно, антитело согласно на-

стоящему изобретению может называться связывающим IAPP и/или proIAPP или их фрагмент, вариант или специфическую конформацию со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$), меньшей или равной $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, 10^{-4} c^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$, или 10^{-5} c^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$, 10^{-6} c^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-7} c^{-1} .

Связывающая молекула, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, описанное в настоящем документе, может называться связывающей IAPP и/или proIAPP или их фрагмент, вариант или специфическую конформацию со скоростью ассоциации ($k(\text{on})$), большей или равной $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Более предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению может называться связывающим IAPP и/или proIAPP или их фрагмент, вариант или специфическую конформацию со скоростью ассоциации ($k(\text{on})$), большей или равной $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, или $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

Говорят, что связывающая молекула, например, антитело, конкурентно ингибирует связывание референсного антитела с данным эпитопом, если оно преимущественно связывается с эпитопом так, что оно до определенной степени блокирует связывание референсного антитела с указанным эпитопом. Конкурентное ингибирование можно определить любым способом, известным в данной области техники, например, с помощью конкурентного твердофазного ИФА. Можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание референсного антитела с данным эпитопом, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 60% или, по меньшей мере, на 50%.

В настоящем документе термин "сродство" (аффинность) относится к мере силы связывания отдельных эпитопов с CDR связывающей молекулы, например, молекулы иммуноглобулина; см., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) на с. 27-28. В настоящем документе термин "авидность" относится к общей стабильности комплекса между популяцией иммуноглобулинов и антигеном, т.е. силе функционального объединения смеси иммуноглобулина с антигеном; см., например, Harlow на с. 29-34. Авидность связана как со сродством отдельных молекул иммуноглобулина в популяции к определенным эпитопам, так и с валентностью иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между двухвалентным моноклональным антителом и антигеном с повторяющейся структурой эпитопа, например, полимером, будет характеризоваться высокой авидностью. Сродство или авидность антитела к антигену можно определить экспериментально с помощью любого подходящего способа; см., например, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), и способы, описанные в настоящем документе. Общие методики для измерения сродства антитела к антигену включают ИФА, РИА и поверхностный плазмонный резонанс. Измеренное сродство взаимодействия конкретных антитела и антигена может варьироваться при различных условиях, например, концентрации солей, pH. Таким образом, измерение сродства и других параметров связывания с антигеном, например, K_d , IC_{50} , предпочтительно производят с применением стандартизованных растворов антитела и антигена и стандартизованного буфера.

Кроме того, связывающие молекулы, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению можно описать или определить с точки зрения их перекрестной реакционной способности. В настоящем документе термин "перекрестная реакционная способность (реактивность)" относится к способности антител, специфичного к одному антигену, реагировать со вторым антигеном; мера родства между двумя различными антигенными веществами. Таким образом, антитело является перекрестно реактивным, если оно связывается с эпитопом, отличающимся от эпитопа, индуцировавшего его образование. Перекрестно реактивный эпитоп обычно содержит большое количество комплементарных структурных элементов, аналогичных элементам индуцировавшего эпитопа и в некоторых случаях фактически может соответствовать антителу лучше, чем оригинал.

Например, некоторые антитела обладают некоторой степенью перекрестной реактивности в том смысле, что они связывают похожие, но не идентичные эпитопы, например, эпитопы с по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 55% и по меньшей мере 50% идентичностью (рассчитанной с применением способов, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе) по отношению к референсному эпитопу. Можно сказать, что антитело обладает небольшой или не обладает перекрестной реакционной способностью, если оно не связывает эпитопы с менее чем 95%, менее чем 90%, менее чем 85%, менее чем 80%, менее чем 75%, менее чем 70%, менее чем 65%, менее чем 60%, менее чем 55% и менее чем 50% идентичностью (рассчитанной с применением способов, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе) по отношению к референсному эпитопу. Антитело можно считать "высокоспецифичным" к определенному эпитопу, если оно не связывает никакие аналоги, ортологи или гомологи указанного эпитопа.

Кроме того, связывающие молекулы, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению можно описать или указать с точки зрения их сродства связывания с IAPP и/или proIAPP. Предпочтительное сродство связывания включает связывание с константой диссоциации или K_d менее $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, 10^{-2} M , $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, 10^{-3} M , $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, 10^{-4} M , $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, 10^{-5} M ,

5×10^{-6} М, 10^{-6} М, 5×10^{-7} М, 10^{-7} М, 5×10^{-8} М, 10^{-8} М, 5×10^{-9} М, 10^{-9} М, 5×10^{-10} М, 10^{-10} М, 5×10^{-11} М, 10^{-11} М, 5×10^{-12} М, 10^{-12} М, 5×10^{-13} М, 10^{-13} М, 5×10^{-14} М, 10^{-14} М, 5×10^{-15} М или 10^{-15} М.

Как указывалось ранее, субъединичная структура и трехмерная конфигурация константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В настоящем документе термин "домен V_H " включает N-концевой варибельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, а термин "домен СН1" включает первый (наиболее близкую к N-концу) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен СН1 примыкает к домену V_H и находится со стороны N-конца от шарнирной области тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина.

В настоящем документе термин "домен СН2" включает участок молекулы тяжелой цепи, который распространяется, например, примерно от остатка 244 до остатка 360 антитела согласно обычным схемам нумерации (остатки 244-360, система нумерации по Kabat; и остатки 231-340, система нумерации ЕС; см. Kabat EA et al., op. cit). Домен СН2 уникален в том смысле, что он не связан с другим доменом в значительной степени. Вместо этого между двумя доменами СН2 интактной нативной молекулы IgG встроены две разветвленные N-связанные углеводные цепи. Кроме того, хорошо описано, что домен СН3 распространяется от домена СН2 до C-конца молекулы IgG и содержит примерно 108 остатков.

В настоящем документе термин "шарнирная область" включает участок молекулы тяжелой цепи, соединяющий домен СН1 с доменом СН2. Указанная шарнирная область содержит примерно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям самостоятельно двигаться. Шарнирные области можно разделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены; см. Roux et al, J. Immunol. 161 (1998), 4083-4090.

В настоящем документе термин "дисульфидная связь" включает ковалентную связь между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиоловую группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиоловой группой. В наиболее распространенной в природе молекуле IgG области СН1 и СL соединены дисульфидной связью, а две тяжелые цепи соединены двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих положениям 239 и 242 согласно системе нумерации по Kabat (положения 226 и 229 по системе нумерации ЕС).

В настоящем документе термины "соединенный", "гибридный" и "слитый" используются взаимозаменяемо. Эти термины относятся к объединению двух или более элементов или компонентов любыми средствами, включая химическую конъюгацию или рекомбинантные средства. Термин "соединение с сохранением рамки считывания" относится к объединению двух или более открытых рамок считывания (ORF) с образованием непрерывной удлиненной ORF при поддержании правильной рамки считывания исходной ORF при трансляции. Таким образом, рекомбинантный гибридный белок является единым белком, содержащим два или большее число сегментов, соответствующих полипептидам, кодируемым исходными ORF (при этом указанные сегменты обычно не объединяются в природе таким образом). Хотя таким образом получают непрерывную рамку считывания на всем протяжении объединенных сегментов, указанные сегменты могут быть физически или пространственно разделены, например, последовательностью линкера, встроенной без нарушения рамки считывания. Например, полинуклеотиды, кодирующие CDR варибельной области иммуноглобулина, могут быть объединены без нарушения рамки считывания, но разделены полинуклеотидом, кодирующим по меньшей мере одну каркасную область иммуноглобулина или дополнительные области CDR, при условии, что "гибридный" CDR может совместно транслироваться как часть непрерывного полипептида.

Термин "экспрессия" в настоящем документе относится к процессу, в ходе которого ген дает биохимическое соединение, например, РНК или полипептид. Указанный процесс включает любое проявление функционального присутствия гена в клетке, в том числе, без ограничения, нокдаун гена, а также временную экспрессию и стабильную экспрессию. Он включает, без ограничения, транскрипцию гена в матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК), короткую шпилечную РНК (кшРНК), малую интерферирующую РНК (миРНК) или любой другой РНК-продукт и трансляцию мРНК в полипептид(ы). Если окончательный целевой продукт является биохимическим соединением, экспрессия включает получение указанного биохимического соединения и всех его предшественников. Экспрессия гена дает "продукт гена". В настоящем документе продукт гена может быть нуклеиновой кислотой, например, матричной РНК, образованной в результате транскрипции гена, или полипептидом, который транслируется с транскрипта. Продукты генов, описанные в настоящем документе, дополнительно включают нуклеиновые кислоты, подвергавшиеся посттранскрипционным модификациям, например, полиаденилированию, или полипептиды, подвергавшиеся посттрансляционным модификациям, например, метилированию, гликозилированию, добавлению липидов, ассоциации с другими белковыми субъединицами, протеолитическому расщеплению и т.п.

В настоящем документе термин "образец" относится к любому биологическому материалу, полученному от субъекта или пациента. В одном аспекте образец может содержать кровь, перитонеальную жидкость, СМЖ, слюну или мочу. В других аспектах образец может содержать цельную кровь, плазму крови, сыворотку крови, В-клетки, полученные путем обогащения образцов крови, и культивируемые клетки (например, В-клетки субъекта). Образец может также включать биоптат или образец ткани, вклю-

чая нервную ткань. В других аспектах образец может содержать целые клетки и/или лизат клеток. Образцы крови можно получить способами, известными в данной области техники. В одном аспекте осадок может быть ресуспендирован встряхиванием на вортексе при 4°C в 200 мкл буфера (20 mM трис, pH 7,5, 0,5% нонидет, 1 mM ЭДТА, 1 mM ПМСФ, 0,1 M NaCl, ингибитор протеаз IX Sigma Protease Inhibitor и ингибитор фосфатаз IX Sigma Phosphatase Inhibitors 1 и 2) Суспензию можно хранить на льду в течение 20 мин с периодическим встряхиванием на вортексе. После центрифугирования при 15000×g в течение 5 мин при температуре около 4°C аликвоты супернатанта можно хранить при температуре примерно -70 °C.

Заболевания.

Если не указано иное, термины "нарушение" и "заболевание" в настоящем документе используются взаимозаменяемо и включают любые нежелательные физиологические изменения в организме субъекта, животного, изолированном органе, ткани или клетке/клеточной культуре.

При СД2 генетические детерминанты и факторы окружающей среды приводят к развитию резистентности к инсулину с последующим компенсаторным увеличением массы бета-клеток и секреции инсулина и амилина (IAPP) для поддержания нормального уровня глюкозы в крови. Являющиеся следствием этого высокие концентрации амилина способствуют образованию токсичных олигомеров hIAPP и отложению фибрилл hIAPP, обнаруживаемых у более чем 90% пациентов с СД2. Отложение hIAPP коррелирует со снижением количества инсулинпродуцирующих бета-клеток и, предположительно, также играет роль в гибели β-клеток островков поджелудочной железы, трансплантированных лицам с СД1. В настоящей заявке представлены несколько антител человека из пулов здоровых доноров или доноров, страдающих ожирением, с высоким риском СД2, но отсутствием заболевания, клонированных и продуцированных с помощью рекомбинантных методик, как подробно описано ниже.

Однако в одном варианте реализации настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению, связывающие молекулы, обладающие специфичностью, по существу такой же, как у любого из них, полинуклеотиды, векторы или клетки согласно настоящему изобретению применяют для получения фармацевтической или диагностической композиции для профилактического и терапевтического лечения, мониторинга прогрессирования или ответа на лечение и/или диагностики заболеваний из группы сахарного диабета, состоящей из сахарного диабета 1 типа (СД1), гестационного диабета, преддиабета, латентного аутоиммунного диабета взрослых (LADA; диабет 1,5 типа) и/или диабета 2 типа (СД2).

В предпочтительном варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению, связывающие молекулы, обладающие специфичностью, по существу такой же, как у любого из них, полинуклеотиды, векторы или клетки согласно настоящему изобретению применяют для получения фармацевтической или диагностической композиции для профилактического и терапевтического лечения, мониторинга прогрессирования или ответа на лечение и/или диагностики группы нарушений, обычно характеризующихся такими симптомами, как метаболические изменения, предшествующие, вызывающие и/или связанные/ассоциированные с или сопряженные с СД2, включающей заболевания, вызывающие повреждение поджелудочной железы и поэтому способные привести к диабету, включая хронический панкреатит, муковисцидоз, рак поджелудочной железы; при заболеваниях, которые увеличивают риск СД2, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона; и/или при сердечно-сосудистых заболеваниях, связанных или не связанных с ожирением и СД2. В одном предпочтительном варианте реализации симптомы, обычно характерные для указанных выше заболеваний, включают нарушение чувствительности к инсулину и увеличение секреции инсулина и/или hIAPP у субъекта.

В одном варианте реализации группа нарушений, ассоциированная с указанными выше конкретными симптомами, включает гестационный диабет, преддиабет (когда высокое содержание глюкозы в крови не достигает порога СД2 или инсулинрезистентности); метаболический синдром в целом как фактор риска развития диабета или как состояние, которое может существовать до диабета; островковый амилоидоз в целом как фактор риска развития диабета или как состояние, которое может существовать до диабета; ожирение в целом как фактор риска развития диабета или как состояние, которое может существовать до диабета, и/или недостаточность бета-клеток после клинической трансплантации островков поджелудочной железы.

Кроме того, в предпочтительном варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению, связывающие молекулы, обладающие специфичностью, по существу такой же, как у любого из них, полинуклеотиды, векторы или клетки согласно настоящему изобретению применяют для получения композиции для обнаружения измененной, т.е. повышенной или пониженной секреции амилина по сравнению с секрецией амилина у здоровых субъектов при дифференциальной диагностике диабета 1 типа, латентного аутоиммунного диабета взрослых (LADA; диабет 1,5 типа) по сравнению с формами СД2, или при нарушениях, предшествующих явному СД2, например, гестационном диабете или преддиабете; при заболеваниях, вызывающих повреждение поджелудочной железы и поэтому способных привести к диабету, например, хроническом панкреатите, муковисцидозе, раке поджелудочной железы; при заболеваниях, которые увеличивают риск СД2, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона; и/или при сердечно-сосудистых заболеваниях, связанных или не связанных с ожирением и СД2.

Такие нарушения, как ожирение и инсулинорезистентность/гиперинсулинемия, часто наблюдаются как признак предрасположенности или как симптом СД2, который может привести к повышенному уровню циркулирующего островкового амилоидного полипептида (IAPP), опережающего явную форму СД2. Обнаружено, что олигомеры, фибриллы и бляшки амилина (hIAPP) накапливаются не только в пределах поджелудочной железы и почек, но и в сердце у пациентов с ожирением и инсулинорезистентностью. Указанное накопление наблюдали в связи с измененным гомеостазом клеточного Ca^{2+} , что, в свою очередь, может способствовать сердечной дисфункции у таких пациентов.

Поэтому в одном предпочтительном варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению, связывающие молекулы, обладающие специфичностью, по существу такой же, как у любого из них, полинуклеотиды, векторы или клетки согласно настоящему изобретению применяют для получения фармацевтической или диагностической композиции для профилактического и терапевтического лечения, облегчения, мониторинга прогрессирования или ответа на лечение и/или диагностики группы нарушений, наблюдающихся после СД2 или обусловленных метаболическими изменениями, предшествующими и/или вызывающими СД2, т.е. метаболическими изменениями, происходящими при преддиабетическом состоянии, причем данная группа нарушений включает заболевание сердца, инсульты, диабетическую ретинопатию, почечную недостаточность, кетоацидоз и некетогическую гиперосмолярную кому.

Известно более 20 нейродегенеративных нарушений (см., например, табл. 1 на с. 511 в M. Ristow, J. Mol. Med 82 (2004), 510-529), ассоциированных с сахарным диабетом, повышенной инсулинорезистентностью и ожирением, нарушенной чувствительностью к инсулину и избыточной или нарушенной секрецией инсулина. Поэтому в одном варианте реализации настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению, связывающие молекулы, обладающие специфичностью, по существу такой же, как у любого из них, полинуклеотиды, векторы или клетки согласно настоящему изобретению применяют для получения фармацевтической или диагностической композиции для профилактического и терапевтического лечения, мониторинга прогрессирования или ответа на лечение и/или диагностики нейродегенеративных нарушений, включая болезнь Альцгеймера (БА), атаксию-телеангиэктазию (АТ), синдром Барде-Бидля (BBS), атаксию Фридрейха (FRDA), болезнь Хантингтона, миотоническую дистрофию, нарколепсию, болезнь Паркинсона, синдром Прадера-Вилли и синдром Вернера.

Маловероятно, что нарушение переносимости глюкозы вызывает осложнения, характерные для сахарного диабета, однако оно характеризуется более высоким риском возникновения сахарного диабета, чем нормальный тип, что может быть причиной макроваскулярных заболеваний.

"Инсулинорезистентность" означает состояния с пониженной чувствительностью к инсулину. Известно, что инсулин проявляет более широкий спектр эффектов, например, помимо влияния на метаболизм глюкозы, влияет на метаболизм липидов или на кровеносные сосуды и почки. После снижения чувствительности к инсулину могут индуцироваться не только отклонения метаболизма глюкозы, но и метаболические отклонения липидов, например, гипертриглицеридемия, снижение уровня ЛПВП в плазме или гипертензия, как аномалии влияния инсулина на кровеносные сосуды или почки.

В настоящем документе термин "диабетический" (диабетик) по отношению к человеку вообще и в данном случае означает случайную концентрацию глюкозы в плазме или крови ≥ 200 мг/дл ($\geq 11,1$ ммоль/л) или глюкозы в плазме натощак ≥ 126 мг/дл ($\geq 7,0$ ммоль/л) или через 2 ч после нагрузки глюкозой ≥ 200 мг/дл ($\geq 11,1$ ммоль/л) во время теста пероральной переносимости глюкозы. В качестве дополнения или альтернативы, термин "диабетик" используется для субъектов, демонстрирующих один или более из клинических симптомов диабета, включая повышенную жажду (полидипсию), частое мочеиспускание (полиурию), сильный голод, необъяснимую потерю веса, усталость и размытое зрение, уязвимость к медленно заживающим язвам и частые инфекции, включая инфекции мочевого пузыря, влагища и десен и/или области темной кожи (акантокератодермию).

В настоящем документе термин "не диабетический" (не диабетик) по отношению к человеку вообще и в данном случае означает уровень глюкозы в плазме или крови натощак < 100 мг/дл (5,6 ммоль/дл) или через 2 ч после нагрузки глюкозой < 140 мг/дл ($< 7,8$ ммоль/дл) во время теста пероральной переносимости глюкозы.

В настоящем документе термин "преддиабетический" (преддиабетик) по отношению к человеку вообще и в данном случае означает уровень глюкозы в плазме или крови натощак 100-125 мг/дл (5,6-6,9 ммоль/л) или через 2 ч после нагрузки глюкозой 140-199 мг/л (7,8-11,1 ммоль/л) во время теста пероральной переносимости глюкозы. Если не указано иное, термины "преддиабетический", "продромальный" и "предсимптоматический" в настоящем документе используются взаимозаменяемо и описывают доклинические стадии СД2.

В дополнение или в качестве альтернативы, для диагностики диабета у субъекта можно применять уровень гликозилированного гемоглобина (HbA1c). При повышенном уровне HbA1c в области или за пределами порогового значения 6,5% ставят диагноз диабет, т.е. вообще и в данном случае по отношению к человеку используют термин "диабетик", в то время как уровни от 5,7 до 6,4% указывают на высокий риск развития диабета и сердечно-сосудистых заболеваний и являются маркером "преддиабета", или "преддиабетического/предсимптоматического" состояния у человека. Термин "не диабетик" по отноше-

нию к человеку вообще и в данном случае означает, что уровень HbA1c составляет величину ниже порогового значения 5,7%.

Модели сахарного диабета II типа у грызунов при разработке лекарственных препаратов. Примеры общепринятых животных моделей, у которых спонтанно развивается диабет II типа, включают мышей KK-Ay (Nishimura M., *Exp. Anim.* 18, 147-157, 1969), мышей NSY (Ueda H., et al., *Diabetologia* 38, 503-508, 1995), мышей db/db (Hummel K. P., et al., *Science* 153, 1127-1128, 1966), мышей ob/ob (Herberg L. & Kley H. K., *Horm. Metab. Res.* 7, 410-5, 1975) и мышей AKITA (Yoshioka M., et al., *Diabetes* 46, 887-894, 1997).

Среди указанных животных мыши KK-Ay и мыши NSY являются моделями с ожирением, а мыши db/db и мыши ob/ob являются моделями с ожирением, вызванным аномалией рецепторов лептина или продукции лептина. С другой стороны, мыши AKITA являются моделью диабета, вызванного аномалией β -клеток поджелудочной железы.

Примером модели диабета типа II без ожирения у животных на сегодняшний день является модель мыши, описанная в японской патентной заявке № 2004-65181. Эта мышь демонстрирует аномальную секрецию инсулина.

Вместе с тем, антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно проверяют и изучают на трансгенных животных, например, грызунах, экспрессирующих hIAPP, например, крысах, трансгенных по амилину человека в β -клетках поджелудочной железы (крысах HIP), как описано в статьях Butler et al., *Diabetes* 53 (2004), 1509-1516 и Matveyenko and Butler, *Diabetes* 55 (2006), 2106-2114. Более предпочтительно, применяют модель диабета 2 типа у мыши, сверхэкспрессирующей IAPP человека, как описано в статье Matveyenko and Butler (2006), *ILAR J.* 47(3): 225-233, и обобщено в табл. 2 на странице 228 указанного выпуска. Из-за сверхэкспрессии hIAPP у таких животных моделей достоверно воспроизводятся симптомы СД2, например, состояние гипергликемии. В целом термин "гипергликемия" или "состояние гипергликемии" относится к значительно повышенному уровню глюкозы в плазме натощак при двух последовательных измерениях, проведенных через различные промежутки времени и при сравнении с нетрансгенными контрольными однопометными животными. Абсолютные значения, полученные у животных с гипергликемией, могут зависеть от конкретной используемой животной модели, например, у мышей h-IAPP (гемизиготных)/ob/+ \geq ~15-20 мМ глюкозы; у мышей h-IAPP (гомозиготных)/FVB/N \geq ~11 мМ глюкозы.

Способы исследования диабета включают измерение физиологических изменений и анализ крови или плазмы животных с диабетом (диабетиков) по сравнению со здоровыми животными (не диабетиками). Эти измерения включают динамику роста, индекс массы тела (ИМТ), индекс массы нежировых тканей (LMI), потребление пищи и воды, половые различия, уровень глюкозы в крови натощак и при случайном измерении, триглицериды (ТГ), липопротеины, холестерин, массу печени и липиды печени, размер и функцию почек, тест переносимости глюкозы (GTT), тест переносимости инсулина (ГТТ), концентрацию инсулина в крови, морфологию клеток островков поджелудочной железы, диету с высоким содержанием жиров и ограничение калорий, но не ограничиваются ими.

В настоящем документе термины "случайный" и "не натощак" обычно означают в любое время дня или ночи вне зависимости от времени с момента последнего приема пищи.

В настоящем документе термин "натощак" обычно означает отсутствие потребления калорий в течение по меньшей мере 12 ч.

Следует принимать во внимание, что эти определения являются современными принципами, которых в целом придерживаются практикующие врачи, согласно положениям Американской ассоциации диабета (ADA) и Ассоциации диабета Германии (GDA). Принципы могут меняться с течением времени и различаться в зависимости от региона или страны и зависит от группы или учреждения (например, ADA, Всемирная организация здравоохранения, NIDDK/NIH, CDC, GDA и т.д.), готовящих руководящие указания, что известно специалистам в данной области техники. Врачи могут также использовать клинический опыт, медицинский анамнез пациента и/или другую информацию при принятии решения о диагностике и лечении. Таким образом, эти определения могут меняться со временем в соответствии с достижениями в области науки и медицины.

Лечение.

В настоящем документе термины "лечить" или "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, причем их целью является предотвращение или замедление (ослабление) нежелательного физиологического изменения или нарушения, например, развития диабета. Благоприятные или желательные клинические результаты включают облегчение симптомов, ослабление заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшений) болезненного состояния, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), обнаружимые или не обнаружимые, но не ограничиваются ими. "Лечение" также может означать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни в отсутствие лечения. "Те, кто нуждается в лечении", включают лиц, которые уже страдают данным состоянием или нарушением, а также лиц, склонных к

данному состоянию или нарушению, или лиц, у которых следует предотвратить наступление данного состояния или нарушения.

Если не указано иное, термины "лекарственное средство", "лекарство" или "медикамент" в настоящем документе используются взаимозаменяемо и относятся ко всем:

(А) продуктам, лекарствам и препаратам для внутреннего или наружного применения, а также любому веществу или смеси веществ, предназначенному для применения с целью диагностики, излечения, смягчения, лечения или профилактики заболевания у человека или других животных;

(В) продуктам, лекарствам и препаратам (кроме продуктов питания), предназначенным для воздействия на структуру или функцию организма человека или других животных; и

(С) продуктам, предназначенным для применения в качестве компонента любого продукта, указанного в пунктах (А) и (В), но не ограничиваются ими.

Термины "лекарственное средство", "лекарство", или "медикамент" включают полную формулу препарата, предназначенного для применения у человека или других животных, содержащего один или более "агентов", "соединений", "веществ" или "(химических) композиций", а также, в некоторых других ситуациях, другие фармацевтически неактивные вспомогательные вещества, например, наполнители, разрыхлители, смазывающие и скользящие агенты, связующие или агенты, облегчающие транспорт, распад, дезагрегацию, растворение и биологическую доступность "лекарственного средства", "лекарства" или "медикамента" в предполагаемой области-мишени в организме человека или других животных, например, на коже, в желудке или кишечнике. Термины "агент", "соединение" или "вещество" в настоящем документе используются взаимозаменяемо и относятся, в более конкретном контексте, ко всем фармакологически активным агентам, т.е. агентам, вызывающим желательный биологический или фармакологический эффект или исследованным или проверенным на способность вызывать такой возможный фармакологический эффект с помощью способов согласно настоящему изобретению, но не ограничиваются ими.

Под "субъектом" или "индивидом" или "животным" или "пациентом" или "млекопитающим" подразумевается любой субъект, конкретнее, млекопитающее, например, пациент-человек, для которого является желательным получение диагноза, прогноза, профилактики или терапии.

Фармацевтические носители.

Фармацевтически приемлемые носители и пути введения можно взять из соответствующей литературы, известной специалисту в данной области техники. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно составить согласно способам, широко известным в данной области техники; см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472, Vaccine Protocols. 2nd Edition by Robinson et al., Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2003; Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. 2nd Edition by Taylor and Francis (2006), ISBN: 0-8493-1630-8. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают физиологические растворы с фосфатным буфером, воду, эмульсии, например, эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д. Композиции, содержащие такие носители, можно составить с помощью широко известных общепринятых способов. Указанные фармацевтические композиции можно вводить субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций можно осуществить различными способами. Примеры включают введение композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, пероральным, интраназальным, ректальным, наружным, внутрибрюшинным, внутривенным, внутримышечным, подкожным, субдермальным, трансдермальным, интратекальным и внутричерепным путем. Аэрозольные составы, например, назальные спреи, включают очищенные водные или другие растворы активного агента с консервирующими агентами и изотоническими агентами. Такие композиции предпочтительно доводят до pH и изотонического состояния, совместимых со слизистыми оболочками носа. Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтические композиции для перорального введения, например, молекулы однодоменного антитела (например, нанотела ("nanobodiesTM")) и т.д. Такие композиции для перорального применения могут быть в форме таблеток, капсул, порошка, жидкости или в полужидкой форме. Таблетка может содержать твердый носитель, например, желатин или адьювант. Составы для ректального или вагинального введения могут быть представлены в виде суппозитория с приемлемым носителем; см. также O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2(9) (2003), 727-735. Дальнейшие указания относительно составов, пригодных для различных типов введения, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985), и соответствующих обновлениях. Краткий обзор способов доставки лекарств см. в статье Langer, Science 249 (1990), 1527-1533.

II. Антитела согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение в целом относится к антителам человека против IAPP и их антигенсвязывающим фрагментам, которые в предпочтительном варианте демонстрируют характеристики иммунологического связывания и/или биологические свойства антител, показанных в примерах. В соответствии с настоящим изобретением моноклональные антитела человека, специфичные по отношению к IAPP и/или proIAPP, клонировали из пула здоровых субъектов-людей.

В ходе экспериментов, проведенных в соответствии с настоящим изобретением, антитела в кондиционированной среде культур В-клеток памяти человека подвергали параллельному скринингу на связывание с агрегированным олигомерным, фибриллярным и/или не фибриллярным белком IAPP и/или pro-IAPP и бычьим сывороточным альбумином (БСА). Клонирование антител проводили только для культур В-клеток, положительных по отношению к агрегированному белку IAPP и/или proIAPP, но не к БСА.

Благодаря этой мере удалось выделить несколько антител. Выбранные антитела дополнительно анализировали для определения класса и подкласса легкой цепи. Затем выбранные соответствующие транскрипты антител из культур В-клеток памяти транскрибировали с помощью ОТ-ПЦР, клонировали и встраивали в экспрессирующие векторы для рекомбинантной продукции; см. прилагаемые примеры. Рекомбинантная экспрессия антител человека в клетках НЕК293 или СНО и последующее изучение их специфичности связывания по отношению к белку IAPP и/или proIAPP человека (фиг. 3 и 4; пример 1), и их характерное связывание с патологически агрегированными формами указанных белков (фиг. 5; пример 2) подтвердили, что впервые клонированы антитела человека, высокоспецифичные к белку IAPP и/или proIAPP и явным образом распознающие патологически агрегированные формы белка IAPP и/или proIAPP, например, фибриллы IAPP. Второй цикл экспериментов подтвердил приведенные выше результаты, как показано на фиг. 7-9 и в примере 4. Кроме того, химерные антитела мыши, полученные в соответствии с настоящим изобретением и включающие CDR-домены антител человека согласно настоящему изобретению, продемонстрировали сродство связывания с IAPP человека, равное сродству антител человека, как показано на фиг. 11 и 12 и в примере 6.

Таким образом, настоящее изобретение относится к выделенному природному моноклональному антителу человека против островкового амилоидного полипептида (IAPP) и его связывающим фрагментам, производным и вариантам. В одном варианте реализации изобретения антитело способно связывать IAPP и/или proIAPP человека.

В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к антителу против IAPP и/или pro-IAPP или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производному, где антитело специфически связывается с тем же эпитопом IAPP, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.11B12, NI-203.205F8, NI-203.9B3, NI-203.19F2 и NI-203.15C7. Картирование эпитопов выявило последовательность в IAPP человека, содержащую аминокислоты 19-SSNNFGA-25 (SEQ ID NO: в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-203.19H8 согласно настоящему изобретению, последовательность в IAPP человека, содержащую аминокислоты 2-SSNNFGA-8 (SEQ ID NO: в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-203.26C11 согласно настоящему изобретению, последовательность в IAPP человека, содержащую аминокислоты 10-QRLANFLVHS-19 (SEQ ID NO: 71) в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-203.15C7 согласно настоящему изобретению (см. фиг. 5A и 5B и пример 3). Таким образом, в одном варианте реализации предложено антитело согласно настоящему изобретению, причем указанное антитело специфически связывает эпитоп IAPP, содержащий аминокислотную последовательность SSNNFGA (SEQ ID NO: 4), CNTATCA (SEQ ID NO: 5) или QRLANFLVHS (SEQ ID NO: 71). Как подробно описано в примере 3, эпитопы рекомбинантных антител NI-203.9A2, NI-203.8E3 и NI-203.19F2 против IAPP не выявлены до настоящего момента, что указывает на то, что эти антитела, вероятно, связывают нелинейные эпитопы.

Кроме того, в одном варианте реализации настоящее изобретение относится к антителу против IAPP и/или proIAPP или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производному, где антитело специфически связывается с тем же эпитопом proIAPP, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из антител NI-203.1D10, NI-203.2A11, NI-203.10C4, NI-203.20H9, NI-203.26D2, NI-203.60H3 и NI-203.26C11.

Кроме того, вне связи с исходными экспериментальными наблюдениями, как показано в примере 4 и на фиг. 7, моноклональные антитела человека NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.8E3 против IAPP согласно настоящему изобретению предпочтительно характеризуются специфическим связыванием с патологическими агрегатами IAPP (в данном примере фибриллами), а не преимущественным распознаванием IAPP в физиологической форме в поджелудочной железе. То же самое ожидается и для моноклональных антител человека NI-203.19F2 и NI-203.15C7 против IAPP. Соответственно, в настоящем изобретении представлен набор антител человека против IAPP и/или proIAPP со специфичностью связывания, особенно полезной для диагностических и терапевтических целей. Так, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложены антитела, способные специфически связывать патологически агрегированные формы IAPP и/или proIAPP (см. фиг. 5 и 7-9 и примеры 2 и 4). Дополнительные подробности и сводный обзор по отношению к специфичности связывания согласно настоящему изобретению см. также на фиг. 7 и 8 и в описании, приведенном ниже.

В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению проявляет связывающие свойства типичных антител NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2 и NI-203.15C7, описанные в примерах. В качестве дополнения или альтернативы, антитело против IAPP и/или proIAPP согласно настоящему изобретению предпочтительно распознает патологически агрегированные IAPP и/или proIAPP, например, фибриллы IAPP, а не физиологические мономеры IAPP и/или proIAPP,

особенно при анализе в соответствии с примерами 2-4. Так, в одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению по существу не распознает физиологический IAPP. Термин "по существу не распознает", при его использовании в настоящей заявке для описания сродства связывания молекулы из группы, включающей антитело, его фрагмент или связывающую молекулу, с конкретной молекулой-мишенью, антигеном и/или конформацией молекулы-мишени и/или антигена означает, что молекула вышеупомянутой группы связывает указанную молекулу, антиген и/или конформацию со сродством связывания, по меньшей мере в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз или в 9 раз меньшим, чем константа диссоциации (K_D) молекулы указанной выше группы при связывании другой молекулы, антигена и/или конформации. В предпочтительном варианте термин "по существу не распознает", при его использовании в настоящей заявке означает, что молекула вышеупомянутой группы связывает указанную молекулу, антиген и/или конформацию со сродством связывания, по меньшей мере в 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз, 1000 раз или в 10000 раз меньшим, чем константа диссоциации (K_D) указанной молекулы указанной выше группы при связывании другой молекулы, антигена и/или конформации. В качестве дополнения или альтернативы, антитело против IAPP и/или proIAPP согласно настоящему изобретению связывается с болезнетворными агрегированными формами IAPP и/или proIAPP человека, в частности, формами, описанными в примере 4. В данном контексте характеристики связывания могут находиться в диапазоне, характерном для типичных антител NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.8E3, как показано на фиг. 4 и соответственно на фиг. 5, т.е. характеризоваться полумаксимальной эффективной концентрацией (EC_{50}) от примерно 1 пм до 500 нм, предпочтительной EC_{50} от примерно 10 пМ до 100 нМ, наиболее предпочтительной EC_{50} от примерно 100 пМ до 50 нМ для IAPP человека, как показано для NI-203.19H8, или EC_{50} от примерно 100 мкм до 10 нМ для IAPP человека, как показано для NI-203.9A2, NI-203.26C11 и NI-203.8E3. В данном контексте экспериментальные результаты, представленные в примере 4 и показанные на фиг. 4 и соответственно на фиг. 5, также указывают, что в дополнение или в качестве альтернативы некоторые из антител против IAPP согласно настоящему изобретению по существу не распознают proIAPP, как показано для типичных антител NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.8E3. Так, в одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению по существу не распознает proIAPP.

В качестве дополнения или альтернативы антитело против IAPP согласно настоящему изобретению специфически связывает, помимо зрелого IAPP, форму предшественника IAPP, т.е. также и proIAPP, в частности, как описано в примере 1. В данном контексте характеристики связывания могут находиться в диапазоне, характерном для типичного антитела NI-203.26C11, как показано на фиг. 3 и соответственно на фиг. 4, т.е. характеризоваться полумаксимальной эффективной концентрацией (EC_{50}) от примерно 1 пм до 500 нм, предпочтительной EC_{50} от примерно 10 пМ до 400 нМ, более предпочтительной EC_{50} от примерно 100 пМ до 400 нМ или от примерно 100 пМ до 300 нМ, наиболее предпочтительной EC_{50} от примерно 1 до 300 нМ для агрегированного pro-IAPP, как показано для NI-203.26C11.

В качестве дополнения или альтернативы антитело против IAPP согласно настоящему изобретению специфически связывает зрелый IAPP и не связывает или по существу не связывает форму предшественника IAPP, т.е. proIAPP, в частности, как описано в примере 1. В этом контексте характеристики связывания могут находиться в диапазоне, показанном для типичных антител NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.8E3 на фиг. 4 и соответственно на фиг. 5, и указанном выше.

В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению проявляет связывающие свойства примеров антител NI-203.1D10, NI-203.2A11, NI-203.10C4, NI-203.20H9, NI-203.26D2 и NI-203.60H3, связывающих proIAPP предпочтительно по сравнению с proIAPP. В то же время, посредством скрининга антител, специфически связывающихся с N-концевой фланкирующей областью proIAPP, отсутствующей в IAPP, были получены антитела против proIAPP так как есть некоторые доказательства роли proIAPP, не подвергавшегося процессингу по N-концу, а не полноразмерного пептида proIAPP, в образовании амилоида и гибели клеток. Поэтому в одном варианте реализации антитело против proIAPP согласно настоящему изобретению, например, типичные антитела NI-203.1D10, NI-203.2A11, NI-203.10C4, NI-203.20H9, NI-203.26D2 и NI-203.60H3, не связывает или по существу не связывает IAPP.

Некоторые очищенные антитела связываются с широким спектром биомолекул, например, белков. Специалисту будет понятно, что термин "специфический" используется в настоящем документе с целью указания на то, что другие биомолекулы, не являющиеся белками IAPP и/или proIAPP или их фрагментами, по существу не связываются с антигенсвязывающей молекулой, например, одним из антител согласно настоящему изобретению. В предпочтительном варианте уровень связывания биомолекулы, не являющейся IAPP и/или proIAPP, приводит к сродству связывания составляющему самое большее 20% или менее, 10% или менее, 5% или менее, 2% или менее, или 1% или менее (т.е. по меньшей мере в 5, 10, 20, 50 или 100 раз меньшему) от сродства к IAPP и/или proIAPP, соответственно; см., например, пример 1 и фиг. 3. Кроме того, антитела против IAPP и/или proIAPP согласно настоящему изобретению, специфически связываются с агрегатами IAPP и/или proIAPP, что подтверждено экспериментами, демонстрирующими, что антитела согласно настоящему изобретению не распознают патологический амилоид A β в головном мозге человека при болезни Альцгеймера и обладают лишь минимальной способностью к перекрестному связыванию с несколькими белками-кандидатами со склонностью к неправильному фол-

дингу/агрегации, что показано для примеров антител NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 на парафинизированных срезах головного мозга пациента с диагнозом "болезнь Альцгеймера" и в прямых экспериментах на основе твердофазного ИФА; см. пример 5 и фиг. 10. Таким образом, в одном варианте реализации предложено антитело согласно настоящему изобретению, по существу не распознающее пептид амилоид- β (A_{1-42}).

В одном варианте реализации антитело против IAPP и/или proIAPP согласно настоящему изобретению предпочтительно связывается преимущественно с агрегированными формами IAPP и/или proIAPP, фибриллами и/или олигомерами IAPP и/или proIAPP; см. результаты экспериментов на основе прямого твердофазного ИФА в примере 2, и результаты, полученные на поджелудочной железе пациентов с диагнозом "СД2" и на поджелудочной железе кошек-диабетиков посредством иммуногистохимического окрашивания, описанные в примере 4 и показанные на фиг. 7 и 9, соответственно. В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению преимущественно связывает агрегированные формы IAPP и/или proIAPP, причем агрегаты содержат, состоят по существу из или состоят из фибриллярных форм и/или фибриллярных олигомеров IAPP. В еще одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению преимущественно связывает агрегированные формы IAPP и/или proIAPP, причем агрегаты содержат, состоят по существу из или состоят из нефибриллярных форм и/или нефибриллярных олигомеров IAPP. В еще одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению преимущественно связывает агрегированные формы IAPP и/или proIAPP, причем агрегаты содержат, состоят по существу из или состоят из фибриллярных или нефибриллярных форм IAPP и/или proIAPP и/или фибриллярных и нефибриллярных олигомеров IAPP и/или proIAPP. В еще одном варианте реализации антитело против IAPP и/или proIAPP согласно настоящему изобретению предпочтительно связывается как с нативным, так и с патологически агрегированными формами IAPP и/или proIAPP; см. экспериментальные результаты, представленные в примере 2 и 3 и полученные с помощью прямого твердофазного ИФА.

Как упоминалось ранее, агрегаты, содержащие IAPP и/или proIAPP, также связаны с отложениями амилоида в островках поджелудочной железы пациентов с СД2. Таким образом, в одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению можно применять при лечении СД2.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производному, где антитело содержит антигенсвязывающий домен, идентичный домену антитела, выбранного из группы, состоящей из NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.11B12, NI-203.205F8, NI-203.9B3, NI-203.19F2, NI-203.15C7, NI-203.1D10, NI-203.2A11, NI-203.10C4, NI-203.20H9, NI-203.26D2 и NI-203.60H3.

Кроме того, в настоящем изобретении представлены несколько таких связывающих молекул, например, антител и их связывающих фрагментов, связывающая область, например, связывающий домен которых может содержать по меньшей мере одну гипервариабельную область комплементарности (CDR) вариабельной области V_H или V_L , содержащую любую из аминокислотных последовательностей, изображенных на фиг. 1 или 2. Соответствующие нуклеотидные последовательности, кодирующие вышеуказанные вариабельные области, приведены ниже в табл. II и соответственно в табл. III. Типичные наборы CDR указанных аминокислотных последовательностей области V_H и/или V_L изображены на фиг. 1 и 2. Однако, как обсуждается далее, специалист в данной области техники хорошо знает, что в качестве дополнения или альтернативы можно применять CDR, аминокислотная последовательность которых отличается от последовательностей, представленных на фиг. 1 и соответственно на фиг. 2 на одну, две, три или даже более аминокислот в случае CDR2 и CDR3. Таким образом, в одном варианте реализации представлено антитело согласно настоящему изобретению или IAPP- и/или proIAPP-связывающий фрагмент, вариабельная область которых содержит по меньшей мере один гипервариабельный участок (CDR), показанную на фиг. 1, и/или один или большее число CDR, содержащих одну или более аминокислотную замену.

В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению является одним из антител, содержащих аминокислотную последовательность области V_H или V_L , показанную на фиг. 1, или область V_H и/или V_L , содержащую одну или более аминокислотную замену. В предпочтительном варианте для антитела согласно настоящему изобретению характерно сохранение родственного соединения тяжелой и легкой цепи, как в В-клетках человека.

В альтернативном варианте антитело согласно настоящему изобретению является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, производным или вариантом, конкурирующим за связывание с IAPP и/или proIAPP с по меньшей мере одним из антител, содержащим область V_H или V_L , показанную на фиг. 1.

Экспериментальные результаты, представленные в примере 4, показывают, что некоторые антитела против IAPP и/или proIAPP согласно настоящему изобретению связываются с болезнетворными агрегированными формами IAPP и/или proIAPP человека предпочтительнее, чем с физиологическими формами данных белков. Так, в одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению распознает агрегаты IAPP и/или proIAPP предпочтительнее, чем физиологические IAPP и/или proIAPP. Кроме того, в одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению распознает агрегаты

IAPP, содержащие олигомеры и/или фибриллы IAPP, предпочтительнее, чем физиологические IAPP. В еще одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению распознает агрегаты IAPP, содержащие нефибриллярный IAPP и/или нефибриллярные олигомеры IAPP, предпочтительнее, чем физиологический IAPP.

Как уже указывалось ранее, показано, что некоторые из антител согласно настоящему изобретению способны связывать как IAPP, так и его предшественник - proIAPP. Кроме того, некоторые из антител согласно настоящему изобретению выделены из пациентов-людей из-за их способности связывать proIAPP. Таким образом, в одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может связывать proIAPP.

Таким образом, в качестве дополнения или альтернативы к вышесказанному, в одном варианте реализации представлено антитело согласно настоящему изобретению или IAPP- и/или proIAPP-связывающий фрагмент, переменная область которых содержит по меньшей мере одну гипервариабельную область (CDR), показанную на фиг. 2, и/или одну или несколько CDR, содержащих одну или более аминокислотную замену.

В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению является одним из антител, содержащих аминокислотную последовательность области V_H или V_L , показанную на фиг. 2, или область V_H и/или V_L , содержащую одну или более аминокислотную замену. В предпочтительном варианте для антитела согласно настоящему изобретению характерно сохранение родственного соединения тяжелой и легкой цепи, как в В-клетках человека.

В альтернативном варианте антитело согласно настоящему изобретению является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, производным или вариантом, конкурирующим за связывание с IAPP и/или proIAPP с по меньшей мере одним из антител, содержащим область V_H или V_L , показанную на фиг. 2.

Антитело согласно настоящему изобретению может быть антителом человека, в частности, для терапевтического применения. В альтернативном варианте антитело согласно настоящему изобретению является антителом грызуна, родентизированным или химерным антителом грызуна-человека, предпочтительно антителом мыши, муринизированным или химерным антителом мыши-человека, или антителом крысы, ратинизированным или химерным антителом крысы-человека, которые особенно полезны для диагностических способов и исследований на животных. В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению является химерным антителом грызуна-человека или родентизированным антителом.

Кроме того, в одном варианте реализации химерное антитело согласно настоящему изобретению проявляет связывающие свойства примеров химерных антител мыши NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11, описанные в примерах. Кроме того, химерные антитела мыши согласно настоящему изобретению связываются с фибриллами IAPP человека с высоким сродством, как описано в примере 6. В предпочтительном варианте средство связывания химерных антител близко к средству их аналогов - антител человека. В этом контексте характеристики связывания могут находиться в диапазоне, показанном для типичных химерных антител мыши NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11, при EC_{50} , равной 18,6, 23,9 и 11,5 нМ, соответственно, как описано в примере 6 и показано на фиг. 11 и в табл. С в настоящем документе. Связывания с БСА не наблюдали.

В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению получают из культур одно- или олигоклональных В-клеток, которые культивируют и подвергают супернатант культуры, содержащий антитела, продуцированные указанными В-клетками, скринингу на предмет из присутствия и средства антител против IAPP и/или proIAPP в нем. Процесс скрининга включает скрининг на предмет связывания с нативными мономерами, фибриллярными или нефибриллярными агрегатоподобными олигомерами hIAPP, происходящими от синтетического полноразмерного пептида hIAPP с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1; и/или отдельный и независимый скрининг на предмет связывания с синтетическим пептидом, происходящим от proIAPP человека (N-концевого фрагмента) с аминокислотной последовательностью TPIESHQVEKRCNTATCATQR, представленной SEQ ID NO: 7.

В качестве дополнения или альтернативы, процесс скрининга на предмет наличия и средства антител против IAPP и/или proIAPP может включать этапы анализа иммунореактивности (TAIR) чувствительной ткани амилоидных бляшек, например, описанные в международной заявке WO2004/095031, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки, выполнявшиеся в данном исследовании по аналогии с амилоидными отложениями в островках поджелудочной железы. В качестве дополнения или альтернативы, можно выполнить скрининг на срезах поджелудочной железы на предмет связывания с IAPP и/или proIAPP, как описано по аналогии в международной заявке WO2008/081008 для срезов головного и спинного мозга.

Как упомянулось выше, поскольку моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению образуется в ходе иммунного ответа у человека, оно должно распознавать эпитопы, которые имеют особое патологическое значение и которые могут быть недоступны или менее иммуногенны при процессах иммунизации для получения, например, моноклональных антител мыши и скрининга библио-

тек фагового дисплея *in vitro*, соответственно. Соответственно, разумно предположить, что эпитоп антитела человека против IAPP и/или proIAPP согласно настоящему изобретению является уникальным, и других антител, способных связываться с эпитопом, распознаваемым моноклональным антителом человека согласно настоящему изобретению, не существует; см. также фиг. 5А и фигуру, на которой показан уникальный эпитоп антитела NI-203.19H8 и соответственно антитела NI-203.26C11 согласно настоящему изобретению. Еще одним свидетельством уникальности антител согласно настоящему изобретению является тот факт, что, как указано в примере 3, антитела NI-203.9A2 и NI-203.8E3 согласно настоящему изобретению связывают предполагаемые конформационные эпитопы агрегатов IAPP, которые, как указывалось выше, имеют особое патологическое значение и также могут быть недоступны при получении антител обычными способами, например, иммунизацией или скринингом библиотеки *in vitro*.

Таким образом, в одном варианте реализации настоящее изобретение также включает антитела против IAPP и IAPP-связывающие молекулы в целом, которые конкурируют с моноклональным антителом человека согласно настоящему изобретению за специфическое связывание с IAPP. Конкретнее, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производному, где антитело специфически связывается с тем же эпитопом IAPP, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2 и NI-203.15C7.

Кроме того, в одном варианте реализации настоящее изобретение также включает антитела против IAPP и/или proIAPP и IAPP- и/или proIAPP-связывающие молекулы в целом, которые конкурируют с моноклональным антителом человека согласно настоящему изобретению за специфическое связывание с proIAPP. Таким образом, более конкретно, настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производному, где антитело специфически связывается с тем же эпитопом proIAPP, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-203.1D10, NI-203.2A11, NI-203.10C4, NI-203.20H9, NI-203.26D2, NI-203.60H3 и NI-203.26C11.

В качестве дополнения или альтернативы, настоящее изобретение также распространяется на биспецифические антитела против IAPP и/или proIAPP и IAPP-и/или proIAPP-связывающие молекулы в целом, которые конкурируют с моноклональным антителом человека согласно настоящему изобретению за специфическое связывание как с IAPP, так и с proIAPP. Таким образом, более конкретно, настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производному, где антитело специфически связывается с тем же эпитопом IAPP и proIAPP, что и типичное антитело NI-203.26C11. Таким образом, в свете вышесказанного, в одном варианте реализации настоящее изобретение также относится к антителу или антигенсвязывающей молекуле, которые конкурируют с антителом согласно настоящему изобретению за специфическое связывание с IAPP и/или proIAPP.

Конкуренцию между антителами определяют посредством анализа, в котором исследуемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание референсного антитела с общим антигеном, например, IAPP и/или proIAPP. Известны многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), конкурентный сэндвич-анализ; см. Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; твердофазный прямой биотин-авидиновый ИФА; см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137 (1986), 3614-3619 and Cheung et al., *Virology* 176 (1990), 546-552; твердофазный прямой анализ с использованием меток, твердофазный прямой сэндвич-анализ с использованием меток; см. Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); твердофазный прямой РИА с использованием I^{125} в качестве метки; см. Morel et al., *Molec. Immunol.* 25 (1988), 7-15 и Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32 (1990), 77-82. Как правило, такой анализ предполагает использование очищенного IAPP и/или proIAPP и его агрегатов, например, олигомеров и/или фибрилл, связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих любой из указанных антигенов, немеченого тестируемого иммуноглобулина и меченого референсного иммуноглобулина, т.е. моноклонального антитела человека согласно настоящему изобретению. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками, в присутствии тестируемого иммуноглобулина. Обычно тестируемый иммуноглобулин присутствует в избытке. В предпочтительном варианте анализ конкурентного связывания выполняют в условиях, описанных для твердофазного ИФА в прилагаемых примерах. Антитела, идентифицированные путем конкурентного анализа (конкурирующие антитела) включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и референсные антитела, и антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, достаточно близким к эпитопу, связываемому эталонным антителом, для возникновения стерических препятствий. Обычно, если конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно ингибирует специфическое связывание референсного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50 или 75%. В связи с этим, настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производному, где антитело конкурентно ингибирует связывание референсного антитела, выбранного из группы, состоящей из NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2 и NI-203.15C7, с IAPP.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производному, где антитело конкурентно ингибирует связывание референсного

антитела, выбранного из группы, состоящей из NI-203.1D10, NI-203.2A11, NI-203.10C4, NI-203.20H9, NI-203.26D2, NI-203.60H3 и NI-203.26C11, с proIAPP.

Кроме того, в качестве дополнения или альтернативы, настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производному, где антитело конкурентно ингибирует связывание референсного антитела, например, типичного антитела NI-203.26C11, с IAPP и/или proIAPP.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), где по меньшей мере одна из V_H -CDR вариабельной области тяжелой цепи, или по меньшей мере две из V_H -CDR вариабельной области тяжелой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны аминокислотным последовательностям референсных V_H -CDR I, V_H -CDR2 или V_H -CDR3 тяжелой цепи антител, описанных в настоящем документе. В альтернативном варианте участки V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 V_H по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны аминокислотным последовательностям референсных V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 тяжелой цепи антител, описанных в настоящем документе. Таким образом, согласно данному варианту реализации, вариабельная область тяжелой цепи согласно изобретению содержит полипептидные последовательности V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, относящиеся к группам, показанным на фиг. 1 или 2, соответственно. Хотя на фиг. 1 и 2 показаны V_H -CDR, заданные по системе Kabat, другие определения CDR, например, V_H -CDR, заданные по системе Chothia, также входят в настоящее изобретение, и специалист в данной области техники может легко выявить их с использованием данных, представленных на фиг. 1 и 2.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), в котором участки V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 содержат полипептидные последовательности, идентичные группам V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, показанным на фиг. 1 или 2, соответственно.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), в котором участки V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 содержат полипептидные последовательности, идентичные группам V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, показанным на фиг. 1 или 2, соответственно, за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти или шести аминокислотных замен в любой V_H -CDR. В некоторых вариантах реализации аминокислотные замены являются консервативными.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения представлен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина (V_L), где по меньшей мере один из V_L -CDR вариабельной области легкой цепи, или по меньшей мере две из V_L -CDR вариабельной области легкой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны аминокислотным последовательностям референсных V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3 легкой цепи антител, описанных в настоящем документе. В альтернативном варианте области V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 V_L по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны аминокислотным последовательностям референсных V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 легкой цепи антител, описанных в настоящем документе. Таким образом, согласно данному варианту реализации, вариабельная область легкой цепи согласно изобретению содержит полипептидные последовательности V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, относящиеся к полипептидам, показанным на фиг. 1 или 2, соответственно. Хотя на фиг. 1 и 2 показаны V_L -CDR, заданные по системе Kabat, другие определения CDR, например, V_L -CDR, заданные по системе Chothia, также входят в настоящее изобретение.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения представлен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина (V_L), в котором области V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 содержат полипептидные последовательности, идентичные группам V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, показанным на фиг. 1 или 2, соответственно.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения представлен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (V_L), в котором области V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 содержат полипептидные последовательности, идентичные группам V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, показанным на фиг. 1 или 2, соответственно, за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти или шести аминокислотных замен в любой V_L -CDR. В некоторых вариантах реализации аминокислотные замены являются консервативными.

Иммуноглобулин или его кодирующая кДНК могут быть дополнительно модифицированы. Таким образом, дополнительный вариант реализации настоящего изобретения включает любой из этапов получения химерного антитела, мураинизированного антитела, одноцепочечного антитела, Fab-фрагмента, биспецифического антитела, гибридного антитела, меченого антитела или аналога любого из них. Соответствующие способы известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). Если производные указанных антител получают с помощью методики фагового дисплея, для повышения эффективности фаго-

вых антител, связывающихся с тем же эпитопом, что и любое из описанных антител, можно использовать поверхностный плазмонный резонанс, например, реализованный в системе BIAcore (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). Получение химерных антител описано, например, в международной заявке WO89/09622. Способы получения гуманизированных антител описаны в, например, европейской заявке EP-A1 0239400 и международной заявке WO90/07861. Дополнительные источники антител для применения в соответствии с настоящим изобретением представляют собой так называемые ксеногенные антитела. Общий принцип получения ксеногенных антител, например, антител, подобных антителам человека, в организме мыши описан, например, в международных заявках WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 и WO 96/33735. Как обсуждалось выше, антитела согласно изобретению могут существовать в различных формах, помимо полных антител; в том числе, например, в виде Fv, Fab и F(ab)₂, а также одиночной цепи; см., например, международную заявку WO88/09344. Таким образом, в одном варианте реализации представлено антитело согласно настоящему изобретению, выбранное из группы, состоящей из одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv), F(ab')₂-фрагмента, F(ab)-фрагмента и F(ab')₂-фрагмента.

Антитела согласно настоящему изобретению или их соответствующую(ие) иммуноглобулиновую(ые) цепь(и) можно дополнительно модифицировать с помощью обычных способов, известных в данной области техники, например, с помощью делеции(й), инсерции(й), замен(ы), добавления(й) и/или рекомбинации(й) аминокислот или любых других модификаций, известных в данной области техники, по отдельности или в комбинации. Способы внесения таких модификаций в последовательность ДНК, лежащую в основе аминокислотной последовательности иммуноглобулиновой цепи, хорошо известны специалистам в данной области техники; см., например, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. и Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Модификации антитела согласно изобретению включают химическую или ферментативную модификацию по одной или нескольким составляющим аминокислотам, включая модификации боковой цепи, модификации каркаса и N- и C-концевые модификации, в том числе ацетилирование, гидроксילирование, метилирование, амидирование и присоединение углеводных или липидных групп, кофакторов и т.п. Аналогичным образом, настоящее изобретение охватывает получение химерных белков, содержащих описанное антитело или какой-либо его N-концевой фрагмент, присоединенный к гетерологичной молекуле, например, иммуностимулирующему лиганду по C-концу; соответствующие технические подробности см., например, в международной заявке WO00/30680.

Кроме того, настоящее изобретение охватывает пептиды, в том числе пептиды, содержащие связывающие молекулы, описанные выше, например, содержащие участок CDR3 варибельной области любого из указанных антител, в частности, CDR3 тяжелой цепи, поскольку часто наблюдалось, что CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) является участком с повышенной степенью изменчивости и преобладающим участием во взаимодействии антиген-антитело. Такие пептиды можно легко синтезировать или получить рекомбинантными средствами для получения связывающего агента, пригодного к применению согласно изобретению. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области техники. Пептиды можно синтезировать, например, с помощью автоматизированных синтезаторов пептидов, доступных для приобретения.

Пептиды также можно получить с использованием рекомбинантных методик путем внедрения ДНК, экспрессирующей пептид, в экспрессирующий вектор, и трансформации клеток экспрессирующим вектором с целью продукции пептида.

Таким образом, настоящее изобретение относится к любой связывающей молекуле, например, антителу или его связывающему фрагменту, ориентированному на антитела человека против IAPP и/или proIAPP согласно настоящему изобретению и обладающему упомянутыми свойствами, т.е. специфически распознающему IAPP и/или proIAPP. Специфичность и сродство связывания таких антител и связывающих молекул можно проверять с помощью твердофазного ИФА и иммуногистохимических методик, как описано в настоящем документе, см., например, примеры. Указанные характеристики антител и связывающих молекул также можно проверять посредством вестерн-блоттинга. Предварительные результаты последовательных экспериментов, проведенных в соответствии с настоящим изобретением, показали, что антитело человека против IAPP и/или proIAPP согласно настоящему изобретению, в частности, антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.8E3 были способны по-разному связываться с IAPP-фибриллами при твердофазном ИФА. Кроме того, показано, что антитела 203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 согласно настоящему изобретению преимущественно связываются с патологическими структурами в организме человека, например, крупными амилоидоподобными отложениями в островках поджелудочной железы, соответствующими патологическим фибриллам IAPP, согласно визуализации с окрашиванием ThioS и Конго красным (см. фиг. 7A). Ожидается, что аналогичные свойства применимы к антителам NI-203.19F2 и NI-203.15C7.

Антитела человека NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 продемонстрировали выраженное окрашивание островков поджелудочной железы на амилоид-положительных срезах, но не продемонстрировали окрашивания островков поджелудочной железы пациента с СД2 при отсутствии амилоидных отложе-

ний и от контрольного пациента без диагноза "СД2" (см. пример 4 и фиг. 7). Антитела согласно настоящему изобретению также дали положительные результаты на поджелудочной железе кошек с диабетом с признаками островкового отложения амилоида; см. фиг. 9. Эта специфичность связывания с патологическими формами IAPP и/или proIAPP в тканях человека и животных в дополнение к биохимическим экспериментам, показанным в настоящем документе (см. пример 2 и фиг. 5) подчеркивает возможность применения антител согласно настоящему изобретению в лечении и диагностике заболеваний, связанных с появлением агрегированных IAPP и/или proIAPP в поджелудочной железе.

В качестве альтернативы получению иммуноглобулинов непосредственно из культуры В-клеток или В-клеток памяти, клетки можно использовать как источник реаранжированных (перестроенных) локусов тяжелых и легких цепей для последующей экспрессии и/или генетических манипуляций. Реаранжированные гены антител можно получить путем обратной транскрипции соответствующих мРНК с получением кДНК. При желании можно обменять константную область тяжелой цепи на константную область другого изотипа или полностью удалить ее. Можно соединить переменные области с целью кодирования областей одноцепочечного Fv. Можно соединить несколько областей Fv для придания способности связывания более чем одной мишени или использовать комбинации химерной тяжелой и легкой цепи. После получения генетического материала несложно выполнить конструирование описанных выше аналогов, сохраняющих способность связывать желательную мишень. Способы клонирования переменных областей антител и получения рекомбинантных антител известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в Gilliland et al., *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20; Doenecke et al., *Leukemia* 11 (1997), 1787-1792.

После получения соответствующего генетического материала и, при необходимости, его модификации с целью кодирования аналога, кодирующие последовательности, в том числе последовательности, кодирующие как минимум переменные области тяжелой и легкой цепи, можно встроить в системы экспрессии, содержащиеся в векторах, которыми можно трансфицировать стандартные рекомбинантные клетки-хозяева. Можно использовать целый ряд таких клеток-хозяев; в то же время для эффективного процессинга предпочтительны клетки млекопитающих. Типичные линии клеток млекопитающих, пригодные для данной цели, включают клетки CHO, клетки HEK293 или клетки NSO, но не ограничиваются ими.

Затем выполняют продукцию антител или аналогов путем культивирования модифицированных рекомбинантных хозяев в условиях культивирования, подходящих для роста клеток-хозяев и экспрессии кодирующих последовательностей. Затем выделяют антитела путем их выделения из культуры. Системы экспрессии предпочтительно конструируют, внедряя в них сигнальные пептиды, чтобы полученные антитела выделялись в среду; однако возможна и внутриклеточная продукция.

В соответствии с вышесказанным, настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему антитело или эквивалентную связывающую молекулу согласно настоящему изобретению, причем, в случае антитела, предпочтительно по меньшей мере переменную область иммуноглобулиновой цепи описанного выше антитела. Обычно указанная переменная область, кодируемая полинуклеотидом, содержит по меньшей мере один гиперпеременная участок (CDR) домена V_H и/или V_L переменной области указанного антитела.

Для специалиста в данной области техники очевидно, что переменный домен антитела, содержащего описанный выше переменный домен, можно использовать для конструирования других полипептидов или антител с желательной специфичностью и биологической функцией. Таким образом, настоящее изобретение также охватывает полипептиды и антитела, содержащие по меньшей мере один CDR описанного выше переменного домена, и обладающие по существу теми же или аналогичными связывающими свойствами, как и антитело, описанное в прилагаемых примерах. Специалисту в данной области техники известно, что сродство связывания можно усилить путем аминокислотных замен в CDR, или в гиперпеременных петлях (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917), которые частично перекрываются с CDR, определяемых по Kabat; см., например, Riechmann, et al., *Nature* 332 (1988), 323-327. Таким образом, настоящее изобретение также относится к антителам, в которых одна или более из указанных CDR содержит одну или более (предпочтительно не более двух) аминокислотную замену. В предпочтительном варианте одна или более иммуноглобулиновых цепей антитела согласно изобретению содержит два или все три CDR переменной области, заданной на фиг. 1 или, соответственно, на фиг. 2.

Связывающие молекулы, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению, как известно специалистам в данной области техники, могут содержать константную область, опосредующую одну или большее число эффекторных функций. Например, связывание C1-компонента комплемента с константной областью антитела может активировать систему комплемента. Активация комплемента играет важную роль в опсонизации и лизисе патогенных клеток. Активация комплемента также стимулирует воспалительный ответ, а также может быть вовлечена в механизм аутоиммунной гиперчувствительности. Кроме того, антитела связываются с рецепторами различных клеток через Fc-область, причем сайт связывания Fc-рецептора в Fc-области антитела связывается с Fc-рецептором (FcR) на поверхности клетки. Существует несколько Fc-рецепторов, которые являются специфическими для различных классов антител, в том числе IgG (гамма-рецепторы), IgE (эпси-

лон-рецепторы), IgA (альфа-рецепторы) и IgM (мю-рецепторы). Связывание антитела с Fc-рецепторами на поверхности клеток запускает ряд важных и разнообразных биологических реакций, в том числе поглощение и разрушение частиц, покрытых антителами, выведение иммуннокомплексов, лизис покрытых антителами клеток-мишеней клетками-киллерами (так называемую антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность, или ADCC), высвобождение медиаторов воспаления, плацентарный перенос и контроль продукции иммуноглобулина.

Соответственно, некоторые варианты реализации настоящего изобретения включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, в котором по меньшей мере часть одного или большего числа доменов константной области удалена или иным образом модифицирована с целью обеспечить желательные биохимические характеристики, например, ослабление эффекторных функций, способность к нековалентной димеризации, увеличение способности к локализации в области агрегации и отложения IAPP и/или proIAPP, снижение времени полужизни в сыворотке или увеличение времени полужизни в сыворотке по сравнению с целым, немодифицированным антителом с приблизительно аналогичной иммуногенностью. Например, некоторые антитела для применения в способах диагностики и лечения, описанных в настоящем документе, являются антителами с делетированным доменом, которые содержат полипептидную цепь, аналогичную тяжелой цепи иммуноглобулина, но в которой отсутствует по меньшей мере часть одного или нескольких доменов тяжелой цепи. Например, в некоторых антителах полностью делетирован один домен константной области модифицированного антитела, например, полностью или частично делетирован домен CH2. В других вариантах реализации некоторые антитела для применения в способах диагностики и лечения, описанных в настоящем документе, содержат константную область, например, константную область тяжелой цепи IgG, модифицированную с целью устранения гликозилирования, и далее называются в настоящем документе агликозилированными или "agly"-антителами. Такие "agly"-антитела можно получить с помощью ферментативной обработки, а также инженерии консенсусного сайта(ов) гликозилирования в константной области. Вне связи с теорией, считается, что "agly"-антитела могут характеризоваться улучшенным профилем безопасности и стабильности *in vivo*. Способы получения агликозилированных антител, обладающих желательной эффекторной функцией, можно найти, например, в международной заявке WO2005/018572, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных, описанных в настоящем документе, в Fc-участок можно с помощью методик, известных в данной области техники, внедрить мутацию для ослабления эффекторной функции. Например, делеция или инактивация (за счет точечных мутаций или других средств) домена константной области может ослабить связывание циркулирующего модифицированного антитела с Fc-рецептором, тем самым повышая локализацию IAPP и/или proIAPP. В других случаях модификации константной области, согласующиеся с настоящим изобретением, могут умеренно ослаблять связывание комплемента и тем самым снижать время полужизни в сыворотке и неспецифическое связывание конъюгированного цитотоксина. Другие модификации константной области можно использовать для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных групп, которые обеспечивают расширенную локализацию за счет повышенной специфичности к антигену или гибкости антитела. Полученный физиологический профиль, биодоступность и других биохимические эффекты модификаций, например, локализацию IAPP и/или proIAPP, биораспределение и время полужизни в сыворотке, легко измерить и количественно оценить с помощью хорошо известных иммунологических методик без излишнего экспериментирования.

Fc-участок некоторых антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных, описанных в настоящем документе, можно мутировать или обменять на альтернативную белковую последовательность с целью усиления поглощения антител клетками, например, путем активизации рецептор-опосредованного эндоцитоза антител за счет Fcγ-рецепторов, LRP или рецепторов Thy1 или посредством "технологии суперантител", которая, как утверждается, позволяет антителам проникать в живые клетки, не повреждая их (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241). Например, с помощью методик, известных в данной области техники, можно сконструировать гибридные белки связывающей области антитела и родственных белковых лигандов рецепторов поверхности клетки или би- или полиспецифических антител с определенной последовательностью, связывающиеся с IAPP и/или proIAPP, а также с рецептором клеточной поверхности.

Fc-участок некоторых антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных, описанных в настоящем документе, можно подвергнуть мутации или заменить на альтернативные белковые последовательности, либо химически модифицировать антитело с целью усиления его способности проходить через гематоэнцефалический барьер.

Модифицированные формы антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных согласно изобретению можно получить из полноразмерного предшественника или исходного антитела с помощью методик, известных в данной области техники. Примеры методик обсуждаются в настоящем документе более подробно. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению могут быть получены или произведены с использованием методик, известных в данной области техники. В некоторых вариантах реализации молекулы антител или их

фрагменты "получают рекомбинантным способом", т.е. получают с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Примеры методик получения молекул антител или их фрагментов подробно описаны в других разделах настоящего документа.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению также включают производные, модифицированные, например, путем ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу таким образом, что ковалентное присоединение не препятствует специфическому связыванию антитела с родственным эпитопом. В качестве примера, но не ограничения, производные антител включают антитела, модифицированные, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пэггилирования, фосфорилирования, амидирования, модификации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Любую из многочисленных химических модификаций можно осуществить с помощью известных методик, включая специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. но не ограничиваясь ими. Кроме того, производное может содержать одну или несколько неклассических аминокислот.

В конкретных предпочтительных вариантах реализации антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению не должны вызывать иммунный ответ, вредоносный для животного, подлежащего лечению, например, человека. В некоторых вариантах реализации связывающие молекулы, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению, получают из организма пациента, например, пациента-человека, и впоследствии применяют для лечения тех же видов, из которых они получены, например, человека, что ослабляет или минимизирует возникновение вредных иммунных реакций.

Для снижения иммуногенности антитела также можно использовать деиммунизацию. В настоящем документе термин "деиммунизация" включает изменение антитела с целью модификации Т-клеточных эпитопов; см, например, международные заявки WO98/52976 и WO00/34317. Например, анализируют последовательности V_H и V_L исходного антитела и "картируют" Т-клеточный эпитоп человека в каждой V-области, показывая расположение эпитопов по отношению к гипервариабельным участкам (CDR) и другим ключевым остаткам последовательности. Отдельные Т-клеточные эпитопы из карты Т-клеточных эпитопов анализируют с целью определения альтернативных аминокислотных замен с низким риском изменения активности конечного антитела. Конструируют ряд альтернативных последовательностей V_H и V_L , содержащих комбинации аминокислотных замен; затем указанные последовательности встраивают в ряд связывающих полипептидов, например, IAPP- и/или proIAPP-специфических антител или их иммуноспецифических фрагментов для применения в способах диагностики и лечения, описанных в настоящем документе, а затем проверяют их функции. Как правило, получают и проверяют 12-24 вариантов антител. Затем полные гены тяжелой и легкой цепей, содержащие модифицированные V-области и C-области человека, клонируют в векторы экспрессии; полученные плазмиды вводят в линии клеток для продуцирования целого антитела. Затем антитела сравнивают посредством соответствующих биохимических и биологических анализов и выявляют оптимальный вариант.

Моноклональные антитела можно получить множеством различных способов, известных в данной области техники, в том числе с использованием гибридомной, рекомбинантной технологии и технологии фагового дисплея или их комбинации. Например, моноклональные антитела можно получить с использованием гибридомных технологий, в том числе технологий, известных в данной области техники и описанных, например, в Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981), указанные источники полностью включены в настоящий документ посредством ссылок. Термин "моноклональное антитело", используемый в настоящем документе, не ограничивается антителами, продуцированными посредством гибридомной технологии. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, происходящему от единственного клона, включая любой клон эукариотической, прокариотической клетки или фага, а не к способу, с помощью которого оно получено. Таким образом, термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, продуцированными посредством гибридомной технологии. В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению происходят из В-клеток человека, иммортализованных путем трансформации вирусом Эпштейна-Барр, как описано в настоящем документе.

В общеизвестной гибридомной методике (Kohler et al., *Nature* 256 (1975), 495) относительно короткоживущие, или "смертные", лимфоциты млекопитающих, например, В-клетки, полученные из субъекта-человека, как описано в настоящем документе, объединяют с клетками бессмертной опухолевой линии (например, миеломной клеточной линии), в результате чего получают гибридные клетки или "гибридомы", которые являются бессмертными и способны продуцировать антитело, генетически кодируемое В-клеткой. Полученные гибриды разделяют на генетически однотипные штаммы путем селекции, разбавления и повторного роста, причем каждый отдельно взятый штамм содержит специфические гены для образования единственного антитела. Они продуцируют антитела, которые являются однородными по отношению к желательному антигену и, с учетом их абсолютного генетического родства, называются "моноклональными".

Полученные таким образом клетки гибридомы высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, предпочтительно содержащей одно или более веществ, подавляющих рост или выживание негибридных исходных миеломных клеток. Специалистам в данной области техники понятно, что реагенты, клеточные линии и среды для формирования, отбора и роста гибридом можно приобрести в нескольких источниках, а стандартные протоколы хорошо отработаны. В общем случае культуральную среду, в которой растут клетки гибридомы, тестируют на продукцию моноклональных антител против целевого антигена. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют с помощью анализа *in vitro*, например, иммунопреципитации, радиоиммуноанализа (РИА) или твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), как описано в настоящем документе. После того, как установлено, что клетки гибридомы продуцируют антитела, обладающие целевой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны можно субклонировать, используя способ серийных разведений, и вырастить с помощью стандартных способов (см., например, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp. 59-103 (1986)). Кроме того, следует принимать во внимание, что моноклональные антитела, секретируемые субклонами, можно отделить от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью стандартных процедур очистки, например, гель-фильтрации с белком А, хроматографии на гидроксипапате, гель-электрофореза, диализа или аффинной хроматографии.

В еще одном варианте реализации можно отобрать лимфоциты путем микроманипуляций и выделить вариабельные гены. Например, можно выделить мононуклеарные клетки периферической крови из иммунизированного млекопитающего или млекопитающего с естественным иммунитетом, например, человека, и культивировать их в течение 7 дней *in vitro*. Можно выполнить скрининг культур на специфические IgG, соответствующие критериям скрининга. Можно выделить клетки из положительных лунок. Отдельные Ig-продуцирующие В-клетки можно выделить с помощью FACS или комплемент-опосредуемого анализа гемолитических бляшек. Ig-продуцирующие В-клетки можно отобрать путем микроманипуляций в пробирку и амплифицировать гены V_H и V_L с помощью, например, ОТ-ПЦР. Можно клонировать гены V_H и V_L в векторе для экспрессии антител и трансфицировать в клетки (например, эукариотические или прокариотические клетки) для экспрессии.

В альтернативном варианте можно отобрать и культивировать линии клеток, продуцирующих антитело, с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Такие методики описаны в различных лабораторных руководствах и оригинальных публикациях. В этом отношении методики, пригодные для применения в настоящем изобретении, как описано ниже, описаны в монографии *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки, включая дополнения.

Фрагменты антител, распознающие специфические эпитопы, можно получить с помощью известных методик. Например, Fab- и $F(ab')_2$ -фрагменты можно получить рекомбинантным путем или путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с использованием таких ферментов, как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения $F(ab')_2$ -фрагментов). $F(ab')_2$ -фрагменты содержат вариабельную область, константную область легкой цепи и CH1-домен тяжелой цепи. Такие фрагменты являются достаточными для применения, например, в иммунодиагностических процедурах, включающих связывание иммуноспецифических участков иммуноглобулинов с обнаруживающими реагентами, например, радиоизотопами.

Особенно желательно терапевтическое применение антител человека, например, описанных в настоящем документе, у пациентов-людей. Антитела человека согласно настоящему изобретению выделяют, например, из организма здоровых субъектов-людей, у которых из-за их избыточного веса или ожирения может быть подозрение на риск развития метаболического нарушения, например, СД2, или пациентов, страдающих данным нарушением, но с необычно стабильным течением заболевания или необычно легкой формой заболевания. Вместе с тем, выбор здорового человека-субъекта с подозрением на риск развития метаболического нарушения, например, СД2, из организма которого можно выделить антитела, как описано в данном документе, также может быть основан на наличии других рисков, заведомо увеличивающих вероятность развития метаболического нарушения, например, СД2. Указанный риск можно установить на основании обследования индивида на такие факторы риска, связанные с развитием метаболического нарушения, например, СД2, как возраст 45 лет и старше; избыточный вес или ожирение; диабет у близких родственников; происхождение от афроамериканцев, коренных жителей Аляски, американских индейцев, американцев азиатского происхождения, испаноязычных/латиноамериканцев, жителей островов Тихого океана, монголоидов или арабов; гестационный диабет в анамнезе; рождение по меньшей мере одного ребенка весом более 4,5 кг; давление крови 140/90 или выше; повышенный уровень холестерина при, например, уровне липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) ниже 40 мг/дл (соответствует менее 1 ммоль/л), или уровень триглицеридов выше 200-499 мг/дл (соответствует более 2,3-5,6 ммоль/л); малоподвижный образ жизни; диагноз "Синдром поликистозных яичников (СПКЯ)"; диагноз преддиабета при предыдущем обследовании - уровень А1С (также называемого HbA1c или гликогемоглобином) от 5,7 до 6,4 процентов, нарушение уровня глюкозы натощак (IFG), или нарушение перено-

симости глюкозы (IGT); другие диагностированные клинические состояния, ассоциированные с инсулинрезистентностью, например, акантокератодермии; сердечно-сосудистые заболевания в анамнезе.

Хотя разумно ожидать, что в случае использования ожирения или избыточного веса в качестве индикатора развития у лица метаболического заболевания, например, СД2, защитные антитела против IAPP и/или proIAPP будут более стабильно вырабатываться у здоровых субъектов с ожирением и без симптомов заболевания, чем у субъектов с диагностированным меньшим риском, например, субъектов, у которых определяют не ожирение, а избыточный вес или даже нормальный вес, субъектов, относящихся к двум последним группам, также можно использовать в качестве источника антитела человека согласно настоящему изобретению.

Субъектов можно классифицировать как имеющих нормальный вес, избыточный вес или ожирение на основании измерений роста и массы тела субъектов и расчета их индекса массы тела по следующей формуле

$$\text{ИМТ} = \text{вес}[\text{кг}] / (\text{рост}[\text{м}])^2.$$

На основании результатов, субъектов определяют как имеющих нормальный вес (ИМТ 18,5-24,9 кг/м²), избыточный вес (25,0-29,9 кг/м²) или ожирение (≥ 30 кг/м²) на основе действующих критериев Всемирной организации здравоохранения (World Health Organization (2000) "Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation." World Health Organ Tech Rep Ser 894: 1.253). В качестве альтернативы или дополнения можно измерять и окружность талии (WC) субъекта, на основании пороговых значений, зависящих от пола, определяя WC как нормальную (<94 см [$< 34,6$ дюймов] у мужчин и <80 см [31,5 дюймов] у женщин), умеренно увеличенную (94-102 см [34,6-40 дюймов] у мужчин и 80-88 см [31,5-35 дюймов] у женщин), или увеличенную (≥ 102 см [≥ 40 дюймов] у мужчин и ≥ 88 см [≥ 35 дюймов] у женщин), как описано в InterAct Consortium, Langenberg et al., PLoS Med. 2012 Jun;9(6): e1001230, причем защитные антитела против IAPP и/или proIAPP должны более стабильно вырабатываться у здорового субъекта с увеличенной окружностью талии (увеличенной WC), что соответствует категории "ожирение" (максимальный риск развития СД2); такого субъекта предпочтительно использовать для выделения указанных антител, однако лиц с умеренно увеличенной или нормальной WC также можно использовать для выделения антител против IAPP и/или proIAPP.

В одном варианте реализации антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере один CDR тяжелой или легкой цепи молекулы антитела. В еще одном варианте реализации антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере два CDR из одной или большего числа молекул антитела. В еще одном варианте реализации антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере три CDR из одной или большего числа молекул антитела. В еще одном варианте реализации антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере четыре CDR из одной или большего числа молекул антитела. В еще одном варианте реализации антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере пять CDR из одной или большего числа молекул антитела. В еще одном варианте реализации антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере шесть CDR из одной или большего числа молекул антитела. В настоящем документе описаны типичные молекулы антител, содержащие по меньшей мере один CDR, которую можно включить в рассматриваемые антитела.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть получены любым способом синтеза антител, известным в данной области техники, в частности, путем химического синтеза или, предпочтительно, с помощью методики рекомбинантной экспрессии, как описано в настоящем документе.

В одном варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное согласно изобретению содержит синтетическую константную область с частично или полностью делетированным одним или большим числом доменов ("антитело с делетированным доменом"). В некоторых вариантах реализации совместимые модифицированные антитела включают конструкторы или варианты с делетированным доменом, в которых полностью удален домен CH2 (ACH2-конструкторы). В других вариантах реализации делетированный домен может быть замещен коротким соединительным пептидом для обеспечения гибкости и свободы движения вариабельной области. Специалистам в данной области техники очевидно, что такие конструкторы особенно предпочтительны из-за регуляторного влияния CH2-домена на скорость катаболизма антитела. Конструкторы с делетированным доменом можно получить с использованием вектора, кодирующего константный домен IgG₁ человека, см., например, международные заявки WO02/060955 и WO02/096948A2. Конструкция этого вектора предусматривает делецию CH2-домена и получение синтетического вектора, экспрессирующего константную область IgG₁ с делетированным доменом.

В некоторых вариантах реализации антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению являются миниантителами. Миниантитела можно получить с помощью способов, описанных в данной области техники, см., например, патент США 5837821 или международную заявку WO94/09817.

В одном варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное согласно изобретению содержит тяжелую цепь иммуноглобулина с делецией или заменой нескольких или даже одной аминокислоты при условии, что это допускает ассоциацию мономерных субъ-

диниц. Например, мутации одиночной аминокислоты в выбранных областях СН2-домена может быть достаточно для существенного ослабления Fc-связывания и, таким образом, усиления локализации IAPP и/или proIAPP. Аналогичным образом, может быть желательным простое удаление части одного или более доменов константной области, контролирующей эффекторную функцию (например, связывание комплекса), подлежащую регуляции. Такие частичные делеции константных областей могут улучшить выбранные характеристики антитела (время полужизни в сыворотке), оставляя другие желательные функции, связанные с исследуемым доменом константной области, в неизменном состоянии. Кроме того, как упоминалось выше, константные области описанных антител можно синтезировать посредством мутации или замены одной или нескольких аминокислот, что улучшает профиль полученного конструктора. В этом отношении возможно нарушение активности, обеспечиваемой консервативным сайтом связывания (например, Fc-связывания) при сохранении по существу конфигурации и иммуногенного профиля модифицированного антитела. Некоторые другие варианты реализации могут включать добавление одной или нескольких аминокислот к константной области для улучшения желательных характеристик, например, эффекторной функции или обеспечения более выраженного присоединения к цитотоксину или углеводу. В таких вариантах реализации может быть желательна инсерция или репликация специфических последовательностей, полученных из выбранных доменов константной области.

В настоящем изобретении также предложены антитела, содержащие, состоящие по существу из или состоящие из вариантов (включая производные) молекул антител (например, областей V_H и/или V_L), описанных в настоящем документе, причем указанные антитела или их фрагменты иммуноспецифически связываются с IAPP и/или proIAPP. Для внедрения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, можно использовать стандартные методики, известные специалистам в данной области техники, включая сайт-специфический мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, которые приводят к аминокислотным заменам, но не ограничиваясь ими. В предпочтительном варианте варианты (в том числе производные) кодируют менее 50 аминокислотных замен, менее 40 аминокислотных замен, менее 30 аминокислотных замен, менее 25 аминокислотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 аминокислотных замен, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен, или менее 2 аминокислотных замен по сравнению с референсной областью V_H , V_H -CDR1, V_H -CDR2, V_H -CDR3, областью V_L , V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3. "Консервативная аминокислотная замена" является заменой, при которой аминокислотный остаток заменяют другим аминокислотным остатком, содержащим боковую цепь с аналогичным зарядом. В данной области техники существуют определения семейств аминокислотных остатков, содержащих боковые цепи с аналогичными зарядами. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Кроме того, мутации можно внедрить случайным образом на протяжении всей кодирующей последовательности или ее части, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученных мутантов можно подвергать скринингу на биологическую активность с целью выявления мутантов, сохраняющих активность (например, способность связывать IAPP и/или proIAPP).

Например, можно внедрить мутации только в каркасные области или только в CDR-участке молекулы антитела. Введенные мутации могут быть молчащими или нейтральными миссенс-мутациями, например, не оказывать влияния или оказывать незначительное влияние на способность антитела связывать антиген; фактически, некоторые из таких мутаций вообще не изменяют аминокислотную последовательность. Указанные типы мутаций могут быть полезны для оптимизации кодонов или улучшения продукции антител гибридомой. Кодон-оптимизированные области кодирующие антитела согласно настоящему изобретению, описаны в других разделах настоящего документа. В альтернативном варианте не нейтральные миссенс-мутации могут изменять способность антитела связывать антиген. Большинство молчащих и нейтральных миссенс-мутаций, вероятно, располагаются в каркасных областях, в то время как большинство не нейтральных миссенс-мутаций, вероятно, располагаются в CDR, хотя это не является обязательным требованием. Специалист в данной области техники может разработать и протестировать мутантные молекулы с желательными свойствами, например, отсутствием изменений антигенсвязывающей активности или изменениями связывающей активности (например, улучшением антигенсвязывающей активности или изменением специфичности антител). После мутагенеза кодируемый белок можно экспрессировать обычными способами и определить функциональную и/или биологическую активность кодируемого белка (например, способность иммуноспецифически связывать по меньшей мере один эпитоп IAPP и/или proIAPP) с использованием методик, описанных в настоящем документе, или обычных методик модификации, известных в данной области техники.

III. Полинуклеотиды, кодирующие антитела.

Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, может содержать любой полирибонуклеотид или полидезоксирибонуклеотид, который может

являться немодифицированной РНК или ДНК или модифицированной РНК или ДНК. Например, полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, может содержать одно- и двухцепочечную ДНК, ДНК, которая является смесью одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечную РНК, и РНК, которая является смесью одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными, или смесью одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, может содержать трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК или как РНК, так и ДНК. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное также может содержать одно или более модифицированных оснований или связей ДНК или РНК-каркаса, модифицированных с целью обеспечения стабильности или по другим причинам. "Модифицированные" основания включают, например, тритилированные основания и нестандартные основания, например, инозин. В ДНК и РНК можно внести целый ряд изменений; таким образом, "полинуклеотид" охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы.

Выделенный полинуклеотид, кодирующий неприродный вариант полипептида, происходящий из иммуноглобулина (например, участок тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина), можно создать путем введения одной или более нуклеотидных замен, добавлений или делеций в нуклеотидную последовательность иммуноглобулина, так что в кодируемый белок внедряются одна или более аминокислотных замен, добавлений или делеций. Мутации можно вводить с помощью стандартных методик, например, сайт-специфического мутагенеза и ПНР-опосредованного мутагенеза. В предпочтительном варианте вводят консервативные аминокислотные замены по одному или более несущественным аминокислотным остаткам.

Как хорошо известно, РНК можно выделить из исходных В-клеток, клеток гибридомы или других трансформированных клеток с помощью стандартных методик, например, экстракции изотиоцианатом гуанидиния и осаждения с последующим центрифугированием или хроматографией. При желании мРНК можно выделить из общей РНК с использованием стандартных методик, например, хроматографии на олиго-dT-целлюлозе. Подходящие методики хорошо известны в данной области техники. В одном варианте реализации можно получить к ДНК, кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела одновременно или по отдельности с использованием обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы в соответствии с известными способами. Можно запустить ПЦР с использованием праймеров консенсусной константной области или более специфических праймеров на основе опубликованных последовательностей ДНК и аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепи. Как обсуждалось выше, ПЦР также можно использовать для выделения клонов ДНК, кодирующих легкую и тяжелую цепи антитела. В этом случае можно провести скрининг библиотек с использованием консенсусных праймеров или крупных гомологичных зондов, например, зондов к константным областям человека.

ДНК обычно плазмидную ДНК, можно выделить из клеток с использованием методик, известных в данной области техники, подвергнуть рестрикуционному картированию и секвенированию в соответствии со стандартными, хорошо известными методиками, подробно изложенными, например, в указанных выше источниках, относящихся к методикам рекомбинантных ДНК. Разумеется, ДНК может быть синтетической согласно настоящему изобретению в любой момент в ходе выделения или последующего анализа.

В данном контексте настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему по меньшей мере связывающий домен или вариабельную область иммуноглобулиновой цепи антитела согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации настоящего изобретения представлен выделенный полинуклеотид, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), где по меньшей мере один из CDR вариабельной области тяжелой цепи, или по меньшей мере два из V_H -CDR вариабельной области тяжелой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны аминокислотным последовательностям референсных V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3 тяжелой цепи антител, описанных в настоящем документе. В альтернативном варианте участки V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3 V_H по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны аминокислотным последовательностям референсных V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 тяжелой цепи антител, описанных в настоящем документе. Таким образом, согласно данному варианту реализации, вариабельная область тяжелой цепи согласно изобретению содержит полипептидные последовательности V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, относящиеся к полипептидным последовательностям, показанным на фиг. 1, или соответственно содержит полипептидные последовательности V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, относящиеся к полипептидным последовательностям, показанным на фиг. 2.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложен выделенный полинуклеотид, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), где по меньшей мере один из V_L -CDR вариабельной области легкой цепи, или по меньшей мере два из V_L -CDR вариабельной области легкой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны аминокислотным последовательностям референсных V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3 легкой цепи антител, описанных в настоящем документе. В альтернатив-

ном варианте участки V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3 V_L по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны аминокислотным последовательностям референсных V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 легкой цепи антител, описанных в настоящем документе. Таким образом, согласно данному варианту реализации, переменная область легкой цепи согласно изобретению содержит полипептидные последовательности V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, относящиеся к полипептидным последовательностям, показанным на фиг. 1, или соответственно содержит полипептидные последовательности V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, относящиеся к полипептидным последовательностям, показанным на фиг. 2.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения представлен выделенный полинуклеотид, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), в котором участки V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 содержат полипептидные последовательности, идентичные группам V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, показанным на фиг. 1 или, соответственно, идентичны группам V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, показанным на фиг. 2.

Как известно в данной области техники, "идентичность последовательности" между двумя полипептидами или двумя полинуклеотидами определяют путем сравнения аминокислотной или нуклеотидной последовательности одного полипептида или полинуклеотида с последовательностью второго полипептида или полинуклеотида. Как обсуждается в настоящем документе, то, что какой-либо конкретный полипептид по меньшей мере приблизительно на 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% идентичен другому полипептиду, можно определить с помощью способов и компьютерных программ/программного обеспечения, известных в данной области техники, например, программы BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711), но не ограничиваясь ей. Для поиска наилучшего сегмента гомологии между двумя последовательностями BESTFIT использует алгоритм локальной гомологии из Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489. При использовании BESTFIT или любой другой программы для выравнивания последовательностей с целью определения того, является ли определенная последовательность, например, на 95% идентичной референсной последовательности в соответствии с настоящим изобретением, параметры устанавливают, разумеется, таким образом, чтобы рассчитать процент идентичности по всей длине референсной полипептидной последовательности и чтобы в гомологии были допустимы пробелы не более 5% от общего количества аминокислот в эталонной последовательности.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения полинуклеотид содержит, состоит по существу из или состоит из нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотидную последовательность области V_H или V_L антитела против IAPP и/или proIAPP, как показано в табл. II или III. В связи с этим специалисту в данной области техники понятно, что полинуклеотиды, кодирующие по меньшей мере переменный домен легкой и/или тяжелой цепи, могут кодировать переменный домен обеих или только одной иммуноглобулиновой цепи. Таким образом, в одном варианте реализации полинуклеотид содержит, состоит по существу из или состоит из нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотидную последовательность области V_H и V_L антитела против IAPP и/или proIAPP, как показано в табл. II, или последовательность области V_H и V_L антитела против IAPP и/или proIAPP, как показано в табл. III.

Таблица II. Нуклеотидные последовательности
области V_L и V_H антител против IAPP

Антитело	Нуклеотидные последовательности варибельной области тяжелой (VH) и легкой цепи (VL/VK)
NI-203.9A2-V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG TCCCTGAGGCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACGTTTTAGCACSTTT GCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT TCAACTATTAGTGGTAGTGGTGATAATACATACTATGCAGACTCCCTG AAGGGCCGGTTCCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACACTATAT CTGCAAGTGAACAGCCTGAGACCCGAGGACACGGCCGTTTTATTACTGT GCGAAAAGTCCCTCGTCACTTCTGGCCACCTACTTTGACTACTGGGGC CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 11
NI-203.9A2-V _K	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA GACAGAGTCAACATCACTTGCCTGGCCAGTGGAGATTAATAGCTGG TTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAAGCTCCTGATC TATAAGGCGTCTAGTTTACAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGC AGTGGATCTGGGACAGAATTCATCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT GATGATTTTGAACCTTATTACTGCCAACAGCACAAATAGTTATTGGACG TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAA SEQ ID NO: 13
NI-203.19H8-V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGACG TCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGGTTACCTTCAGCAGTTAT GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTG GCAATTTATATGGTATGATGGAAGTAAGGAATATTATGCAGACTCCCTG AAGGGCCGAGTCAACATCTCCAGAGACAATCCGAGAACACTCTCTAT CTGCAACTGCACACCCCTGAGAGTTCGAGGACACGGCTGTGTATTCTGT GCGAGGACAATCGCATCGGCCACCGTGGACCACGGTATGGACGTCTGG GGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 15
NI-203.19H8-V _K	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCTTCCGTCCTGTCTGCATCTGTAGGA GACAGAGTCAACATCACTTGTCCGGGAGTCAAGATATTAGCACCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAGACACCAGGAAAGCCCTAACCTCCTGATC TTTGGAGCATCGAGGTTGCAAAGTGGGGTCTCACCAGGTTTCAGCGGC AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT GAAGATTTTGAACCTTACTATTGTCAACAGACTAACAAATTTCCCTCCC ACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA AA SEQ ID NO: 17
NI-203.26C11-V _H	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGATTGGTGAAGCCTTCTCAG ACCCTGTCCCTCACCTGCACGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGT AATTACTACTGGACCTGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAG TGGATTGGGCATATCTATTCCAGTGGGACCACCAATTACAACCCCTCC CTCGAGAGTTCGAGTCAACATTTTCAGTAGACACGTCCAAGAACAGTTC TCCCTGAGCCTGAACTCTGTGACCCCGCAGACACGGCCGTTTATTAC TGTGCGAGACCACTGGCTACAGTTCGGGATGCTTTTAATATCTGGGGC CAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG SEQ ID NO: 19
NI-203.26C11-V _K	GAAATTGTGATGACTCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGC GAGAGGGCCACCATCAAGTGCAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGC AATAAGAACTTCTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCT AAATTACTCATTTACTGGGCATCTACTCGGGAATCCGGGGTCCCTGAC CGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC

	AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATTAT AGTAATCCTAACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAAA SEQ ID NO: 21
NI-203.8E3-V _H	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAAACCTGGGTCC TCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGTAGTCAC ACTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGGCAAGGGCTTGGTGGATG GGAGGGATCATCCCCATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTT CAGGACAGAGTCACGGTTACCGCGGACAAATCCACGAATACAGCCTAC ATGGAGTTGAGTAGCCTCAGACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT GCGAAGGGGAACTGGAACCACGAATCCTCTACTACTACGGTATGGAC GTCTGGGGCCGAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 23
NI-203.8E3-V _K	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTTGGGA CAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATACAGT GATGGAAACACCTACTTGAATTGGTTTACCAGAGGCCAGGCCAATCT CCAAGGCGGCTAATTTATAAGGTTTCTAATCGTGACTCTGGGGTCCCA GACAGATTGAGCGGCAGTGGGTGAGGCACTGATTTACACTGAAAATC AGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGGT TCAAATGGCCAGGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAAATCAAA SEQ ID NO: 25
NI-203.11B12-V _H	CAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCC TCAATGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAACTAC TATTTACTGTTGGTGGACAGGCCCTGGACAAGGACTTGGTGGATG GGAATAATCAACCCTAGTGCTGGTAGCACAAGCTACGCACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTAC ATGGAACCTGAGCAGCCTGAAATCTGAAGACACGGCCGTCTATTACTGT GCGAGAGATTCCGCTGGGATACAGATATGGTTTACGGGATGCTTTTGAT ATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG SEQ ID NO: 27
NI-203.11B12-V _L	CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCTGCCTCTGCTTCCCTGGGATCC TCGGTCAAGCTCACCTGCACTCTGAACAGTGGGCACAGTAGCTACACC ATCGCATGGCATCAGCAGCAGCCAGGGAAGGCCCTCGGTACTTGTATG AAGTTGAACATAATGGAAACTACAACAAGGGGAGCGGACTTCTGTAT CGCTTCTCAGGCTCCAGCTCTGGGGCTGACCGCTACCTCGCCATCTCC AACCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTTATTACTGTGAGACCTGGGAC ACTAGCACTAGGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCCTA SEQ ID NO: 29
NI-203.205F8-V _H	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCCGACTGGTGAAGCCTTCGGAG ACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTACTCCGTACAGAGTGGT AGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAG TGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCTCC CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTATATTCC TGTGCGAGAGTCCCTATGGTTACGGATATAGGGGCTACGATGGGGCT TGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 31
NI-203.205F8-V _K	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTAC TTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATC TATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCATCAGCAGCCTAGAGCCT GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACCGGTTCACT

	TTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA SEQ ID NO: 33
NI-203.9B3-V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGGGG TCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCAGGATTCACCTTCAGTAGCTAT GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG GCAGTTATCTGGTATGATGGAACATAAGAAGTACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACACACTCCAGAGACAATTCCAAGAATACGCTGTCT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACTCGGCTGTGTATTACTGT CGGAGAGGCTTTAGCAGCAGCTGGGAGTTTGGGTTCTGGGGCCAGGGA ACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 35
NI-203.9B3-V _L	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAG TCAGTCAACATCTCCTGCACTGGAACACAGCGTTACATTTATGGTTAT AACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCCGGCAAGCCCCAAAGTC ATGATTTATGAGGTCATAAGCGGCCCTCAGGGTCCCTGATCGCTTC TCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTC CAGGCTGAGGATGAGGCTGTTTATTACTGCGCCTCATATGCAGGCAGC ACAATGTAGTATTCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTCTCTA SEQ ID NO: 37
NI-203.19F2-V _H	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGGAAGCCTGGGTCC TCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCAACTTCTTGAGCTAT TCCATCAGTTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG GGAGGGATCATCCCGATCTTTGGTACACCAAACACGACAGAAAGTTC CAAGGAAGAGTCAACAATTACGGCGGACAAATCGACGAGGACAGCCTAC ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATTTGATGACACGGCCGTCTATATTGT CGGATGCGACAAGACCGGGTACAGCAGCCTCTGGTTTCTATTACTAC GGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 63
NI-203.19F2-V _K	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGACACCCTGTCTGTGTCTCCAGGT GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAAGGCTCAGAGTGTAAACAACAAC TTAGCCTGGTTCCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATTCCAGCCAGATTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGTCT GAAGATTTTGCAGTTTATTTCTGTCTCAGCAGAGTCAACAATTGGCCACT TTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA SEQ ID NO: 65
NI-203.15C7-V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGATG TCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACCTAT ACTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG TCATTTATATCATATGATGGAAGGGATAAATACTACGCAGATTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACATGTTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGATGAGGACATGGCTGTGTATTACTGT GCGACTCTGCAAGTATGGCAACTCTACGATTACTACGGAATGGACGTC TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 67
NI-203.15C7-V _L	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAG AAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAAT TATGTATCTTGGTATCAGCAACTCCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTC ATTTATAACAGTGATAAGCGACCCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCT GCCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCAACACCGGCTCCAG ACTGGGACGAGGCGGATTATTACTGCGCAACATGGGATACCAGACTG AGTGTGGGGTATTCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTCTCTT SEQ ID NO: 69

Таблица III. Нуклеотидные последовательности области V_H и V_L антител против ргоIAPP

Антитело	Нуклеотидные последовательности вариабельной области тяжелой (V _H) и легкой цепи (V _L /V _K)
NI-203.1D10-V _H	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCAGAAGTGAAGAAGCCCGGGGAGT CTCTCAGAATCTCCTGTAAGGCTTCTGGATACAGCTTCACCAACTCTTG GATCGCCTGGGTGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTGGACTACGTGGGT ATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAAGTATGGCCCGTCTTCCAAG GCCACGTCACTATCTCAGCCGACAACCTCGCCAACACCGCCTACCTGCA GTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCCGACACCGCCATCTATTATTGTGCGAGA CGGGCAGCAGCGGCTATTAAGTGGTTGACTCCTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 39
NI-203.1D10-V _K	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGTCCGTACCCCTGGAG AGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGCCAGAGCCTCCTGCATCCTAA TGGAAACGACTATTTGGATTGGTACGTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCA CAGATCGTGATCTACATGGGTCTAATCGGGCCGCCGGGTCCCTGACA GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACTGAAAATCAGCAG AGTGGAGCTGAGGATGTTGGGACTTATTAAGTCTGCAAGTCTACGC GGGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGAAATCAAA SEQ ID NO: 41
NI-203.2A11-V _H	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCGTGGTCCAGCCTGGGGGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGCAGTTATGG CATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA TTTGTACGGTATGATGGAAGTAATAAGTACTATGCAGACTCCGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAGTCTGCTCTCTTCA AATGAACAGTCTGAGAACTGAAGACACGGCTGTATATTACTGCGCGAAA GAACAGGAGGACCACAAGGAAGCTTTTACTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 43
NI-203.2A11-V _K	GAAATTTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGG AAAGAGCCACCCTCCTGCAGGGCCAGTCCAGAGAGTTACCACCATAGC CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCAGCAGGGCCACTGATATTCCCGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGT CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGTCTGAAGACTT TGCAGTTTATTACTGTGACAGTATAACCAGTGGCCCTCACTTTCCGGC GGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 45
NI-203.10C4-V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGGAGCCTGGGGCCT CAGTGAGGGTCTCCTGCCAGACATCTGGATACAGCGTCACCGACTACTA TCTACACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATGGGA GTGATGAACCCGAGCAATGGAACCGTGGGCTACCCACAGAAGTTTCAGG GCCGAGTCAACATGACCGCAGACACGTCCACGGGCACAGTGTACATGGT GTTGACCGCCTTACGGCTGGGGACACGGCCGTCTACTACTGTGCCAGA GGCGGGTCCACGCCGGGTGAGGAAGTAAGGAGTCCCACGTCCTTGACC TCTGGGGCCAGGGAACCTGGTACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 47
NI-203.10C4-V _K	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCCTCTCTGTCCGTACCCCTGGAC AGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTGATGAGAGCCTCCTGCATAGTGA TGGAAAGGACCTATTTGTATTGGTATCTACAGAAGCCCGGCCAGCCTCT CAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCTCGGGAGTGCCAAATA GGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCG GGTGGAGGCTGAGGATGTTGGCGTTTATTACTGCATGCAGGGTGTACAC TTTCTCAGACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 49

NI-203.20H9-V _H	CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCT CAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACATCTTCAGTAAACATGG TATCAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGCCCTTGAGTGGATAGGA TGGATCAACACCAATACGGGGAACCCAACATATGCCCAGGACTTCACAG GACGATTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTGACGACGGCATACTGGA GATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGA GAATCAGAGCCGATTTTGGAGTTATCTATTACATGGACGTCTGGGGCA AAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 51
NI-203.20H9-V _K	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAG ACAGCGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGCCAGAGCATAAGCACTAATTT AAATTGGTATCAGAAGAAACCAGGACAAGCCCCTACGGTCTTGATCTAT GCTGCGTCCAGTTTGAAGGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGGGGCCGGG GATCTGGGACATATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTTCAACCTGAAGA TTTGCAACTTATTACTGTCAACACAATTACAATGATTTGTGGACGTTT GGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAA SEQ ID NO: 53
NI-203.26D2-V _H	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGGTTACGTTTCAGAACCTGTGG CATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCA TTGTTCGGTCTGATGGAACCTACTAGATATTACGCAGACTCCCTGATGG GCCGCTTACCATCTCCAGAGACAATTCGAAGAACTCGTGTATCTTCA AATGAACAGTCTGAGACCTGAGGACACGGCTCTTTATTACTGTGCGAGG GAAAAGGAGGATCACAGGGAAGCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 55
NI-203.26D2-V _K	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCTGTCTGTCTCCAGGGG AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGCGTGTAGCACTGTAGC CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGAT GCATCCACCAGGGCCACTGATATCCCGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGT CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCACTCTGCAATCTGAAGACTC TGCAGTTTATTACTGTGACGAGTATAATAGGTGGCCCTCACTTTCGGC GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 57
NI-203.60H3-V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGCACGCCCTGGAGGCT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTGGATTCACTTTCAGTGGTTATGA AATGAATTGGGTCCGCCAGGCACCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTCA TATATTAGCGGTCCCTGGGATGTGATATACTACGCAGACTCTGTGAAGG GCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTTTCTACA GATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTATTGTACGAGA GTCCCCCTGACATCAGCTATGGATTTGATTACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 59
NI-203.60H3-V _K	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTACGAG ACAGCGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCACSTATTT AAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCTAACCTCCTGATCCAT GATACAGACATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCACTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGA TTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCACTTTT GGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 61

Настоящее изобретение также включает фрагменты полинуклеотидов согласно изобретению, описанные в других разделах. Кроме того, изобретение также предусматривает полинуклеотиды, кодирующие гибридные полинуклеотиды, Fab-фрагменты и другие производные, описанные в настоящем документе.

Полинуклеотиды могут быть получены или произведены любым способом, известным в данной области техники. Например, если известна нуклеотидная последовательность антитела, полинуклеотид, кодирующий антитело, можно собрать из химически синтезированных олигонуклеотидов, например, описанных в работе Kutmeier et al., *BioTechniques* 17 (1994), 242, которая, вкратце, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих участки последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование этих олигонуклеотидов, а затем ПЦР-амплификацию лигированных олигонуклеотидов.

В альтернативном варианте полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, можно получить из нуклеиновой кислоты из подходящего источника. Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, недоступен, однако последовательность молекулы антитела известна, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно химически синтезировать или получить из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антитела, или библиотеки кДНК, полученной из, или нуклеиновой кислоты, предпочтительно полиА⁺ РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих IAPP- или proIAPP-специфические антитела, например клеток гибридомы, выбранной для экспрессии антитела) с помощью ПНР-амплификации с использованием синтетических праймеров, гибридуемых с 3'- и 5'-концами последовательности, или путем клонирования с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического в отношении последовательности конкретного выявляемого гена, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, кодирующей антитело. Затем ПЦР-амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в реплицируемых векторах для клонирования с помощью любого способа, общеизвестного в данной области техники.

После определения нуклеотидной последовательности и соответствующей аминокислотной последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, его нуклеотидную последовательность можно подвергать манипуляциям методами манипуляций нуклеотидными последовательностями, хорошо известными в данной области техники, например, методик рекомбинантной ДНК, сайт-специфического мутагенеза, ПЦР и т.д. (см., например, методики, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2^d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) and Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1998), полностью включенные в настоящий документ посредством ссылок), с целью получения антител с различными аминокислотными последовательностями, например, для создания аминокислотных замен, делеций и/или инсерций.

IV. Экспрессия полипептидов антитела.

После манипуляций с выделенным генетическим материалом с целью получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных согласно изобретению полинуклеотиды, кодирующие антитела, обычно встраивают в экспрессирующий вектор для введения в клетку-хозяина, которую можно использовать для продукции желаемого количества антитела. В настоящем документе описана рекомбинантная экспрессия антитела или его фрагмента, производного или аналога, например, тяжелой или легкой цепи антитела, связывающегося с молекулой-мишенью. После получения полинуклеотида, кодирующего молекулу антитела или тяжелую или легкую цепь антитела, или его фрагмент (предпочтительно содержащий вариабельный домен тяжелой или легкой цепи) согласно изобретению, можно получить вектор для получения молекулы антитела с помощью технологии рекомбинантной ДНК и с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, в настоящем документе описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело. Для конструирования экспрессирующих векторов, содержащих последовательности, кодирующие антитела, и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции, можно применять способы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Эти способы включают, например, методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, способы синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Таким образом, в настоящем изобретении предложены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела согласно изобретению или его тяжелую или легкую цепь, или вариабельный домен тяжелой или легкой цепи, функционально связанную с промотором. Такие векторы могут содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, международные заявки WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США № 5122464) и вариабельный домен антитела, который можно клонировать в такой вектор для экспрессии всей тяжелой или легкой цепи.

Термин "вектор" или "экспрессирующий вектор" ("вектор экспрессии") в настоящем документе используется для обозначения векторов, используемых в соответствии с настоящим изобретением в качестве носителя для введения желательного гена в клетку-хозяина и его экспрессии. Как известно специалистам в данной области техники, такие векторы легко выбрать из группы, состоящей из плазмид, фагов, вирусов и ретровирусов. В общем случае векторы, совместимые с настоящим изобретением, должны содержать маркер селекции, соответствующие сайты рестрикции для облегчения клонирования желательного гена и обладать способностью проникать и/или реплицироваться в эукариотических и прокариотических клетках. Для целей настоящего изобретения можно использовать многочисленные векторные системы экспрессии. Например, векторы одного класса используют элементы ДНК, происходящие из вирусов животных, например, папилломавирус крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус коровьей оспы, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV) или вирус SV40. Другие векторы связаны с использованием полицистронных систем с внутренними сайтами связывания рибосом. Кроме того, можно выполнять отбор клеток, в хромосомы которых интегрирована ДНК, за счет внедрения одного или более маркеров, которые позволяют осуществлять отбор трансфицированных клеток-хозяев. Маркер может обеспечить прототрофность для ауксотрофного хозяина, устойчивость к биоцидам (например, антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, например, меди. Ген селективного маркера может быть напрямую присоединен к последовательностям ДНК, подлежащим экспрессии, или внедрен в ту же клетку путем совместной трансформации. Для оптимального синтеза мРНК также могут требоваться дополнительные элементы. Эти элементы могут включать сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, а также промоторы, энхансеры и сигналы терминации транскрипции.

В особенно предпочтительных вариантах клонированные гены вариабельных областей встраивают в экспрессирующий вектор вместе с генами константных областей тяжелой и легкой цепей (предпочтительно человека), как обсуждалось выше. В одном варианте реализации это достигается с помощью патентованного экспрессирующего вектора NEOSPLA, принадлежащего Biogen IDEC, Inc. и описанного в патенте США № 6159730. Этот вектор содержит промотор/энхансер цитомегаловируса, основной промотор бета-глобина мыши, сайт инициации репликации SV40, последовательность полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота, экзоны 1 и 2 неомизинфосфотрансферазы, ген дигидрофолатредуктазы и лидерную последовательность. Обнаружено, что этот вектор позволяет достичь очень высокого уровня экспрессии антител после внедрения генов вариабельных и константных областей, трансфек-

ции в клетки CHO с последующей селекцией в среде, содержащей G418 и амплификации с метотрексатом. Разумеется, в настоящем изобретении можно использовать любой экспрессирующий вектор, способный вызывать экспрессию в эукариотических клетках. Примеры подходящих векторов включают плазмиды pcDNA3, pCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 и pZeoSV2 (доступные в Invitrogen, Сан-Диего, штат Калифорния, США), и плазмиду PCI (доступную в Promega, Мэдисон, штат Висконсин, США), но не ограничиваются ими. В общем случае скрининг большого количества трансформированных клеток для выявления клеток с достаточно высоким уровнем экспрессии тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов является рутинным экспериментом, который можно выполнить, например, с помощью роботизированных систем. Векторные системы также описаны в патентах США 5736137 и 5658570, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Эта система обеспечивает высокие уровни экспрессии, например, >30 пг/клетку/день. Другие типичные векторные системы описаны, например, в патенте США № 6413777.

В других предпочтительных вариантах реализации антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению можно экспрессировать с помощью полицистронных конструктов, например, описанных в публикации заявки на патент США № 2003-0157641 A1, которая полностью включена в настоящий документ. В указанных системах экспрессии множественные продукты исследуемых генов, например, тяжелые и легкие цепи антител, можно продуцировать с одного полицистронного конструкта. Преимуществом указанных систем является использование внутреннего сайта посадки рибосом (IRES) для получения относительно высоких уровней антител. Совместимые последовательности IRES описаны в патенте США № 6193980, который также включен в настоящий документ. Специалистам в данной области техники понятно, что такие системы экспрессии можно использовать для эффективной продукции всего спектра антител, описанных в настоящей заявке. Таким образом, в одном варианте реализации в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере связывающий домен или варибельную область иммуноглобулиновой цепи антитела, необязательно в сочетании с полинуклеотидом, кодирующим варибельную область другой цепи иммуноглобулина указанной связывающей молекулы.

В целом, после получения вектора или последовательности ДНК, кодирующей мономерную субъединицу антитела, экспрессирующий вектор можно внедрить в соответствующую клетку-хозяина. Внедрение плазмиды в клетку-хозяина легко осуществить с помощью стандартных методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Они включают трансфекцию, в том числе липотрансфекцию с использованием, например, Fugene® или липофектамина, слияние протопластов, преципитацию с фосфатом кальция, слияние клеток с ДНК внутри них, микроинъекцию и инфекцию интактным вирусом, но не ограничиваются ими. Как правило, внедрение плазмиды в хозяина осуществляют с помощью стандартного метода с использованием совместной преципитации с фосфатом кальция. Клетки-хозяева, несущие экспрессирующую конструкцию, выращивают в условиях, подходящих для продукции легких и тяжелых цепей, и анализируют на предмет синтеза белка тяжелой и/или легкой цепи. Типичные способы анализа включают твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (РИА) или анализ с помощью сортировщика клеток с активацией флуоресценции (FACS), иммуногистохимический анализ и т.п.

Экспрессирующий вектор переносят в клетку-хозяина с помощью обычных методик, а затем культивируют трансфицированные клетки с помощью обычных методик, что обеспечивает продукцию антитела для использования в способах, описанных в настоящем документе. Таким образом, изобретение включает клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело согласно изобретению или его тяжелую или легкую цепь или по меньшей мере связывающий домен или варибельную область иммуноглобулина, предпочтительно функционально связанный с гетерологичным промотором. В качестве дополнения или альтернативы, настоящее изобретение также включает клетку-хозяина, содержащую вектор, описанный выше в настоящем документе, содержащий полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере связывающий домен или варибельную область иммуноглобулиновой цепи антитела, необязательно в сочетании с полинуклеотидом, кодирующим варибельную область другой цепи иммуноглобулина указанной связывающей молекулы. В предпочтительных вариантах реализации для экспрессии двухцепочечных антител одиночный вектор или векторы, кодирующие как тяжелые, так и легкие цепи, можно совместно экспрессировать в клетке-хозяине с целью экспрессии всей молекулы иммуноглобулина, как описано ниже.

Клетку-хозяина можно совместно трансфицировать двумя экспрессирующими векторами согласно изобретению, причем первый вектор кодирует полипептид, происходящий от тяжелой цепи, а второй вектор кодирует полипептид, происходящий от легкой цепи. Указанные два вектора могут содержать идентичные селективные маркеры, позволяющие осуществлять равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепей. В качестве альтернативы можно использовать единственный вектор, кодирующий полипептиды как тяжелой, так и легкой цепей. В таких ситуациях легкую цепь предпочтительно помещают перед тяжелой цепью, чтобы избежать избытка токсичной свободной тяжелой цепи; см. Proudfoot, Nature 322 (1986), 52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 2197. Кодирующие последовательно тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК.

В настоящем документе термин "клетки-хозяева" относится к клеткам, которые несут векторы, сконструированные с использованием методик рекомбинантных ДНК и кодирующие по меньшей мере один гетерологичный ген. В описании процессов выделения антител из рекомбинантных хозяев термины "клетка" и "культура клеток" взаимозаменяемо используют для обозначения источника антител, если иное не указано в явном виде. Другими словами, выделение полипептида из "клетки" может означать выделение из центрифугированных целых клеток либо из клеточной культуры, содержащей как среду, так и суспендированные клетки.

Для экспрессии молекул антител для применения в способах, описанных в настоящем документе, можно использовать множество векторных систем экспрессии в клетках-хозяевах. Такие системы экспрессии в клетках-хозяевах представляют собой носители, с помощью которых можно продуцировать и очищать исследуемые кодирующие последовательности, а также представляют собой клетки, которые при трансформации или трансфекции соответствующей нуклеотидной кодирующей последовательностью могут экспрессировать молекулу антитела согласно изобретению *in situ*. Указанные системы включают микроорганизмы, например, бактерии (например, *E. coli*, *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантными экспрессирующими векторами на основе ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими последовательности, кодирующие антитела; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами для экспрессии в дрожжах, содержащими последовательности, кодирующие антитела; системы на основе клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, бакуловирусными), содержащими последовательности, кодирующие антитела; системы на основе растительных клеток, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными экспрессирующими векторами (например, Ti-плазмидой), содержащими последовательности, кодирующие антитела; или системы на основе клеток млекопитающих (например, клеток COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3), несущих рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие промоторы, происходящие из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотронеина) или от вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; 7,5K промотор вируса коровьей оспы), но не ограничиваются ими. В предпочтительном варианте для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела применяют бактериальные клетки, например, *Escherichia coli*, а более предпочтительно - эукариотические клетки, особенно для экспрессии полной молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO) в сочетании с вектором, например, основным промежуточным промотором ранних генов цитомегаловируса человека являются эффективной системой экспрессии антител; см., например, Foecking et al., *Gene* 45 (1986), 101; Cockett et al., *Bio/Technology* 8 (1990), 2.

Линия клеток-хозяев для экспрессии белка часто происходит от клеток млекопитающих; специалисты в данной области техники могут определить конкретные предпочтительные линии клеток-хозяев, которые лучше всего подходят для экспрессии продукта желательного гена. Примеры линий клеток-хозяев включают CHO (клетки яичника китайского хомячка), DG44 и DUXB11 (DHFR-отрицательные линии клеток яичника китайского хомячка), HeLa (карцинома шейки матки человека), CV1 (линия клеток почек обезьяны), COS (производное XBN с T-антигеном SV40), VERY, ВНК (клетки почек хомячка), MDCK, WI38, R1610 (фибробласты китайского хомячка) BALBC/3T3 (фибробласты мыши), HAK (линия клеток почек хомячка), SP2/O (миелома мыши), P3X63-Ag3.653 (миелома мыши), BFA-1c1BPT (эндотелиальные клетки крупного рогатого скота), RAJ1 (лимфоциты человека) и 293 (клетки почек человека), но не ограничиваются ими. Особенно предпочтительными являются клетки CHO и 293. Линии клеток-хозяев обычно доступны из коммерческих источников, Американской коллекции тканевых культур или из опубликованной литературы.

Кроме того, можно выбрать штамм клеток-хозяев, модулирующий экспрессию внедренных последовательностей или выполняющий модификацию и процессинг продукта гена специфическим желательным образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут иметь важное значение для функции белка. Различные клетки-хозяева обладают характерными специфическими механизмами посттрансляционного процессинга и модификации белков и продуктов генов. Можно выбрать соответствующие линии клеток или системы хозяев для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессированного чужеродного белка. С этой целью можно использовать эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточными механизмами для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования продукта гена.

Для долгосрочной высокопроизводительной продукции рекомбинантных белков предпочтительна стабильная экспрессия. Например, можно сконструировать линии клеток, стабильно экспрессирующие молекулу антитела. Вместо использования экспрессирующих векторов, содержащих вирусные сайты инициации репликации, можно трансформировать клетки-хозяева ДНК, находящейся под контролем соответствующих элементов, контролирующих экспрессию (например, промотора, энхансерной последовательности, терминаторов транскрипции, сайтов полиаденилирования и т.д.), и селективным маркером.

После внедрения чужеродной ДНК сконструированные клетки можно оставить расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде, а затем перевести на селективную среду. Селективный маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к отбору и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в хромосомы и расти с образованием бляшек, которые, в свою очередь, можно клонировать и разработать на их основе линии клеток.

Этот метод можно с успехом использовать для конструирования клеточных линий, стабильно экспрессирующих молекулу антитела.

Можно использовать ряд систем селекции, в том числе можно использовать гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., *Cell* 11 (1977), 223), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48 (1992), 202) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy et al., *Cell* 22 (1980), 817) в tk-, hgppt- или aprt-клетках, соответственно, но не ограничиваясь ими. Кроме того, можно использовать устойчивость к антиметаболитам в качестве основы для селекции следующих генов: dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler et al., *Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), 357; O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 1527); gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 2072); neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12 (1993), 488-505; Wu and Wu, *Biotherapy* 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 (1993), 573-596; Mulligan, *Science* 260 (1993), 926-932; и Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62 (1993), 191-217; TIB TECH 11 (1993), 155-215; и hygro, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre et al., *Gene* 30 (1984), 147). Способы, общеизвестные в области технологии рекомбинантной ДНК, которые можно использовать для этих целей, описаны в работах Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981), которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылок.

Уровни экспрессии молекулы антитела можно повысить путем амплификации вектора, см. обзор Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987). Если маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, является амплифицируемым, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, увеличит количество копий гена маркера. Поскольку амплифицированная область связана с геном антитела, продукция антител также увеличится; см. Crouse et al., *Mol. Cell. Biol.* 3 (1983), 257.

Продукция *in vitro* допускает масштабирование с целью получения больших объемов желательных полипептидов. Методики культивирования клеток млекопитающих в условиях культивирования тканей известны в данной области техники и включают культивирование в гомогенной суспензии, например, в аэролитном реакторе или в реакторе с непрерывным перемешиванием, либо культивирование иммобилизованных или инкапсулированных клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микрогранулах или керамических картриджах. При необходимости и/или желании растворы полипептидов можно очистить обычными хроматографическими способами, например, гель-фильтрацией, ионообменной хроматографией, хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе или (иммуно-) аффинной хроматографией, например, после преимущественного биосинтеза синтетического полипептида шарнирной области или до или после этапа гидрофобной хроматографии, описанного в настоящем документе.

Гены, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению, также можно экспрессировать в клетках, не являющихся клетками млекопитающих, например, клетках бактерий или насекомых или дрожжей или растений. Бактерии, легко принимающие нуклеиновые кислоты, включают членов семейства Enterobacteriaceae, например, штаммы *Escherichia coli* or *Salmonella*; Bacillaceae, например, *Bacillus subtilis*; Pneumococcus; Streptococcus и *Haemophilus influenzae*. Кроме того, следует принимать во внимание, что при экспрессии в бактериях гетерологичные полипептиды обычно становятся частью телец включения. Гетерологичные полипептиды следует выделить, очистить и затем собрать в функциональные молекулы. Если желательными являются четырехвалентные формы антител, субъединицы затем подвергаются самосборке в четырехвалентные антитела; см., например, международную заявку WO02/096948.

В бактериальных системах можно успешно отобрать ряд экспрессирующих векторов в зависимости от предполагаемого применения экспрессируемых молекул антител. Например, при необходимости продукции большого количества такого белка для получения фармацевтических композиций молекулы антитела могут быть желательными векторы, обеспечивающие высокий уровень экспрессии легко очищаемых гибридных белковых продуктов. Такие векторы включают экспрессирующий вектор pUR278 для *E. coli* (Ruther et al., *EMBO J.* 2 (1983), 1791), в котором последовательность, кодирующую антитело, можно отдельно лигировать в одной рамке с кодирующей областью LacZ, так что продуцируется гибридный белок; векторы pIN (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24 (1989), 5503-5509); и т.п., но не ограничиваются ими. Кроме того, для экспрессии чужеродных полипептидов в виде гибридных белков с глутатион-S-трансферазой (GST) можно использовать

векторы pGEX. В общем случае такие гибридные белки растворимы и могут быть легко очищены от лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матриксом глутатион-агарозных гранул с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Конструкция векторов pGEX включает сайты расщепления тромбином или протеазой фактора Ха, и целевой продукт клонированного гена можно освободить от фрагмента GST.

Кроме прокариот, также можно использовать эукариотические микроорганизмы. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, наиболее широко используется среди эукариотических микроорганизмов, хотя ряд других штаммов, например, *Pichia pastoris*, также являются общедоступными. Для экспрессии в *Saccharomyces* обычно используют, например, плазмиду YRp7 (Stinchcomb et al., Nature 282 (1979), 39; Kingsman et al., Gene 7 (1979), 141; Tschemper et al., Gene 10 (1980), 157). Эта плазида уже содержит ген TRP1, который представляет собой селектируемый маркер для мутантного штамма дрожжей, не обладающего способностью расти на триптофане, например, ATCC No. 44076 или PEP4-1 (Jones, Genetics 85 (1977), 12). Наличие дефекта *trp1* как характеристика генома дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает условия для эффективного обнаружения трансформации по росту в отсутствие триптофана.

В системе клеток насекомых в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов обычно используют вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV). Этот вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Последовательность, кодирующую антитело, можно отдельно клонировать в несущественные области (например, ген полиэдрина) вируса и поместить под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина).

После рекомбинантной экспрессии молекулы антитела согласно изобретению целые антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи или другие формы иммуноглобулина согласно настоящему изобретению можно очистить в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники, в том числе, например, путем хроматографии (например, ионообменной, аффинной, особенно на основе сродства к специфическому антигену по сравнению с белком А, и эксклюзионной колоночной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости, например, осаждения сульфатом аммония, или любым другим стандартным способом очистки белков; см., например, Scores, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). Кроме того, предпочтительный способ повышения сродства антител согласно изобретению описан в публикации патента США 2002-0123057 A1. Таким образом, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ получения антитела против IAPP и/или rgoIAPP, или их иммуноглобулиновых цепей, включающий:

(а) культивирование клетки-хозяина, как описано выше, причем указанная клетка содержит полинуклеотид или вектор, описанный выше; и

(b) выделение указанного антитела или его иммуноглобулиновой цепи из культуры.

Кроме того, в одном варианте реализации настоящее изобретение относится к антителу или его иммуноглобулиновой(ых) цепи(ей), кодируемой полинуклеотидом, как описано выше, или получаемому с помощью указанного способа получения антитела против IAPP и/или rgoIAPP или их иммуноглобулиновой(ых) цепи(ей).

V. Гибридные белки и конъюгаты.

В некоторых вариантах реализации полипептид антитела содержит аминокислотную последовательность или одну или более групп, обычно не связанных с антителом. Типичные модификации подробно описаны ниже. Например, одноцепочечный Fv-фрагмент антитела согласно изобретению может содержать последовательность гибкого линкера, или может быть модифицирован путем добавления функциональной группы (например, ПЭГ, лекарственного вещества, токсина или метки, например, флуоресцентной, радиоактивной, ферментативной, ЯМР-метки, тяжелого металла и т.п.).

Полипептид антитела согласно изобретению может содержать, состоять по существу из или состоять из гибридного белка. Гибридные белки являются химерными молекулами, содержащими, например, иммуноглобулиновый IAPP- и/или rgoIAPP-связывающий домен с по меньшей мере одним сайтом связывания мишени и по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, т.е. фрагмент, с которым он обычно не связан в природе. Аминокислотные последовательности могут в норме существовать в виде отдельных белков, объединяемых в составе гибридного полипептида, либо они могут в норме присутствовать в составе одного и того же белка, но располагаться в новом порядке в составе гибридного полипептида. Гибридные белки могут быть получены, например, путем химического синтеза, или путем создания и трансляции полинуклеотида, кодирующего желательное взаиморасположение пептидных областей.

Термин "гетерологичный" применительно к полинуклеотиду или полипептиду означает, что полинуклеотид или полипептид является производным от компонента, отличающегося от остального компонента, с которым его сравнивают. Например, в настоящем документе "гетерологичный полипептид", объединяемый с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, вариантом или аналогом, происходит от неиммуноглобулинового полипептида, полученного из организма того же вида, или иммуноглобулинового или неиммуноглобулинового полипептидных других видов.

Как подробнее обсуждалось в других разделах настоящего документа, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению можно затем рекомбинантно

объединить с гетерологичным полипептидом по N- и C-концу или химически конъюгировать (включая ковалентное и нековалентное конъюгирование) с полипептидами или другими композициями. Например, антитела можно рекомбинантно объединить или конъюгировать с молекулами, используемыми в качестве меток в анализе обнаружения, и эффекторными молекулами, например, гетерологичными полипептидами, лекарственными веществами, радионуклидами и токсинами; см., например, международные заявки WO92/08495, WO91/14438, WO89/12624, патент США № 5314995 и европейский патент EP 0396387.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению могут состоять из аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями или модифицированными пептидными связями, т.е. пептидными изостерами, и могут содержать аминокислоты, отличающиеся от 20 генетически кодируемых аминокислот. Антитела могут быть модифицированы естественных процессов, например, посттрансляционной обработки, или методами химической модификации, хорошо известными в данной области техники. Такие модификации хорошо описаны в базовых текстах и в более подробных монографиях, а также обширной исследовательской литературе. Модификации могут произойти в любой области антитела, включая пептидный каркас, боковые цепи аминокислот и N- или C-конец, или в таких группах, как углеводные. Следует принимать во внимание, что модификации одного и того же типа могут присутствовать в одинаковой или разной степени в нескольких сайтах данного антитела. Кроме того, данное антитело может содержать модификации многих типов. Антитела могут ветвиться, например, в результате убиквитинирования, и могут быть циклическими, с ветвлением или без него. Циклические, разветвленные и неразветвленные циклические антитела можно получить в результате посттрансляционных природных процессов или синтетическими способами. Модификации включают ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение молекулы гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозита, перекрестное связывание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование перекрестных ковалентных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидрокселирование, иодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, ПЭГилирование, протеолитическую обработку, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селенирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот к белку, например, аргинилирование и убиквитинирование; см., например, *Proteins - Structure And Molecular Properties*, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993); *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B. C Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182 (1990), 626-646; Rattan et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 663 (1992), 48-62).

Кроме того, в настоящем изобретении предложены гибридные белки, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное и гетерологичный полипептид. В одном варианте реализации гибридный белок согласно изобретению содержит, состоит по существу из или состоит из полипептида, содержащего аминокислотную последовательность одной или более V_H -областей антитела согласно изобретению или аминокислотную последовательность одной или более V_L -областей антитела согласно изобретению или их фрагментов и вариантов и последовательность гетерологичного полипептида. В еще одном варианте реализации гибридный белок для применения в способах диагностики и лечения, описанных в настоящем документе, содержит, состоит по существу из или состоит из полипептида, содержащего аминокислотную последовательность одной, двух, трех из V_H -CDR антитела или его фрагментов, вариантов или производных, или аминокислотную последовательность одного, двух, трех из V_L -CDR антитела или его фрагментов, вариантов или производных, и последовательность гетерологичного полипептида. В одном варианте реализации гибридный белок содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность V_H -CDR3 антитела согласно настоящему изобретению или его фрагмента, производного или варианта и последовательность гетерологичного полипептида, причем указанный гибридный белок специфически связывается с IAPP и/или proIAPP. В еще одном варианте реализации гибридный белок содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере одной V_H -области антитела согласно изобретению и аминокислотную последовательность по меньшей мере одной V_L -области антитела согласно изобретению или их фрагментов, производных или вариантов, и последовательность гетерологичного полипептида. В предпочтительном варианте V_H и V_L -области гибридного белка соответствуют антителу из единственного источника (или scFv- или Fab-фрагменту), которое специфически связывает IAPP и/или proIAPP. В еще одном варианте реализации гибридный белок для применения в способах диагностики и лечения, описанных в настоящем документе, содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность одного, двух, трех или более из V_H -CDR антитела и аминокислотную последовательность одного, двух, трех или более из V_L -CDR антитела или его фрагментов и вариантов, и последовательность гетерологичного полипептида. Предпочтительно два, три, четыре, пять, шесть или более V_H -CDR или V_L -CDR соответствуют антителу из единственного источника (или scFv или Fab фрагменту) согласно изобретению. Настоящее изобретение также охватывает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие эти гибридные белки.

Примеры гибридных белков, описанных в литературе, включают гибриды T-клеточного рецептора

(Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 2936-2940; CD4 (Capon et al., Nature 337 (1989), 525-531; Traunecker et al., Nature 339 (1989), 68-70; Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. USA 9 (1990), 347-353; и Byrn et al., Nature 344 (1990), 667-670); L-селектина (рецептора хоминга) (Watson et al., J. Cell. Biol. 110 (1990), 2221-2229; и Watson et al., Nature 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo et al., Cell 61 (1990), 1303-1313); CD28 и B7 (Linsley et al., J. Exp. Med. 173 (1991), 721-730); CTLA-4 (Lisley et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic et al., Cell 66 (1991), 1133-1144); рецептора ФНО (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27 (1991), 2883-2886; и Peppel et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 1483-1489 (1991); и рецептора α IgE (Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. 115 (1991), Abstract No. 1448).

Как обсуждается в других разделах настоящего документа, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению можно объединить с гетерологичными полипептидами с целью увеличения времени полужизни полипептидов *in vivo* или для применения в иммуноанализе с использованием способов, известных в данной области техники. Например, в одном варианте реализации, с антителами согласно изобретению можно конъюгировать ПЭГ для увеличения их времени полужизни *in vivo*; см., например, Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; или Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению можно объединить с маркерными последовательностями, например, пептидом, для облегчения их очистки или детектирования. В предпочтительных вариантах реализации маркерная аминокислотная последовательность является гексагистидиновым пептидом (HIS), например, маркером, представленным в векторе pQE (QIAGEN Inc., 9259 Итон-авеню, Чатсворт, штат Калифорния, США, 91311), среди прочих маркеров, многие из которых доступны для приобретения. Как описано в работе Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824, например, гексагистидин обеспечивает удобную очистку гибридного белка. Другие пептидные маркеры, применимые для очистки, включают маркер "HA", который соответствует эпитопу, происходящему от белка гемагглютинина вируса гриппа (Wilson et al., Cell 37 (1984), 767), GST, с-тус и маркер "flag", но не ограничиваются ими; см., например, обзор методик эпитопной маркировки в статье Bill Brizzard, BioTechniques 44 (2008) 693-695 и список наиболее распространенных эпитопных маркеров согласно настоящему изобретению в табл. 1 на странице 694 указанной публикации, суть которой явным образом включена в настоящий документ посредством ссылки.

Гибридные белки можно получить с использованием способов, хорошо известных в данной области техники; см., например, патенты США 5116964 и 5225538. Точный сайт, по которому производится объединение, можно выбрать эмпирически для оптимизации секреции или характеристик связывания гибридного белка. Затем ДНК, кодирующую гибридный белок, переносят путем трансфекции в клетку-хозяина для экспрессии, которую осуществляют, как описано выше.

Антитела согласно настоящему изобретению можно использовать в неконоъюгированной форме или конъюгировать с по меньшей мере одной из множества молекул, например, для повышения терапевтических свойств молекулы, облегчения обнаружения мишени или для визуализации или лечения пациента. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению можно метить или конъюгировать до или после очистки, при ее осуществлении. В частности, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению можно конъюгировать с терапевтическими агентами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа, фармацевтическими агентами или ПЭГ.

Конъюгаты, которые являются иммунотоксинами, содержащими обычные антитела, широко описаны в данной области техники. Токсины можно присоединить к антителам с помощью общепринятых методик присоединения или продуцировать иммунотоксины, содержащие белковый токсинный фрагмент, в виде гибридных белков. Антитела согласно настоящему изобретению можно использовать соответствующим образом для получения таких иммунотоксинов. Примером таких иммунотоксинов являются иммунотоксины, описанные Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 и Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

Специалисты в данной области техники поймут, что конъюгаты также можно могут быть собраны с использованием различных способов в зависимости от выбранного конъюгируемого агента. Например, конъюгаты с биотином получают, например, путем реакции IAPP- и/или proIAPP-связывающего полипептида с активированным сложным эфиром биотина, например, биотин-N-гидроксисукцинимидного эфира. Аналогичным образом, конъюгаты с флуоресцентным маркером можно получить в присутствии связывающего агента, например, агентов, перечисленных в настоящем документе, или в ходе реакции с изотиоцианатом, предпочтительно изотиоцианатом флуоресцеина. Конъюгаты антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных согласно настоящему изобретению получают аналогичным образом.

Настоящее изобретение также охватывает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению, конъюгированные с диагностическим или терапевтическим агентом. Антитела можно применять в диагностических целях, например, для демонстрации наличия метаболического заболевания, например, СД2, для обозначения риска возникновения метаболиче-

ского заболевания, для мониторинга развития или прогрессирования метаболического заболевания, т.е. заболевания, при котором наблюдается появление или которое связано с агрегированным IAPP и/или proIAPP, в рамках процедуры клинического анализа с целью, например, определения эффективности определенной схемы лечения и/или профилактики. Таким образом, в одном варианте реализации настоящее изобретение относится к антителу, снабженному детектируемой меткой. Кроме того, в одном варианте реализации настоящее изобретение относится к антителу, присоединенному к лекарственному веществу. Детектирование можно облегчить присоединением антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного к детектируемому веществу. Детектируемое вещество или метка в общем случае может быть ферментом; тяжелым металлом, предпочтительно золотом; красителем, предпочтительно флуоресцентным или люминесцентным красителем; или радиоактивной меткой. Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные материалы, позитрон-излучающие металлы для использования с различными видами позитронно-эмиссионной томографии, и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов; см., например, патент США № 4741900 о ионах металлов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в диагностике в соответствии с настоящим изобретением. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих простетических комплексных групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансил-хлорид или фикоэритрин; примеры люминесцентных материалов включают люминол; примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин и экворин; а примеры подходящих радиоактивных материалов включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In или ^{99}Tc . Таким образом, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, меченое детектируемой меткой, причем детектируемая метка выбрана из группы, состоящей из фермента, радиоизотопа, флюорофора и тяжелого металла.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное также может быть мечено детектируемой меткой путем его присоединения к хемилюминесцентному соединению. Затем присутствие антитела с хемилюминесцентной меткой определяют путем обнаружения люминесценции, которая возникает в ходе химической реакции. Примерами особенно подходящих хемилюминесцентных меток являются люминол, изолюминол, тероматический сложный эфир акридиния, имидазол, соли и оксалатный эфир акридиния.

Одним из способов, который позволяет метить антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное детектируемой меткой, является его связывание с ферментом и использование продукта связывания в иммуноферментном анализе (ИФА) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1980); Ishikawa, E. et al. (eds.), Enzyme Immunoassay, Kaku Shoin, Tokyo (1981). Фермент, связанный с антителом, должен реагировать с соответствующим субстратом, желательно хромогенным субстратом, с образованием химической группы, которую можно обнаружить (детектировать), например, спектрофотометрически, флуориметрически или визуально. Ферменты, которые можно использовать для мечения антитела, включают малатдегидрогеназу, стафилококковую нуклеазу, дельта-5-стероидглюкозоизомеразу, дрожжевую алкогольдегидрогеназу, альфа-глицерофосфатдегидрогеназу, триозофосфатизомеразу, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, аспарагиназу, глюкозооксидазу, бета-галактозидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, глюкоамилазу и ацетилхолинэстеразу, но не ограничиваются ими. Кроме того, детектирование можно осуществлять колориметрическими способами, использующими хромогенный субстрат фермента. Обнаружение также можно выполнить путем визуального сравнения выраженности ферментативной реакции субстрата по сравнению с аналогично подготовленными стандартами.

Детектирование также можно выполнить с помощью любого другого вида иммуноанализа. Например, при радиоактивном мечении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного можно обнаружить антитела с помощью радиоиммуноанализа (РИА) (см., например, статью Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (March, 1986)), включенную в настоящий документ посредством ссылки). Радиоактивный изотоп можно обнаружить с помощью, в числе прочего, гамма-счетчика, сцинтилляционного счетчика или автордиографии.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное также можно метить флюоресцентными металлами, например, ^{152}Eu , или другими металлами ряда лантаноидов. Эти металлы можно присоединить к антителу с помощью группы, хелатирующей такой металл, например, диэтилен-триаминпентауксусной кислоты (ДТРА) или этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).

Хорошо известны методики конъюгирования различных молекул с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, вариантом или производным, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et

al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (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.), Academic Press pp. 303-16 (1985), и Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62 (1982), 119-158.

Как уже упоминалось, в некоторых вариантах реализации можно конъюгировать группу, повышающую стабильность и эффективность связывающей молекулы, например, связывающего полипептида, например, антитела или его иммуноспецифического фрагмента. Например, в одном варианте реализации, со связывающими молекулами согласно изобретению можно конъюгировать ПЭГ для увеличения их времени полужизни *in vivo*. Leong et al., *Cytokine* 16 (2001), 106; *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54 (2002), 531; или Weir et al., *Biochem. Soc. Transactions* 30 (2002), 512.

VI. Композиции и способы применения.

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим вышеупомянутые IAPP- и/или proIAPP-связывающие молекулы, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению или их производное или вариант, или полинуклеотид, вектор или клетку согласно изобретению, как описано выше. В одном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению является фармацевтической композицией и дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать дополнительные агенты, например, интерлейкины и интерфероны, в зависимости от предполагаемого применения фармацевтической композиции. Для применения в лечении метаболического заболевания, при котором образуется или которое связано с агрегированным IAPP и/или proIAPP, например, СД2, дополнительный агент можно выбрать из группы, состоящей из небольших органических молекул, антител против IAPP и/или proIAPP и их комбинаций. Таким образом, в особенно предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение относится к применению IAPP- и/или proIAPP-связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, или связывающей молекулы, обладающей по существу такой же специфичностью связывания, как и любое из них, полинуклеотида, вектора или клетки согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической или диагностической композиции для профилактического и терапевтического лечения метаболического заболевания, мониторинга прогрессирования метаболического заболевания или реакции на лечение метаболического заболевания у субъекта или для определения риска развития метаболического заболевания у субъекта.

Таким образом, в одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу лечения метаболического нарушения, характеризующегося аномальным накоплением и/или отложением IAPP или proIAPP в островках Лангерганса, включающего введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества любого из описанных выше IAPP- и/или proIAPP-связывающих молекул, антител, полинуклеотидов, векторов или клеток согласно настоящему изобретению. Термин "метаболическое нарушение" включает группу нарушений, обычно характеризующихся такими симптомами, как метаболические изменения, предшествующие, вызывающие и/или связанные/ассоциированные с или сопряженные с СД2, включающей заболевания, вызывающие повреждение поджелудочной железы и поэтому способные привести к диабету, включая хронический панкреатит, муковисцидоз, рак поджелудочной железы; при заболеваниях, которые увеличивают риск СД2, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона; при сердечно-сосудистых заболеваниях, связанных или не связанных с ожирением и СД2; и/или сам СД2, но не ограничивается ими.

Особое преимущество терапевтического подхода согласно настоящему изобретению заключается в том, что антитела согласно настоящему изобретению происходят от В-клеток или В-клеток памяти здоровых субъектов-людей без признаков заболевания, при котором наблюдается появление или которое связано с агрегированным IAPP и/или proIAPP, например, СД2, и, таким образом, с некоторой вероятностью, могут предотвращать клиническое проявление заболевания, связанного с агрегированным IAPP и/или proIAPP, или уменьшать риск возникновения клинического проявления заболевания, или отсрочить начало или прогрессирование клинического проявления заболевания. Как правило, антитела согласно настоящему изобретению уже успешно подверглись соматическому созреванию, т.е. оптимизации селективности и эффективности связывания с мишенью - молекулой IAPP и/или proIAPP с высоким средством, за счет соматической изменчивости вариабельных областей антитела.

Знание о том, что такие клетки не активируются родственными или другими физиологическими белками или клеточными структурами *in vivo*, например, в организме человека, в смысле аутоиммунных или аллергических реакции, также имеет большое медицинское значение, поскольку означает значительное повышение шансов на успешное выживание на протяжении всех фаз клинических исследований. Можно сказать, что их переносимость, эффективность и приемлемость уже продемонстрированы до клинической и клинической разработки профилактического или терапевтического антитела по меньшей мере на одном субъекте-человеке. Таким образом, можно ожидать, что антитела человека против IAPP

и/или proIAPP согласно настоящему изобретению, их эффективность в качестве терапевтического агента по отношению к структуре-мишени и пониженная вероятность связанных с ними побочных эффектов значительно повышают клиническую вероятность успеха.

В настоящем изобретении также предложены фармацевтический и диагностический, соответственно, пакет или набор, состоящий из одного или более контейнеров, заполненных одним или более из описанных выше компонентов, например, антителом против IAPP и/или proIAPP, его связывающим фрагментом, производным или вариантом, полинуклеотидом, вектором или клетками согласно настоящему изобретению. К такому(им) контейнеру(ам) может прилагаться уведомление по форме, предусмотренных правительственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов и биологических продуктов, в котором отражено одобрение агентством производства, применения или продажи для медицинского применения. В качестве дополнения или альтернативы, набор включает реагенты и/или инструкции по использованию в ходе соответствующих диагностических анализов. Композиция, например, набор согласно настоящему изобретению, разумеется, особенно подходит для оценки риска, диагностики, профилактики и лечения нарушения, сопровождающегося присутствием агрегированного IAPP и/или proIAPP, и в частности, применим для лечения нарушений, обычно характеризующихся такими симптомами, как метаболические изменения, предшествующие, вызывающие и/или связанные/ассоциированные с или сопряженные с СД2, включающей заболевания, вызывающие повреждение поджелудочной железы и поэтому способные привести к диабету, включая, например, хронический панкреатит, муковисцидоз, рак поджелудочной железы; при заболеваниях, которые увеличивают риск СД2, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона; при сердечно-сосудистых заболеваниях, связанных или не связанных с ожирением и СД2; и/или сам СД2.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно составить согласно способам, широко известным в данной области техники; см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают физиологические растворы с фосфатным буфером, воду, эмульсии, например, эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д. Композиции, содержащие такие носители, можно составить с использованием широко известных общепринятых способов. Указанные фармацевтические композиции можно вводить субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций можно осуществлять различными способами, например, путем внутривенного, внутривентриального, подкожного, внутримышечного, интраназального, местного или внутрикожного введения, или доставки в спинной или головной мозг. Аэрозольные составы, например, назальные спреи, включают очищенные водные или другие растворы активного агента с консервирующими агентами и изотоническими агентами. Такие композиции предпочтительно доводят до pH и изотонического состояния, совместимых со слизистыми оболочками носа. Составы для ректального или вагинального введения могут быть представлены в виде суппозитория с подходящим носителем.

Схему приема может определить лечащий врач с учетом клинических факторов. Как известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая размеры пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение, подлежащее введению, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие одновременно вводимые препараты. Типичная доза может составлять, например, от 0,001 до 1000 мкг (или соответствующее количество нуклеиновой кислоты для экспрессии или ингибирования экспрессии в этом диапазоне); однако допустимы дозы ниже или выше этого типичного диапазона, особенно с учетом вышеперечисленных факторов. Как правило, дозировка может меняться, например, от примерно 0,0001 до 100 мг/кг, чаще от 0,01 до 5 мг/кг (например, 0,02, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 мг/кг, и т.д.) массы тела. Например, дозировка может составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или от 1 до 10 мг/кг, предпочтительно по меньшей мере 1 мг/кг. Дозы, находящиеся между вышеуказанными диапазонами, также входят в рамки настоящего изобретения. Субъектам можно вводить такие дозы ежедневно, через день или несколько дней, еженедельно или по любому другому графику, определяемому посредством эмпирического анализа. Типичное лечение подразумевает введение ряда дозировок в течение длительного времени, например, по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные типичные схемы лечения подразумевают введение раз в две недели или раз в месяц или раз в 3-6 месяцев. Типичные режимы приема включают введение 1-10 мг/кг или 15 мг/кг каждый день, 30 мг/кг через день или 60 мг/кг раз в неделю. В некоторых способах одновременно вводят два или более моноклональных антитела с различными специфичностями связывания, в этом случае дозировка каждого вводимого антитела находится в указанных пределах. Прогресс можно отслеживать путем периодических оценок. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные и неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, например, оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, например, этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные среды. Парентеральные среды-носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или жирные масла. Внутривенные носители включают жидкие и питательные добавки, элек-

тролитные добавки, (например, добавки на основе декстрозы Рингера) и т.п. Кроме того, могут присутствовать консерванты и другие добавки, например, антимикробные препараты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы и т.п. Кроме того, фармацевтическая композиция согласно изобретению может содержать дополнительные агенты, например, дофамин или психофармакологические препараты, в зависимости от предполагаемого применения фармацевтической композиции.

Кроме того, в предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения фармацевтическую композицию можно составить в виде вакцины, например, если фармацевтическая композиция согласно изобретению включает антитело против IAPP и/или proIAPP или его связывающий фрагмент, производное или вариант для пассивной иммунизации. Как уже упоминалось в разделе "Уровень техники", есть несколько наборов данных, показывающих, что агрегированные разновидности IAPP и/или proIAPP являются основным пусковым фактором патогенеза СД2 (Zraika et al. (2010), *Diabetologia* 53(6): 1046-1056; Westermarck et al. (2011), *Physiol. Rev.* 91(3): 795-826; Jurgens et al (2011), *Am. J. Pathol.* 178(6): 2632-2640; Hoppener et al (2008), *Exp. Diabetes Res.* 697035) и лечение, мешающее агрегации hIAPP, улучшало диабетический фенотип и увеличивало продолжительность жизни животного (Aitken et al. (2009), *Diabetes* 59(1): 161-171). Соответственно, разумно ожидать, что пассивная иммунизация антителом человека против IAPP и/или proIAPP и эквивалентными IAPP- или proIAPP-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению поможет избежать некоторых нежелательных эффектов терапевтического подхода активной иммунизации, как уже отмечалось в разделе "Уровень техники". Таким образом, настоящие антитела против IAPP и/или proIAPP и их эквиваленты согласно настоящему изобретению должны быть особенно полезны в качестве вакцины для профилактики или облегчения заболеваний, при которых наблюдается присутствие или которые вызываются агрегированным IAPP и/или proIAPP, например, метаболические изменения, предшествующие, вызывающие и/или связанные/ассоциированные с или сопряженные с СД2, включающей заболевания, вызывающие повреждение поджелудочной железы и поэтому способные привести к диабету, включая хронический панкреатит, муковисцидоз, рак поджелудочной железы; при заболеваниях, которые увеличивают риск СД2, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона; при сердечно-сосудистых заболеваниях, связанных или не связанных с ожирением и СД2; и/или сам СД2.

В одном варианте реализации может быть целесообразно использовать рекомбинантные биспецифические или полиспецифические конструкторы антитела согласно настоящему изобретению. Для справки см. Fischer and Léger, *Pathobiology* 74 (2007), 3-14. Мишенью одного связывающего плеча такой биспецифической молекулы может быть IAPP, а другого плеча - другой компонент, участвующий в патогенезе сахарного диабета, например, proIAPP (помимо антител согласно настоящему изобретению, которые являются биспецифическими против IAPP и proIAPP, как указано выше для типичного антитела NI-203.26C11). Либо второе связывающее плечо такой биспецифической молекулы может связываться с другим компонентом, участвующим в патогенезе сахарного диабета, например, ИЛ-1 β и ИЛ-6, или блокировать котранспортер натрия и глюкозы-2 (SGLT2) или CD33; считается, что такое вмешательство способствует регрессии диабета у мышей NOD за счет индукции адаптивных регуляторных Т-клеток (Ablamunits et al., *Diabetes* 61 (2012), 145-154; Belghith et al., *Nat Med* 9 (2003), 1202-1208).

В одном варианте реализации может быть целесообразно использовать рекомбинантные Fab (rFab) и одноцепочечные фрагменты (scFv) антитела согласно настоящему изобретению, которые могут легче проникать через клеточную мембрану. Например, в статье Robert et al., *Protein Eng. Des. Sel.* (2008) Oct 16; S1741-0134, опубликованной онлайн ранее, описано применение химерных рекомбинантных Fab (rFab) и одноцепочечных фрагментов (scFv) моноклонального антитела WO-2, которое распознает эпитоп в N-концевой области А β . Сконструированные фрагменты могли:

- (i) предотвращать образование фибрилл амилоида,
- (ii) дезагрегировать сформированные фибриллы А β ₁₋₄₂, и
- (iii) ингибировать нейротоксичность, опосредованную олигомером А β ₁₋₄₂, *in vitro* так же эффективно, как и вся молекула IgG.

Предполагаемые преимущества использования небольших Fab- и scFv-сконструированных форматов антитела, лишенных эффекторной функции, включают более эффективное проникновение через гематоэнцефалический барьер и минимизацию риска запуска воспалительных побочных реакций. Помимо того, что scFv и однодоменные антитела сохраняют специфичность связывания полноразмерных антител, они могут экспрессироваться в виде одиночных генов и внутриклеточно в клетках млекопитающих как интратела, с возможностью изменения фолдинга, взаимодействия, модификаций или внутриклеточной локализации их мишеней; см., например, Miller and Messer, *Molecular Therapy* 12 (2005), 394-401.

Согласно другому подходу, Muller et al., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2005), 237-241, описали технологическую платформу, так называемую "технология суперантител", которая, как считается, позволяет антителам проникать в живые клетки без ущерба для них. Такие проникающие в клетки антитела открывают новые диагностические и терапевтические возможности. Для этих антител придуман термин "TransMab" (ТрансМАТ).

В дополнительном варианте реализации может быть желательным совместное или последователь-

ное введение других антител, применяемых для лечения заболевания, связанного с возникновением агрегированных IAPP и/или proIAPP. В одном варианте реализации дополнительное антитело входит в состав фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры антител, которые можно применять для лечения субъекта, включают антитела против CD33, SGLT2, ИЛ-6 и ИЛ-1, но не ограничиваются ими.

В дополнительном варианте реализации может быть желательным совместное или последовательное введение других агентов, применяемых для лечения заболевания, связанного с агрегированными IAPP и/или proIAPP, и/или диабета. В одном варианте реализации дополнительный агент входит в состав фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры агентов, которые можно применять для лечения субъекта, включают: инсулин и аналоги инсулина; модуляторы сигнального пути инсулина, например, ингибиторы протеин-тирозинфосфатаз (PTPаз), соединения-миметики высокомолекулярных соединений и ингибиторы глутамин-фруктозо-6-фосфатамидотрансферазы (GFAT), ингибиторы ДПП-IV, агенты, влияющие на нерегулируемую продукцию глюкозы в печени, например, ингибиторы глюкозо-6-фосфатазы (G6Pазы), ингибиторы фруктозо-1,6-бисфосфатазы (F-1,6-BPазы), ингибиторы гликогенфосфорилазы (GP), антагонисты рецептора глюкогона, ингибиторы фосфоенолпируваткарбоксихиназы (PEPCK), ингибиторы киназы пируватдегидрогеназы (PDHK), усилители чувствительности к инсулину, усилители секреции инсулина, ингибиторы α -глюкозидазы, ингибиторы опорожнения желудка; агонисты рецепторов глюкогон-подобного пептида-1 (GLP-1); агенты на основе сульфонилмочевины; бигуанидные агенты, например, метформин; ингибиторы альфа-глюкозидазы; агонисты рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR); меглитинидные агенты; ингибиторы дипептидилпептидазы (ДПП) IV; ингибиторы PDE1, PDE5, PDE9, PDE10 или PDE11 (PDE=фосфодиэстераза); агонисты амилина (например, прамлинтид и другие аналоги амилина); корицу; антагонисты рецептора глюкогона; ингибиторы гликогенфосфорилазы; ингибиторы фруктозо-1,6-бисфосфата; антагонисты рецептора каннабиноидов (CB1); препараты против ожирения, например, подавители аппетита, вещества, усиливающие насыщение, и препараты, усиливающие расход энергии; противовоспалительные агенты или любую их комбинацию, но не ограничиваются ими. Примеры агентов, которые можно применять для лечения или профилактики отторжения островков после клинической трансплантации островков поджелудочной железы, включают агенты группы, содержащей сиролimus (рапамуцин), ингибиторы кальциневрина (например, такролимус), циклоспорин, микофенолата мофетил, FTY-720, циклоспорин, кортикостероиды и моноклональные антитела против рецептора ИЛ-2 (например, даклизумаб), агонисты рецептора глюкогон-подобного пептида-1 (GLP-1) (см., например, Noguchi et al., Acta Med. Okayama, 60 (2006), и международную заявку WO2012088157), но не ограничиваются ими. Таким образом, в одном варианте реализации представлена композиция, дополнительно содержащая агент, который можно применять для лечения сахарного диабета 2 типа (СД2) и/или при лечении или профилактике отторжения островков после клинической трансплантации островков поджелудочной железы. Примеры других агентов, которые можно применять совместно с фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению, описаны в данной области техники; см., например, международные заявки WO2009005672, WO2010128092, WO2012088157 или европейскую заявку EP11158212.8.

Терапевтически эффективная доза или количество относится к количеству активного ингредиента, достаточному для смягчения симптомов или состояния. Терапевтическую эффективность и токсичность таких соединений можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных, например, ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной для 50% особей популяции) и LD₅₀ (дозы, смертельной для 50% особей популяции). Соотношение доз, оказывающих терапевтическое и токсическое действие, представляет собой терапевтический индекс и может выражаться в виде соотношения LD₅₀/ED₅₀. В предпочтительном варианте терапевтический агент присутствует в композиции в количестве, достаточном для восстановления или сохранения контроля над нормальным уровнем сахара в крови и/или реакции на инсулин в случае метаболических нарушений, например, СД2.

Из вышесказанного очевидно, что настоящее изобретение охватывает любое применение IAPP-и/или proIAPP-связывающей молекулы, содержащей по меньшей мере одну CDR описанного выше антитела, в частности, для диагностики или лечения заболевания, связанного с агрегированным IAPP и/или proIAPP, как упоминалось выше, например, СД2. В предпочтительном варианте указанная связывающая молекула является антителом согласно настоящему изобретению или его иммуноглобулиновой цепью. Кроме того, настоящее изобретение относится к антиидиотипическим антителам любого из указанных антител, описанных выше. Эти антитела или другие связывающие молекулы связываются с уникальной антигенной пептидной последовательностью, расположенной на варибельной области антитела вблизи антигенсвязывающего сайта; их можно применять, например, для обнаружения антител против IAPP и/или proIAPP в образце, полученном от субъекта. Таким образом, в одном варианте реализации настоящего изобретения представлено антитело, описанное выше и ниже в настоящем документе, или IAPP-и/или proIAPP-связывающие молекулы, обладающие по существу такой же специфичностью, как и любое из указанных антител, полинуклеотид, вектор или клетка, описанные в настоящем документе, или фармацевтическая или диагностическая композиция, содержащая любой из указанных выше компонен-

тов, для применения при профилактическом лечении, терапевтическом лечении и/или мониторинге прогрессирования или ответа на лечение нарушения, связанного с IAPP и/или proIAPP, причем нарушение предпочтительно выбрано из группы, включающей все типы диабета, например, сахарный диабет 1 типа, гестационный диабет, преддиабет (при котором гликемия крови не достигает порогового значения СД2 или инсулинрезистентности) и латентный аутоиммунный диабет взрослых (LADA); любое заболевание, которое вызывает повреждение поджелудочной железы и, таким образом, может привести к диабету, например, хронический панкреатит, муковисцидоз и рак поджелудочной железы; любое заболевание, которое повышает риск СД2, например, болезнь Альцгеймера и болезнь Хантингтона или другие нейродегенеративные заболевания, которые в настоящем документе считаются связанными с диабетом; метаболический синдром в целом как фактор риска развития диабета или состояние, которое может предшествовать диабету; островковый амилоидоз в целом как фактор риска развития диабета или состояние, которое может предшествовать диабету; ожирение в целом как фактор риска развития диабета или состояние, которое может предшествовать диабету; любое сердечно-сосудистое заболевание, связанное или не связанное ожирением и СД2; все последствия СД2, которые также могут повышать риск развития диабета, например, заболевание сердца, инсульты, диабетическая ретинопатия, почечная недостаточность, кетоацидоз и некототическая гиперосмолярная кома. Вышеупомянутую группу нарушений называют группой нарушений, связанных с IAPP и/или proIAPP.

В еще одном варианте реализации настоящее изобретение относится к диагностической композиции, содержащей любую из описанных выше IAPP- и/или proIAPP-связывающих молекул, антител, антигенсвязывающих фрагментов, полинуклеотидов, векторов или клеток согласно изобретению и, необязательно, подходящее средство для обнаружения таких реагентов, традиционно используемых в способах диагностики на основе иммунокомпонентов или нуклеиновых кислот. Антитела согласно изобретению, например, подходят для применения в иммуноанализе, где их можно использовать в жидкой фазе или связать с твердофазным носителем. Примерами вариантов иммуноанализа, в которых можно использовать антитело согласно изобретению, являются конкурентные и неконкурентные виды иммуноанализа в прямом или непрямом формате. Примерами таких видов иммуноанализа являются радиоиммуноанализ (РИА), сэндвич-анализ (иммунометрический анализ), проточная цитометрия и вестерн-блоттинг. Антигены и антитела согласно изобретению можно связать с различными носителями и применять для выделения клеток, специфически связывающихся с ними. Примеры хорошо известных носителей включают стекло, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозы, природные и модифицированные производные целлюлозы, полиакриламид, агароза и магнетит. В настоящем изобретении носитель может иметь растворимую или нерастворимую природу. Специалистам в данной области техники известны различные метки и способы мечения. Примеры типов меток, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают ферменты, радиоизотопы, коллоидные металлы, флуоресцентные соединения, хемиллюминесцентные соединения и биолюминесцентные соединения; см. также варианты реализации, обсуждавшиеся выше.

В дополнительном варианте реализации IAPP- или proIAPP-связывающие молекулы, в частности антитела согласно настоящему изобретению, также можно применять в способе диагностики нарушения у индивида путем получения образца биологической жидкости от тестируемого индивида, который может представлять собой образец крови, образец плазмы, образец сыворотки, образец лимфы или образец другой биологической жидкости, например, слюны или мочи, и приведение образца биологической жидкости в контакт с антителом согласно настоящему изобретению в условиях, дающих возможность образования комплексов антитело-антиген. Затем определяют уровень таких комплексов способами, известными в данной области техники, причем уровень, значительно повышенный по сравнению с уровнем в контрольном образце, указывает на заболевание у протестированного индивида. Аналогичным образом можно применять специфический антиген, связываемый антителом согласно изобретению. Таким образом, настоящее изобретение относится к иммуноанализу *in vitro*, включающему использование связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению.

В этом контексте настоящее изобретение также относится к средствам, специально предназначенным для этой цели. Например, можно использовать матрицу на основе антител, например, нагруженную антителами или эквивалентными антигенсвязывающими молекулами согласно настоящему изобретению, специфически распознающими IAPP и/или proIAPP. Конструкция микроматриц для иммуноанализа приведена в статье Kusnezow et al., *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Соответственно, настоящее изобретение также относится к микроматрицам, загружаемым IAPP- и/или proIAPP-связывающими молекулами в соответствии с настоящим изобретением.

В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу диагностики заболевания, связанного с агрегированным IAPP и/или proIAPP у субъекта, причем указанный способ включает определение наличия IAPP и/или proIAPP и/или агрегированного IAPP и/или proIAPP в образце от диагностируемого субъекта с помощью по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению, его IAPP- и/или proIAPP-связывающего фрагмента или молекулы, связывающей IAPP и/или proIAPP, обладающей по существу такой же специфичностью связывания, как и любое из них, где присутствие патологически агрегированного IAPP и/или proIAPP является показателем метаболического нару-

шения, например, СД2, и повышение уровня патологически агрегированного IAPP и/или proIAPP по сравнению с уровнем физиологических мономерных форм IAPP и/или proIAPP является показателем прогрессирования метаболического нарушения у указанного субъекта.

У диагностируемого субъекта может быть бессимптомная или доклиническая форма заболевания. В предпочтительном варианте у контрольного субъекта имеет место заболевание, связанное с агрегированным IAPP и/или proIAPP, например, метаболические изменения, предшествующие, вызывающие и/или связанные/ассоциированные с или сопряженные с СД2, включающей заболевания, вызывающие повреждение поджелудочной железы и поэтому способные привести к диабету, включая хронический панкреатит, муковисцидоз, рак поджелудочной железы; при заболеваниях, которые увеличивают риск СД2, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона; при сердечно-сосудистых заболеваниях, связанных или не связанных с ожирением и СД2; и/или сам СД2, причем сходство между уровнем патологически агрегированного IAPP и/или proIAPP и эталонным стандартом указывает на диагноз наличия или риска развития метаболического заболевания у субъекта. В качестве альтернативы или дополнения в виде второго контроля, контрольный субъект не страдает метаболическим заболеванием, причем различие между уровнем физиологических мономеров IAPP и/или proIAPP или агрегированного IAPP и/или proIAPP и референсного стандарта указывает на диагноз наличия или риска развития метаболического заболевания у субъекта. В предпочтительном варианте возраст диагностируемого субъекта и контрольного субъекта должен совпадать. Анализируемый образец может являться любой биологической жидкостью, предположительно содержащей патологически агрегированный IAPP и/или proIAPP, например, кровью, плазмой крови, сывороткой крови, мочой, перитонеальной жидкостью, слюной и цереброспинальной жидкостью (ЦСЖ).

Уровень физиологических мономеров IAPP и/или proIAPP и/или патологически агрегированного IAPP и/или proIAPP можно определить любым подходящим способом, известным в данной области техники, включая, например, анализ IAPP и/или proIAPP одним или более способом, выбранным из вестерн-блоттинга, иммунопреципитации, твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), радиоиммуноанализа (РИА), сортировки клеток с флуоресцентной активацией (FACS), двумерного электрофореза, масс-спектрологии (МС), МС с времяпролетной ионизацией лазерной десорбцией с использованием матрицы (MALDI-TOF), времяпролетной поверхностно-усиленной ионизации лазерной десорбцией (SELDI-TOF), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), жидкостной экспресс-хроматографии белков (ЖЭХБ), многомерной жидкостной хроматографии (ЖХ) с последующей тандемной масс-спектрометрией (МС/МС) и лазерной денситометрии. В предпочтительном варианте указанная визуализация IAPP и/или proIAPP *in vivo* включает позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭТ), оптическую визуализацию в ближнем инфракрасном спектре (NIR) или магнитно-резонансную томографию (МРТ).

Способы на основе антител для детектирования IAPP и/или proIAPP и диагностики и мониторинга прогрессирования заболевания, связанного с агрегированным IAPP и/или proIAPP, например, СД2, и мониторинга лечения такого заболевания с помощью антител и связанных с ними средств, которые можно адаптировать в соответствии с настоящим изобретением, также описаны в международной заявке WO2003092619, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Указанные способы можно применять в соответствии с описанием, но с использованием IAPP-и/или proIAPP-специфического антитела, связывающего фрагмента, производного или варианта согласно настоящему изобретению.

Так, один вариант реализации включает антитело согласно настоящему изобретению или IAPP и/или proIAPP-связывающую молекулу, обладающую по существу такой же специфичностью связывания, как и любое из них, полинуклеотид, вектор или клетку, описанные выше, или фармацевтическую или диагностическую композицию, содержащую любой из указанных компонентов, для применения при профилактическом лечении, терапевтическом лечении и/или мониторинге прогрессирования или ответа на лечение нарушения, связанного с IAPP и/или proIAPP. Таким образом, в целом настоящее изобретение также относится к способу диагностики или мониторинга прогрессирования нарушения, связанного с IAPP и/или proIAPP (например, островкового амилоидоза и СД2, которому обычно предшествует островковый амилоидоз) у субъекта, причем указанный способ включает определение наличия олигомеров, агрегатов или фибрилл IAPP и/или proIAPP в образце от диагностируемого субъекта с помощью по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению или молекулы, связывающей IAPP и/или proIAPP, обладающей по существу такой же специфичностью связывания, как и любое из них, где присутствие олигомеров, агрегатов или фибрилл IAPP и/или proIAPP является показателем нарушения. В одном варианте реализации представлен указанный способ диагностики или мониторинга прогрессирования островкового амилоидоза у субъекта, включающий определение наличия олигомеров, агрегатов или фибрилл IAPP и/или proIAPP в образце субъекта, подлежащего диагностике с использованием по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению или IAPP- и/или proIAPP-связывающей молекулы, обладающей по существу такой же специфичностью связывания, как и любое из них, причем присутствие олигомеров, агрегатов или фибрилл IAPP и/или proIAPP указывает на предсиптоматический, продромальный или клинический сахарный диабет 2 типа (СД2) и/или недостаточность

бета-клеток после клинической трансплантации островков поджелудочной железы и повышение уровня олигомеров, агрегатов или фибрилл IAPP и/или proIAPP по сравнению с уровнем физиологического IAPP или по сравнению с эталонным образцом, полученным из организма здорового контрольного субъекта или контрольного образца из организма того же субъекта указывает на прогрессирование предсимптоматического, продромального или установленного сахарного диабета 2 типа (СД2) и/или недостаточности островков после клинической трансплантации островков поджелудочной железы у указанного субъекта. Специалист в данной области техники должен принимать во внимание, что в одном варианте реализации указанный способ также применяют для диагностики и мониторинга прогрессирования любого другого нарушения из группы нарушений, связанных с IAPP и/или proIAPP, как описано выше.

Как указано выше, антитела согласно настоящему изобретению, их фрагменты и молекулы с такой же специфичностью связывания, как и антитела и их фрагменты, можно использовать не только *in vitro*, но и *in vivo*, а также, помимо диагностического, для терапевтического применения. Таким образом, в одном варианте реализации настоящее изобретение также относится к молекуле, связывающей IAPP и/или proIAPP, содержащей по меньшей мере один CDR антитела согласно настоящему изобретению, представленные для изготовления композиции для обнаружения *in vivo* или направленного действия терапевтического или диагностического агента на IAPP и/или proIAPP в организме человека или животного. Потенциальные терапевтические и/или диагностические агенты можно выбрать из неисключающего перечня терапевтических агентов, которые можно применять при лечении метаболических заболеваний, например, СД2 и потенциальных меток, как указано выше. По отношению к визуализации *in vivo*, в одном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения представлена указанная IAPP-и/или proIAPP-связывающая молекула, содержащая по меньшей мере одну CDR антитела согласно настоящему изобретению, где указанная визуализация *in vivo* включает позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭТ), оптическую визуализацию в ближнем инфракрасном спектре (NIR) или магнитно-резонансную томографию (МРТ). В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения также представлена молекула, связывающая IAPP и/или proIAPP, содержащей по меньшей мере одну CDR антитела согласно настоящему изобретению, или указанная молекула для изготовления композиции для указанных способов визуализации *in vivo*, для применения в способах диагностики или мониторинга прогрессирования нарушения, связанного с IAPP и/или proIAPP, у субъекта, как указано выше.

VII. Пептиды с агрегацией специфических эпитопов IAPP.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к пептидам, содержащим эпитоп IAPP и/или proIAPP, специфически распознаваемый антителом согласно настоящему изобретению. В предпочтительном варианте такой пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 71 в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом или его модифицированной последовательностью, в которой замещены, делетированы или добавлены одна или более аминокислот, причем пептид распознается любым антителом согласно настоящему изобретению, предпочтительно антителом NI-203.19H8 и соответственно антителом NI-203.26C11 или антителом NI-203.15C7.

В одном варианте реализации настоящего изобретения такой пептид можно применять для диагностики или мониторинга заболевания, связанного с агрегированным IAPP и/или proIAPP у субъекта, например, СД2, включающих этап определения присутствия антитела, связывающегося с пептидом в биологическом образце от указанного субъекта, и используемых для диагностики такого заболевания у указанного субъекта путем измерения уровня антител, распознающих описанный выше пептид согласно настоящему изобретению, и сравнения результатов измерения с уровнями у здоровых субъектов сопоставимого возраста и пола. Таким образом, в одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу диагностики островкового амилоидоза, указывающего на предсимптоматический или клинический сахарный диабет 2 типа (СД2) и/или недостаточность бета-клеток после клинической трансплантации островков поджелудочной железы у субъекта, включающему этап определения присутствия антитела, связывающего указанный пептид, как описано выше, в биологическом образце от указанного субъекта. Согласно этому способу, повышенный уровень измеряемого антитела, специфического к указанному пептиду согласно настоящему изобретению, указывает на диагноз предсимптоматического или клинического сахарного диабета 2 типа (СД2) и/или недостаточности бета клеток после клинической трансплантации островков поджелудочной железы у указанного субъекта или для диагностики у указанного субъекта любого другого заболевания из группы нарушений, связанных с IAPP и/или proIAPP, как указано выше. Пептид согласно настоящему изобретению можно составить в виде матрицы, набора и композиции, соответственно, как описано выше. В этом контексте настоящее изобретение также относится к набору, который можно применять в диагностике или мониторинге прогрессирования островкового амилоидоза, причем указанный набор включает по меньшей мере одно антитело согласно настоящему изобретению или IAPP- и/или proIAPP-связывающую молекулу, обладающую по существу такой же специфичностью, как и любое из них, полинуклеотид, вектор, клетку и/или пептид, как соответственно указано выше, необязательно вместе с реагентами и/или инструкциями по эксплуатации.

Эти и другие варианты реализации описаны и включены в данное описание и примеры настоящего

изобретения. Дополнительную литературу, относящуюся к любым материалам, способам, вариантам применения и соединениям, применяемым в соответствии с настоящим изобретением, можно получить из и публичных библиотек и баз данных, с помощью, например, электронных устройств. Например, можно использовать общедоступную базу данных "Medline", которая размещена в Национальном центре биотехнологической информации и/или в национальной медицинской библиотеке Национального института здравоохранения. Дополнительные базы данных и веб-адреса, например Европейский институт биоинформатики (EBI), входящий в состав Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL), известны специалисту в данной области техники, и их также можно получить с помощью поисковых систем Интернета. Обзор патентной информации в области биотехнологии и обзор соответствующих источников патентной информации, пригодных для ретроспективного поиска и понимания текущего положения дел, приведен в статье Verks, TIVTECH 12 (1994), 352-364.

Вышеупомянутая информация содержит общее описание настоящего изобретения. Если не указано иное, термину, используемому в настоящем документе, дается определение, предусмотренное в Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, пересмотренном в 2000 г. и перепечатанном в 2003 г., ISBN 0198506732. В тексте данного описания процитировано несколько документов. Полные библиографические цитаты можно найти в конце описания, непосредственно перед формулой изобретения. Содержимое всех указанных ссылок (включая литературные источники, выданные патенты, опубликованные патентные заявки, цитируемые на протяжении данной заявки и в спецификациях изготовителя, инструкциях и т.д.) явным образом включены в настоящий документ посредством ссылки; однако подразумевается, что в действительности ни один цитируемый документ не является предшественником настоящего изобретения.

Более полное понимание настоящего изобретения можно получить путем чтения следующих конкретных примеров, приведенных только для иллюстративных целей и не предназначенных для ограничения рамок изобретения.

Примеры

Пример 1. Валидация мишени и специфичности связывания антител человека против IAPP.

Для проверки того, является ли IAPP мишенью, распознаваемой выделенными антителами, выполняли прямой твердофазный ИФА. Для типичных рекомбинантных антител человека NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.8E3 96-луночные микропланшеты (Costar, Корнинг, США) покрывали раствором IAPP человека или БСА (Sigma-Aldrich, Букс, Швейцария), разбавленным до концентрации 10 мкг/мл в карбонатном буфере для иммобилизации при твердофазном ИФА (15 мМ Na₂CO₃, 35 мМ NaHCO₃, pH 9,42), и тестировали эффективность связывания антитела. Важно отметить, что раствор IAPP человека, использовавшийся для твердофазного ИФА, содержал фибриллы IAPP, как показано с помощью электронной микроскопии; см. фиг. 3А. Типичные антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.8E3 специфически связывались с фибриллами IAPP человека согласно твердофазному ИФА. Связывания с БСА не наблюдали; см. фиг. 3В. По-видимому, аналогичные характеристики применимы к антителам NI-203.19F2 и NI-203.15C7.

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀) типичных антител NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.8E3 выполнили дополнительные эксперименты посредством прямого твердофазного ИФА с различными концентрациями антител. 96-луночные микропланшеты (Costar, Корнинг, США) покрывали раствором IAPP человека или proIAPP человека, разбавленным до концентрации 10 мкг/мл в карбонатном буфере для иммобилизации при твердофазном ИФА (15 мМ Na₂CO₃, 35 мМ NaHCO₃, pH 9,42), и тестировали эффективность связывания антитела. В то время как раствор IAPP человека, использовавшийся для твердофазного ИФА, содержал фибриллы IAPP, proIAPP человека образовывал в растворе крупные агрегаты, как показано с помощью электронной микроскопии; см. фиг. 4А. Связывание определяли с помощью антител осла против IgG человека (Jackson ImmunoResearch, Ньюмаркет, Великобритания), конъюгированных с ПХ, с последующим измерением активности ПХ в ходе стандартного колориметрического анализа.

Значения EC₅₀ оценивали методом нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (Сан-Диего, США). Рекомбинантные антитела человеческого происхождения NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.8E3 связывались с фибриллами IAPP человека с высоким сродством и EC₅₀, равной 9, 22, 6 и 4 нМ, соответственно. Антитело NI-203.26C11 также связывалось с агрегированными proIAPP человека с EC₅₀ в наномолярном диапазоне (260 нМ); см. фиг. 4В.

Пример 2. Специфичность антител к фибриллам IAPP человека, но не к нефибриллярному IAPP человека, означала преимущественное связывание с конформационными эпитопами.

Для определения связывающей способности типичных антител NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.8E3 по отношению к конформационным эпитопам выполнили эксперименты на основе прямого твердофазного ИФА с использованием растворов IAPP и нефибриллярного IAPP человека, разбавленным до концентрации 10 мкг/мл в карбонатном буфере для иммобилизации при твердофазном ИФА (15 мМ Na₂CO₃, 35 мМ NaHCO₃, pH 9,42), и тестировали связывающую способность антитела. В то время как раствор IAPP человека, использовавшийся для твердофазного ИФА, содержал фибриллы IAPP, раствор нефибриллярного IAPP человека не содержал фибрилл IAPP и демонстрировал лишь небольшие

аморфные агрегаты, как показано с помощью электронной микроскопии; см. фиг. 5А. Связывание определяли с использованием антител осли против IgG человека (Jackson ImmunoResearch, Ньюмаркет, Великобритания), конъюгированных с ПХ, с последующим измерением активности ПХ в ходе стандартного колориметрического анализа.

Рекомбинантные антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 and NI-203.8E3 демонстрировали высокое сродство связывания с фибриллами IAPP при покрытии раствором IAPP (фиг. 5B), как наблюдалось ранее (фиг. 4). Для нефибриллярного IAPP наблюдали недостаточное сродство по сравнению с фибриллами IAPP (фиг. 5B), тем самым демонстрируя преимущественное связывание антител NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.8E3 с фибриллами IAPP. Предварительные результаты показали наличие эффектов, аналогичных вышеописанным, для антител NI-203.19F2 и NI-203.15C7.

Эти данные убедительно указывают на то, что антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2 и NI-203.15C7 связывают эпитопы, преимущественно находящиеся на поверхности и доступные при формировании фибрилл IAPP, в отличие от линейных эпитопов, присутствующих в физиологической конформации белка IAPP человека. Патологические фибриллы IAPP наблюдаются в островках поджелудочной железы пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Поскольку антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2 и NI-203.15C7 демонстрировали преимущественное связывание с терапевтически значимыми патологическими фибриллами IAPP человека, указанные антитела человеческого происхождения обладают терапевтическим потенциалом при СД2.

Пример 3. Оценка эпитопа связывания антител NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2 и NI-203.15C7.

Для определения эпитопа связывания типичных антител NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2, и NI-203.15C7 выполнили пепскан-анализ и анализ посредством аланинового сканирования с использованием перекрывающихся пептидов, картируя полную аминокислотную последовательность IAPP человека и выполняя замену первых 22 аминокислот proIAPP на аланин. Связывающую способность антител тестировали на указанных пептидах, нанесенных в виде пятен на нитроцеллюлозную мембрану (JPT Peptide Technologies, Берлин, Германия), с помощью ПХ-конъюгированных антител осли против вторичного IgG-антитела человека (Jackson ImmunoResearch, Ньюмаркет, Великобритания) с последующим обнаружением активности ПХ (фиг. 6А).

Рекомбинантные антитела NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.15C7 (1 мкг/мл) продемонстрировали связывание с последовательностью 19-SSNFGA-25 (SEQ ID NO: 4), 2-CNTATCA-8 (SEQ ID NO: 5) и 10-QRLANFLVHS-19 (SEQ ID NO: 71) IAPP человека (фиг. 6А и 6В), что соответствует последовательностям предполагаемого эпитопа связывания указанных антител. Эпитопы рекомбинантных антител NI-203.9A2, NI-203.8E3 и NI-203.19F2 (1 и 10 мкг/мл) не выявлены.

Пример 4. Связывание антител NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 с патологическими фибриллами IAPP в поджелудочной железе пациентов с диагнозом "Сахарный диабет 2 типа", но не контрольных пациентов.

Залитые парафином срезы поджелудочной железы двух пациентов с диагнозом "сахарный диабет 2 типа (СД2)" отобрали по нагрузке островков поджелудочной железы амилоидом, наблюдаемой при окрашивании ThioS и Конго красным, а затем использовали для оценки характеристик связывания типичного антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11. Залитые парафином срезы поджелудочной железы пациента без диагноза "сахарный диабет 2 типа" использовали в качестве контроля. После предварительной обработки муравьиной кислотой срезы инкубировали с антителами человека NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 (5 и 50 нМ) или моноклональным антителом мыши против IAPP (1:100; Abcam, Кембридж, Великобритания), с последующим инкубированием с биотинилированным вторичным антителом осли против антител человека (1:500; Jackson ImmunoResearch, Ньюмаркет, Великобритания) или биотинилированным вторичным антителом козы против антител мыши (1:500; Jackson ImmunoResearch, Ньюмаркет, Великобритания). Сигнал антитела усиливали с помощью набора Vectastain ABC-AP (Vector Laboratories, США) и обнаруживали с помощью субстрата - диаминобензидина (Thermo Fisher Scientific, США). После блокирования авидина/биотином (набор для блокирования авидина/биотина Avidin/Biotin blocking kit, Vector Laboratories, США) β-клетки островков поджелудочной железы визуализировали с помощью поликлональных антител морской свинки против инсулина (1:5; Dako, США) в комбинации с биотинилированным вторичным антителом осли против антител морской свинки (1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, США); сигнал антитела усиливали с помощью набора Vectastain ABC-AP (Vector Laboratories, США) и обнаруживали с использованием субстрата щелочной фосфатазы (Vector Laboratories, США).

Первый пациент с СД2 продемонстрировал крупные отложения амилоида в островках поджелудочной железы, соответствующие патологическим фибриллам IAPP, визуализированные при окрашивании ThioS и Конго красным (фиг. 7А). Антитела человека NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 демонстрировали преимущественное окрашивание островков поджелудочной железы на указанных амилоид-положительных срезах (фиг. 7В). Окрашивание антителами наблюдалось при концентрации 5 нМ и увеличивалось при 50 нМ; окрашивания отдельно взятым вторичным антителом не наблюдали, что указывает на специфическое связывание антител человека против IAPP. Эти данные подтвердились у второго

пациента с СД2, продемонстрировавшего отложения амилоида в островках поджелудочной железы (данные не показаны). В отличие от этого, антитела человека NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 не демонстрировали окрашивания островков поджелудочной железы третьего пациента без отложений амилоида (фиг. 7C и D) и контрольного пациента без диагноза "СД2" (фиг. 8). Доступное для приобретения моноклональное антитело мыши против IAPP окрашивало физиологический IAPP в островках поджелудочной железы контрольного пациента, не страдающего диабетом; см. фиг. 8. Антитела согласно настоящему изобретению также позволили получить положительные результаты на поджелудочной железе кошек с диабетом и отложениями островкового амилоида; см. фиг. 9. По-видимому, аналогичные свойства связывания применимы к антителам NI-203.19F2 и NI-203.15C7.

Указанные данные демонстрируют, что антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.19F2 и NI-203.15C7 специфически распознают патологические фибриллы IAPP и в соответствии с биохимическими свойствами связывания указанных антител, которые демонстрировали высокую специфичность связывания с фибриллами IAPP *in vitro* (фиг. 5).

Пример 5. Антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 не обладают перекрестной реакционной способностью по отношению к патологическому амилоиду A β в головном мозге пациента с диагнозом "болезнь Альцгеймера".

Залитые парафином срезы головного мозга пациента с диагнозом "болезнь Альцгеймера" использовали для оценки перекрестной реактивности типичных антител NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11. После предварительной обработки муравьиной кислотой срезы инкубировали с антителами человека NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 (50 нМ) или моноклональным антителом мыши 6E10 против β -амилоида (1:2000; Covance, Алшвилль, Швейцария), с последующим инкубированием с биотинилированным вторичным антителом ослы против антител человека (1:500; Jackson ImmunoResearch, Ньюмаркет, Великобритания) или биотинилированным вторичным антителом козы против антител мыши (1:500; Jackson ImmunoResearch, Ньюмаркет, Великобритания). Сигнал антитела усиливали с помощью набора Vectastain ABC-AP (Vector Laboratories, США) и обнаруживали с помощью субстрата - диаминобензидина (Thermo Fisher Scientific, США).

Антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 не распознавали патологический амилоид A β в головном мозге человека при болезни Альцгеймера, в отличие от специфического антитела 6E10 против β -амилоида (фиг. 10). По-видимому, аналогичные свойства применимы к антителам NI-203.19F2 и NI-203.15C7.

Эти данные показывают, что антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 не обладали перекрестной реакционной способностью по отношению к патологическому амилоиду A β . Соответственно, посредством прямого твердофазного ИФА также продемонстрировано минимальное перекрестное связывание антител NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 с несколькими белками-кандидатами с неправильным фолдингом/склонностью к агрегации, в том числе наиболее известными амилоид-образующими белками, включая альфа-синуклеин, супероксиддисмутазу 1 (СОД1), Тау- и TAP-связывающий белок 43 (TDP-43), но не ограничиваясь ими.

Пример 6. Контроль качества химерных антител мыши NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11.

Для валидации типичных химерных антител мыши NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 выполняли прямой твердофазный ИФА, как описано выше. Химерные антитела сравнивали с соответствующими антителами человека. Для типичных рекомбинантных химерных антител NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 и NI-203.8E3 и соответствующих им антител человека 96-луночные микропланшеты (Costar, Корнинг, США) покрывали раствором IAPP человека или БСА (Sigma-Aldrich, Букс, Швейцария), разбавленным до концентрации 10 мкг/мл в карбонатном буфере для иммобилизации при твердофазном ИФА (15 мМ Na₂CO₃, 35 мМ NaHCO₃, pH 9,42), и тестировали эффективность связывания химерных антител и антител человека. Связывание определяли с помощью антител ослы против IgG человека (Jackson ImmunoResearch, Ньюмаркет, Великобритания), конъюгированных с ПХ, с последующим измерением активности ПХ в ходе стандартного колориметрического анализа. Важно отметить, что раствор IAPP человека, использовавшийся для твердофазного ИФА, содержал фибриллы IAPP, как показано с помощью электронной микроскопии; см. фиг. 3А. Значения EC₅₀ оценивали посредством нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (Сан-Диего, США).

Химерные антитела мыши NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 связывались с фибриллами IAPP человека с высоким сродством и EC₅₀, равной 18,6, 23,9 и 11,5 нМ, соответственно. Связывания с БСА не наблюдали. Сродство связывания химерных антител было аналогичным сродству соответствующих им антител человека, причем EC₅₀ для антител человека NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 составляла 9,4, 22,9 и 6,8 нМ, соответственно; см. фиг. 11.

Затем типичные химерные антитела мыши NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 проверяли на залитых парафином срезах поджелудочной железы двух выбранных пациентов с диагнозом "Сахарный диабет 2 типа (СД2)" и отложениями островкового амилоида. После предварительной обработки муравьиной кислотой срезы инкубировали с химерными антителами NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 (50 нМ) с последующим инкубированием с биотинилированным вторичным антителом ослы против ан-

тител человека (1:500; Jackson ImmunoResearch, Ньюмаркет, Великобритания). Сигнал антитела усиливали с помощью набора Vectastain ABC-AP (Vector Laboratories, США) и обнаруживали с помощью субстрата - диаминобензидина (Thermo Fisher Scientific, США). После блокирования авидина/биотина (набор для блокирования авидина/биотина Avidin/Biotin blocking kit, Vector Laboratories, США) β -клетки островков поджелудочной железы визуализировали с помощью поликлональных антител морской свинки против инсулина (1:5; Dako, США) в комбинации с биотинилированным вторичным антителом ослы против антител морской свинки (1:500; Jackson ImmunoResearch, Ньюмаркет, Великобритания); сигнал антитела усиливали с помощью набора Vectastain ABC-AP (Vector Laboratories, США) и обнаруживали с использованием субстрата щелочной фосфатазы (Vector Laboratories, США).

Химерные антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 демонстрировали преимущественное окрашивание островков поджелудочной железы на амилоид-положительных срезах двух пациентов с СД2 (фиг. 12).

Эти данные демонстрируют, что химерные антитела NI-203.9A2, NI-203.19H8 и NI-203.26C11 специфически распознавали патологические фибриллы IAPP с эффективностью, сопоставимой с эффективностью соответствующих им антител человека (фиг. 12).

Пример 7. Валидация терапевтического эффекта антител против IAPP и/или proIAPP на моделях СД2 у животных.

Ведущие антитела-кандидаты проверяли на двух трансгенных моделях мыши и модели крысы, экспрессирующих hIAPP:

1) h-IAPP (гемизиготные)/C57BL/6/DBA мыши, получавшие питание с высоким содержанием жиров (Hull et al. (2003), Diabetes 52: 372-379);

2) h-IAPP (гемизиготные)/A^{vy}A мыши, получавшие стандартное питание (Butler et al. (2003), Diabetes 52: 2304-2314);

3) h-IAPP (гомизиготные)/CD крысы, получавшие стандартное питание (Butler et al. (2004), Diabetes 53: 1509-1516).

Терапевтическую эффективность оценивают путем определения массы бета-клеток и нагрузки hIAPP-амилоида в поджелудочной железе, а также уровня hIAPP в плазме и функциональных анализов метаболизма глюкозы и секреции инсулина.

1) Физиологические характеристики.

Чтобы видеть, дает ли применение антител согласно настоящей заявке профилактический или терапевтический эффект, исследовали следующие физиологические характеристики (i)-(vii) моделей диабета II типа у животных.

(i) Глюкоза в крови.

Уровень глюкозы в крови животных моделей СД2 анализировали и по сравнению с уровнем у животных, не получавших лечения, и у животных здоровых (не являющихся моделями СД2) линий.

Термин "мышь здоровой линии" в настоящем документе не ограничивается конкретным определением и может представлять собой любую мышь при условии отсутствия аномалий уровня глюкозы в крови, сахара в моче, секреции инсулина и т.п.. Предпочтительные примеры "мышь здоровой линии" включают мышь KOR, мышь NC и лабораторную мышь, используемую в качестве рекуррентного родителя при создании конгенной мыши (например, мыши C3H/He, мыши BALB/c и мыши C57BL/6).

Термин "крыса здоровой линии" в настоящем документе не ограничивается конкретным определением и может представлять собой любую крысу при условии отсутствия аномалий уровня глюкозы в крови, сахара в моче, секреции инсулина и т.п.

Поскольку диабет в моделях мыши и крысы предпочтительно индуцируется трансгенной экспрессией hIAPP, предпочтительно использовать в качестве контрольных те же линии, которые первоначально использовались для создания трансгенных животных.

Выражение "с повышенным уровнем глюкозы в крови по сравнению с мышью/крысой здоровой линии" означает, что уровень глюкозы в крови (концентрация глюкозы в крови) натошак выше, чем у мыши/крысы здоровой линии натошак. Уровень глюкозы в крови животных-диабетиков, равный 130 мг/дл или выше, более предпочтительно 140 мг/дл или выше, более предпочтительно 200 мг/дл и еще более предпочтительно 300 мг/дл или выше считали высоким уровнем глюкозы в крови. Кроме того, термин "натошак" в настоящем документе означает состояние примерно через 12 ч после начала голодания крысы/мышь.

В настоящем изобретении "уровень глюкозы в крови" можно измерить общепринятым способом, известным специалистам в данной области техники, например, с помощью доступного для приобретения измерительного прибора (например, Medisafe Reader; Terumo Co., Ltd.) в соответствии со способом, описанным далее в данном примере.

Типичный способ измерения уровня глюкозы в крови.

Уровень глюкозы в крови (концентрация глюкозы крови) субъекта-животного измеряли с помощью доступного для приобретения измерительного прибора (например, Medisafe Reader; Terumo Co., Ltd). Принцип измерения данным прибором можно объяснить следующим образом. Измерение было основано на колориметрическом анализе. Подготавливали измерительный чип, на чипе размещали глюкозооксида-

зу и пероксидазу в качестве катализаторов и 4-аминоантипирин и N-этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-г-толуидин в качестве хромогенных агентов. Образец крови, поглощенный за счет капиллярных явлений, помещали на данный чип, и глюкоза в крови подвергалась окислению глюкозооксидазой. Затем хромогенные агенты на чипе окислялись пероксидом водорода, образовавшимся к этому моменту, и пероксидазой, что приводило к получению красно фиолетового окрашивания. Количество глюкозы в крови рассчитывали, измеряя степень этого окрашивания.

В данном случае 4 мкл цельной крови получали от субъекта-животного в качестве образца крови и измеряли за время измерения 18 с.

(ii) концентрация гликозилированного гемоглобина (HbA1c).

Модели диабета II типа на животных исследовали на предмет повышенной концентрации гликозилированного гемоглобина в крови и сравнивали с животными моделями СД2, не получавшими лечения, и здоровыми, не страдающими СД2, моделями животных. Концентрации, равные 2,5% или выше, 2,6% или выше, 2,8% или выше и 3,0% или выше, считали повышенными.

Термин "концентрация гликозилированного гемоглобина" в настоящем документе означает долю молекул гемоглобина с глюкозой, присоединенной к ним, в эритроцитах. Концентрацию гликозилированного гемоглобина можно использовать в качестве показателя о целесообразности терапевтического контроля пациентов с диабетом; известно, что она лучше коррелирует с уровнем сахара в крови, имевшим место на 1-2 месяца раньше, чем в настоящее время.

"Концентрацию гликозилированного гемоглобина" можно измерить общепринятым способом, известным специалистам в данной области техники, например, с помощью доступного для приобретения измерительного прибора (например, система DCA 2000; Bayer Medical Ltd.) в соответствии со способом, описанным далее в данном примере. Конкретнее, например, при использовании вышеупомянутой системы DCA 2000 в качестве измерительного прибора количество общего гемоглобина измеряли тиоцианметгемоглобиновым способом, а количество гликозилированного гемоглобина измеряли по ингибированию реакции коагуляции латекса.

(iii) Сахар в моче.

В настоящем примере анализировали сахар в моче контрольных животных и животных моделей СД2.

Термин "положительный результат анализа сахара в моче" в настоящем документе означает, что концентрация глюкозы в моче, выделяемой животными, составляла 100 мг/дл или выше. Концентрацию глюкозы в моче можно измерить общепринятым способом, например, по способу, описанному далее в настоящем примере, с использованием доступного для приобретения набора (например, Pretest; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). В частности, например, при использовании набора Pretest в качестве набора для измерений, образец мочи животного сначала помещали на бумагу Pretest для анализа, и через 30 с определяли результат по представленной в данном наборе цветовой таблице для оценки по пятибалльной шкале от - до +4. Концентрация глюкозы в моче, оцениваемая согласно полученному результату, составляла 100-250 мг/дл для +1, 250-500 мг/дл для +2, 500-2000 мг/дл для +3 и 2000 мг/дл или выше для +4. Результат +1 и выше оценивали как "положительный результат анализа сахара в моче".

Типичный способ измерения уровня сахара в моче.

Глюкоза в моче (сахар в моче) субъекта-животного измеряли способами, известными специалисту в данной области техники, например, с помощью доступного для приобретения набора (Pretest; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Вначале образец мочи животного помещали в виде пятна на бумагу для анализа из упомянутого выше набора Pretest, и через 30 с определяли результат по представленной цветовой таблице для оценки по пятибалльной шкале от - до +4. Концентрация глюкозы в моче, оцениваемая согласно полученным результатам, составляла 100-250 мг/дл для +1, 250-500 мг/дл для +2, 500-2000 мг/дл для +3 и 2000 мг/дл или выше для +4. Результат +1 и выше оценивали как "положительный результат анализа сахара в моче".

(iv) Концентрация инсулина в крови.

В данном примере проверяли, является ли концентрация инсулина в крови животных моделей диабета II типа сопоставимой, эквивалентной или повышенной по сравнению с уровнем у животных, не получавших лечения, и у контрольных животных, не являющихся диабетиками (животных здоровых линий).

Выражение, что концентрация инсулина в крови "эквивалентна или повышена по сравнению с животным здоровой линии" означает, что концентрация инсулина крови натошак эквивалентна или повышена по сравнению с концентрацией у животного здоровой линии натошак, например, составляет 90 пг/мл или выше, или 110 пг/мл или выше.

В настоящем изобретении "концентрацию инсулина в крови" можно измерить общепринятым способом, например, с помощью набора Льюиса U-типа для анализа инсулина (Shibayagi Co.) в соответствии со способом, описанным далее в данном примере. Конкретнее, например, моноклональное антитело (мыши) против инсулина иммобилизовали на планшете, связывали с ним инсулин, присутствующий в образце, после чего с ним реагировало меченое биотином моноклональное антитело против инсулина, распознававшее еще один сайт инсулина, затем добавляли конъюгат пероксидаза-авидин, связывавшийся с биотином, и, наконец, добавляли хромогенный субстрат для измерения инсулина по развитию окраши-

вания.

Пример способа измерения концентрации инсулина в крови.

Концентрацию инсулина в крови субъекта-мыши измеряли способом, известным специалисту в данной области техники, например, с помощью доступного для приобретения набора (набора Льюиса У-типа для анализа инсулина, Shibayagi Co.). Концентрацию инсулина измеряли следующим образом. Моноклональное антитело против инсулина иммобилизовали на планшете, связывали с ним инсулин, присутствующий в образце, после чего с ним реагировало меченое биотином моноклональное антитело против инсулина, распознававшее еще один участок инсулина, затем добавляли конъюгат пероксидаза-аваидин, связывавшийся с биотином, и, наконец, добавляли хромогенный субстрат для измерения инсулина по развитию окрашивания. Диапазон измерения обычно составлял от 39 до 2500 пг/мл для здорового животного (мыши).

(v) Переносимость глюкозы.

Модельных животных с СД2, получавших и не получавших лечения, тестировали на предмет аномальной переносимости глюкозы.

Нормальность или аномальность переносимости глюкозы у животного можно подтвердить с помощью теста переносимости глюкозы. Тест переносимости глюкозы можно осуществить согласно общепринятой процедуре, известной для специалиста в данной области техники, например, путем внутрибрюшинного введения глюкозы натошак (по меньшей мере через 12 ч) животному из расчета 2 мг на грамм массы тела и измерения уровня глюкозы в крови животного в определенное время после теста переносимости глюкозы (например, каждые 15 мин на протяжении 240 мин). Если результат показывает, что уровень глюкозы в крови не демонстрирует тенденции к снижению с течением времени по сравнению со здоровой мышью, переносимость глюкозы считали аномальной. Если результат у животных, получавших лечение, демонстрирует тенденцию к снижению с течением времени по сравнению с животными, не получавшими лечения, лечение с применением антител согласно настоящему изобретению считают эффективным.

Пример способа оценки переносимости глюкозы.

Переносимость глюкозы у субъекта-животного можно оценить с помощью теста на переносимость глюкозы.

Тест на переносимость глюкозы осуществляли, вначале вводя глюкозу внутрибрюшинно животному, голодавшему 12 ч, из расчета 2 мг на грамм массы тела, а затем измеряя уровень глюкозы в крови (периферической крови) животного каждые 15 мин на протяжении 240 мин. Уровень глюкозы в крови измеряли с помощью вышеуказанного способа. Если результат показывал, что уровень глюкозы в крови не демонстрирует тенденции к снижению с течением времени по сравнению со здоровым животным, переносимость глюкозы считали аномальной. Быстрее снижение с течением времени у животных, получавших лечение, по сравнению с животными моделями с СД2, не получавшими лечения, считали признаком эффективности лечения согласно настоящему изобретению.

(vi) Чувствительность к инсулину.

Животных моделей с СД2, получавших и не получавших лечения, тестировали на предмет аномальной чувствительности к инсулину.

Нормальность или аномальность чувствительности к инсулину у животного можно подтвердить с помощью теста чувствительности к инсулину. Тест чувствительности к инсулину можно осуществить согласно общепринятой процедуре, известной для специалиста в данной области техники, например, путем внутрибрюшинного введения инсулина натошак животному из расчета 0,5-0,85 ед на кг массы тела и измерения уровня глюкозы в крови животного в определенное время после теста чувствительности к инсулину (например, каждые 15 мин на протяжении 240 мин). Если результат показывает, что уровень глюкозы в крови не демонстрирует тенденции к снижению с течением времени по сравнению со здоровой мышью, чувствительность к инсулину считали аномальной. Если результат у животных, получавших лечение, демонстрирует тенденцию к снижению с течением времени по сравнению с животными, не получавшими лечения, лечение с применением антител согласно настоящему изобретению считают эффективным.

Пример способа оценки чувствительности к инсулину.

Чувствительность к инсулину у субъекта-животного можно оценить с помощью теста чувствительности к инсулину.

Исследование чувствительности к инсулину осуществляли, вначале вводя инсулин внутрибрюшинно животному, голодавшему 12 ч, из расчета 0,5-0,85 ед на кг массы тела, а затем измеряя уровень глюкозы в крови (периферической крови) животного каждые 15 мин на протяжении 240 мин. Уровень глюкозы в крови измеряли указанным выше способом. Если результат показывал, что уровень глюкозы в крови не демонстрирует тенденции к снижению с течением времени по сравнению со здоровым животным, чувствительность к инсулину считали аномальной. Быстрее снижение с течением времени у животных, получавших лечение, по сравнению с животными моделями с СД2, не получавшими лечения, считали признаком эффективности лечения согласно настоящему изобретению.

(vii) Прочее.

Оценка полидипсии и полиурии.

Животных моделей с диабетом II типа исследовали на предмет тенденции к увеличению потребления воды и мочеиспускания после первого проявления диабета и во время лечения с применением анти-тел согласно настоящему изобретению.

Тенденцию к увеличению питья воды можно подтвердить, например, тщательно контролируя скорость снижения объема воды в бутылке с водой в клетке для молодняка и сравнивая ее с аналогичной скоростью для животного здоровой линии и для животных, не получавших лечения. Кроме того, тенденцию к повышенному мочеиспусканию можно подтвердить, например, путем наблюдения за степенью увлажнения полового покрытия в клетке для молодняка и ее сравнения, как указано раньше.

Выводы о наличии или отсутствии тенденции к ожирению у мышей.

У модельных животных с СД2, получавших и не получавших лечения, а также у здоровых животных измеряли и сравнивали массу тела. Снижение массы тела у животных, получавших лечение, по сравнению с животными, не получавшими лечения, и/или сопоставимую массу животных, получавших лечение, и здоровых животных, считали признаком эффективности лечения согласно настоящему изобретению.

2) Гистопатологическое обследование.

Ткань поджелудочной железы животных с диабетом II типа, контрольных моделей с СД2, не получавших лечения, и здоровых животных фиксировали, заливали парафином, окрашивали и анализировали в соответствии со способами согласно примеру 4 на предмет амилоидных отложений амилина в β -клетках островков (островков Лангерганса) поджелудочной железы. Аналогичным образом, апоптоз β -клеток и выживание β -клеток оценивали путем иммуноокрашивания, используя соответствующие маркеры (например, окрашивание TUNEL и расщепленной каспазы-3 для выявления апоптоза и окрашивание инсулина для оценки площади β -клеток). Снижение количества амилоидных отложений или апоптоза β -клеток или увеличения выживания β -клеток в островках поджелудочной железы у животных, получавших лечение, по сравнению с животными, не получавшими лечения, или сопоставимый уровень у животных, получавших лечение, и у здоровых животных, оценивали в качестве признака эффективности профилактических или терапевтических способов согласно настоящему изобретению.

3) Содержание животных.

Модельных животных с диабетом II типа содержали в SPF-условиях в соответствии с описанием, приведенным ранее (Hull et al. (2003), Diabetes 52: 372-379; Butler et al. (2003), Diabetes 52: 2304-2314; Butler et al. (2004), Diabetes 53: 1509-1516). В возрасте 6 недель у h-IAPP (гемизиготных)/C57BL/6/DBA мышей, получавших питание с высоким содержанием жиров, была продемонстрирована стимуляция образования островкового амилоида (Hull et al. (2003), Diabetes 52: 372-379).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело человека против островкового амилоидного полипептида (IAPP) или его IAPP и/или proIAPP-связывающий фрагмент, характеризующееся тем, что указанное антитело:

- (i) распознает агрегаты IAPP и/или proIAPP человека, содержащие фибриллы и/или олигомеры IAPP и/или proIAPP, преимущественно по сравнению с физиологическими IAPP и/или proIAPP,
- (ii) не распознает патологические отложения пептида амилоида- β (A_{1-42}), и
- (iii) связывается с пептидом, содержащим эпитоп IAPP, содержащим аминокислотную последовательность KCNTATCATQ (SEQ ID NO: 9); причем антитело или его IAPP-связывающий фрагмент содержит в своей вариательной области следующие шесть участков, определяющих комплементарность (CDR) области V_H и V_L :

V_H -CDR1: положения 26-37 последовательности SEQ ID NO: 20,

V_H -CDR2: положения 52-67 последовательности SEQ ID NO: 20,

V_H -CDR3: положения 100-110 последовательности SEQ ID NO: 20,

V_L -CDR1: положения 24-38 последовательности SEQ ID NO: 22,

V_L -CDR2: положения 54-60 последовательности SEQ ID NO: 22,

V_L -CDR3: положения 93-101 последовательности SEQ ID NO: 22,

причем один или более CDR могут содержать одну или две консервативные замены аминокислот.

2. Моноклональное антитело человека против островкового амилоидного полипептида (IAPP) или его IAPP-связывающий фрагмент, характеризующееся тем, что указанное антитело:

- (i) распознает агрегаты IAPP человека, содержащие фибриллы и/или олигомеры IAPP, преимущественно по сравнению с физиологическим IAPP,
- (ii) не распознает патологические отложения пептида амилоида- β (A_{1-42}), и
- (iii) связывается с пептидом, содержащим эпитоп IAPP, содержащим аминокислотную последовательность KCNTATCATQ (SEQ ID NO: 9); причем антитело или его IAPP-связывающий фрагмент содержит в своей вариательной области следующие шесть участков, определяющих комплементарность (CDR) области V_H и V_L :

V_H -CDR1: положения 26-35 последовательности SEQ ID NO: 28,

V_H -CDR2: положения 50-66 последовательности SEQ ID NO: 28,

V_H-CDR3: положения 99-113 последовательности SEQ ID NO: 28,
 V_L-CDR1: положения 23-34 последовательности SEQ ID NO: 30,
 V_L-CDR2: положения 50-56 последовательности SEQ ID NO: 30,
 V_L-CDR3: положения 93-101 последовательности SEQ ID NO: 30,

причем один или более CDR могут содержать одну или две консервативные замены аминокислот.

3. Антитело по п.1, которое специфически связывает эпитоп IAPP, который содержит аминокислотную последовательность CNTATCA (SEQ ID NO: 5).

4. Антитело или IAPP/proIAPP-связывающий фрагмент по п.1, содержащие аминокислотную последовательность следующей области V_H и V_L:

NI-203.26C11-VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 -
QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGNYYWTWIRQPAGKGLEWIGHIYSSGTTNY
NPSLES

FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTISVDTSKNQFSLNSVTAADTAVYYCARPLATVPDAFNIWGQGTMTVSS
 NI-203.26C11-VK (последовательность вариабельной области легкой цепи VK)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 FR3
EIVMTQSPDSLAVSLGERATIKCKSSQSVLYSNKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG
 VPDRFS

-----CDR3-----JK-----
GSQSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSNPNTFGQGTKVEIK.

5. Антитело или IAPP-связывающий фрагмент по п.2, содержащие аминокислотную последовательность следующей области V_H и V_L:

NI-203.11B12-VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
QVQLVQSGAEVKKPGASMKVSCKASGYTFTNYYLHWVRQAPGQGLEWMGIINPSAGSTSY
AQKFQG

FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTMTRDTSTSTVYMESSLKSEDTAVYYCARDASAGIQIWFDAFDIWGQGTMTVSS
 NI-203.11B12-VL (последовательность вариабельной области легкой цепи VL)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3--
 --
QPVLTPPPSASASLGSSVCLTCTLNQSGHSSYTIAWHQQPGKAPRYLMKVEHNGNYNKGK
 GLPDRFS

-----CDR3-----JK-----
GSSSGADRYLAISNLQSEDEADYYCETWDTSTRVFGGGTKLTVL

6. Антитело по любому из пп.1-5, являющееся химерным антителом грызуна-человека или родентизированным антителом.

7. Антитело или IAPP/proIAPP-связывающий фрагмент по любому из пп.1-6, причем IAPP/proIAPP-связывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv), F(ab')-фрагмента, F(ab)-фрагмента и F(ab')₂-фрагмента.

8. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его IAPP/proIAPP-связывающий фрагмент по любому из пп.1, 3, 4, 6 и 7.

9. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его IAPP/proIAPP-связывающий фрагмент по любому из пп.2 и 5-7.

10. Вектор для экспрессии антитела по любому из пп.1, 3, 4, 6 и 7, содержащий полинуклеотид по п.8.

11. Вектор для экспрессии антитела по любому из пп.2 и 5-7, содержащий полинуклеотид по п.9.

12. Клетка-хозяин для экспрессии антитела по любому из пп.1, 3, 4, 6 и 7, содержащая полинуклеотид по п.8 или вектор по п.10.

13. Клетка-хозяин для экспрессии антитела по любому из пп.2 или 5-7, содержащая полинуклеотид по п.9 или вектор по п.11.

14. Способ получения антитела или его IAPP/proIAPP-связывающего фрагмента по любому из пп.1-7, включающий:

(а) культивирование клетки по п.12 или 13; и

(б) выделение указанного антитела или его иммуноглобулиновой(ых) цепи(ей) из культуры.

15. Антитело или его IAPP/proIAPP-связывающий фрагмент, кодируемые полинуклеотидом по п.8 или 9 или получаемые способом по п.14.

16. Антитело по любому из пп.1-7 или 15, меченое детектируемой меткой.

17. Антитело по п.16, отличающееся тем, что детектируемая метка выбрана из группы, состоящей

из фермента, радиоизотопа, флюорофора и тяжелого металла.

18. Антитело по любому из пп.1-7 или 15-17, присоединенное к лекарственному веществу.

19. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики метаболического заболевания, содержащая антитело по любому из пп.1-7 или 15, полинуклеотид по п.8 или 9, вектор по п.10 или 11 или клетку по п.12 или 13 и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Фармацевтическая композиция по п.19, являющаяся вакциной.

21. Фармацевтическая композиция по п.19 или 20, дополнительно содержащая агент, который можно применять для лечения сахарного диабета 2 типа (СД2) и/или в лечении или профилактике отторжения островков после клинической трансплантации островков поджелудочной железы.

22. Диагностическая композиция для идентификации олигомеров, агрегатов или фибрилл IAPP/proIAPP, IAPP и/или proIAPP, содержащая антитело по любому из пп.1-7 или 15-18, полинуклеотид(ы) по п.8 или 9, вектор(ы) по п.10 или 11 или клетку по п.12 или 13 и реагенты, традиционно применяемые в способах диагностики на основе иммунологических компонентов или нуклеиновых кислот.

23. Применение антитела по любому из пп.1-7 или 15-18 при профилактическом или терапевтическом лечении нарушения, связанного с IAPP и/или proIAPP.

24. Применение антитела по любому из пп.1-7 или 15-18 при мониторинге прогрессирования или ответа на лечение нарушения, связанного с IAPP и/или proIAPP.

25. Применение вектора по п.10 или 11 при профилактическом лечении, терапевтическом лечении и/или мониторинге прогрессирования или ответа на лечение нарушения, связанного с IAPP и/или proIAPP.

26. Способ диагностики или мониторинга прогрессирования островкового амилоидоза у субъекта, включающий определение присутствия олигомеров, агрегатов или фибрилл IAPP и/или proIAPP в образце субъекта диагностики, с применением антитела по любому из пп.1-7 или 15-18 путем приведения указанного образца в контакт с указанным антителом в условиях, дающих возможность образования комплексов антитело-антиген, и путем определения уровня таких комплексов, причем присутствие олигомеров, агрегатов или фибрилл IAPP и/или proIAPP указывает на предсимптоматический, продромальный или клинический сахарный диабет 2 типа (СД2) и/или недостаточность бета-клеток после клинической трансплантации островков поджелудочной железы, и повышение уровня олигомеров, агрегатов или фибрилл IAPP и/или proIAPP по сравнению с уровнем физиологического IAPP или по сравнению с референсным образцом, полученным из организма здорового контрольного субъекта или контрольного образца из организма того же субъекта, указывает на прогрессирование предсимптоматического, продромального или установленного сахарного диабета 2 типа (СД2) и/или недостаточности островков после клинической трансплантации островков поджелудочной железы у указанного субъекта.

27. Применение антитела по любому из пп.1-7 или 15-18 для получения композиции для *in vivo* детектирования или для нацеливания терапевтического или диагностического агента на IAPP и/или proIAPP в организме человека или животного.

28. Применение по п.27, отличающееся тем, что указанное *in vivo* детектирование включает позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭТ), оптическую визуализацию в ближнем инфракрасном спектре (NIR) или магнитно-резонансную томографию (МРТ).

29. Способ диагностики островкового амилоидоза, указывающего на предсимптоматический или клинический сахарный диабет 2 типа и/или недостаточность бета-клеток после клинической трансплантации островков поджелудочной железы у субъекта, включающий этап измерения уровня антитела, связывающего пептид KCNTATCATQ (SEQ ID NO: 9), в биологическом образце от указанного субъекта и сравнения результата измерения с уровнем, присутствующим у здоровых субъектов сопоставимого возраста и пола.

30. Набор для применения в диагностике или мониторинге прогрессирования островкового амилоидоза, причем указанный набор включает антитело по любому из пп.1-7 или 15-18, полинуклеотид(ы) по п.8 или 9, вектор(ы) по п.10 или 11 и/или клетку по п.12 или 13.

A NI-203.9A2-VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGDNTYYADSLKG

FR3-----CDR3-----JH-----
 RFTISRDN SKNTLYLQVNSLRPEDTAVYYCAKSPSSLLATYFDYWGQGLTVTVSS

NI-203.9A2-VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH после PIMC)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGDNTYYADSLKG

FR3-----CDR3-----JH-----
 RFTISRDN SKNTLYLQVNSLRPEDTAVYYCAKSPSSLLATYFDYWGQGLTVTVSS

NI-203.9A2-VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPSTLSASVGRVITITCRASESINSWLAWYQQKPGKPKLLIYKASSLQSGVPSRFSGSGS

-----CDR3---JK-----
 GTEFTLTISLQPDFFATYYCQQHNSYWTFGQGTKVEIK

NI-203.9A2-VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK после PIMC)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQMTQSPSTLSASVGRVITITCRASESINSWLAWYQQKPGKPKLLIYKASSLQSGVPSRFSGSGS

-----CDR3---JK-----
 GTEFTLTISLQPDFFATYYCQQHNSYWTFGQGTKVEIK

B NI-203.19H8-VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAIIWYDGSKEYYADSLKG

FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTISRDNSENTLYLQLHTLRVEDTAVYFCARTIASATVDHGMDVWGQGLTVTVSS

NI-203.19H8-VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DVVMTQSPSSVSASVGRVITITCRASHDITWVLAQQRPKAPNLLIFGASRLQSGVSPRFSGSGS

-----CDR3---JK-----
 GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTNFPPTFGQGTTRLEIK

C NI-203.26C11-VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGNYWFWIRQPAGKGLEWIGHIYSSGTTNYPNPSLES

FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTISVDTSKNQFSLNSVTAADTAVYYCARPLATVPDAFNIGQGTMVTVSS

NI-203.26C11-VK (последовательность вариабельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----
 EIVMTQSPDSLAVSLGERATIKCKSSQSVLYSNKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS

-----CDR3-----JK-----
 GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSNPNTFGQGTKVEIK

D NI-203.8E3-VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGGTFSSHTISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFDQ

FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTVTADKSTNTAYMELSSLRPEDTAVYYCAKGELEPRILYYGMDVWGRGTTVTVSS

NI-203.8E3-VK (последовательность вариабельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----
 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFHQRFQSPRRLIYKVSNRDSDGVPDRF

-----CDR3-----JK-----
 SGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCMQGSNWPQTFGQGTKVEIK

E NI-203.11B12-VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLVQSGAEVKKPGASMKVSKKASGYTFNYYLHWVRQAPGQGLEWMGIINPSAGSTSYAQKFDQ

FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTMTRDTSTSTVYMELSSLKSEDTAVYYCARDASGIQIWRDAFDIWGQTMVTVSS

NI-203.11B12-VL (последовательность вариабельной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----
 QPVLTPPPSASASLGSSVKLTCTLNSGHSSYTIAWHQQPGKAPRYLMKVEHNGNYNKGSGLPDRFS

-----CDR3-----JK-----
 GSSSGADRYLAISNLQSEDEADYYCETWDTSTRVFGGGTKLTVL

F NI-203.205F8-VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSVSSGSY~~Y~~WSWIRQPPGKLEWIGY~~I~~YYSGSTNYNPSLKS

FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYSCARV~~P~~YGYRGYDGA~~W~~YFDYWGQGT~~L~~VTVSS

NI-203.205F8-VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ~~Q~~KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS

-----CDR3----JK-----
 GTDFTLTISSLEPEDFAVYYC~~Q~~QRSNR~~F~~TFGPGTKVDIK

G NI-203.9B3-VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVA~~V~~IWYDGTKKYYADSVKG

FR3-----CDR3-----JH-----
 RFTTSRDNSKNTLSLQMNLSRAEDSAVYYCARGFSS~~S~~W~~E~~FG~~F~~W~~G~~GT~~L~~VTVSS

NI-203.9B3-VL (последовательность вариательной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTS~~G~~YIYG~~N~~YVSWYQ~~H~~PGKAPK~~V~~MIYEVTKRPSGVPDRFSG

-----CDR3-----JK-----
 SKSGNTASLTVSGLQAEDA~~V~~YYC~~A~~S~~Y~~AGS~~N~~N~~V~~VFGGGTKLTVL

H NI-203.19F2-VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSKASGGN~~F~~LSYSISWVRQAPGQGLEW~~M~~GGIIP~~I~~FGTPNYAQK~~F~~Q~~G~~

FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTITADKSTRTAYMELSSLRFD~~D~~TAVYYCADAT~~R~~PGTAASGFY~~Y~~YGMDV~~W~~GQGT~~T~~VTVSS

NI-203.19F2-VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVMTQSPDTLSVSPGERATLSCRASQSVNN~~N~~LAWFQ~~Q~~KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGS

-----CDR3----JK-----
 GTEFTLTISSLQSEDFAVYFC~~Q~~QSHN~~W~~P~~T~~FGPGTKVDIK

I NI-203.15C7-VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EVQLVETGGGVVQPGMSLKLSCAASGFTFSTY~~T~~MHWVRQAPGKLEWVS~~F~~ISYDGRDKYYADSVKG

FR3-----CDR3-----JH-----
 RFTISRDNSKNM~~L~~YLQMN~~S~~LRDEDM~~A~~VYYCATL~~Q~~VW~~Q~~LYDY~~Y~~GMDV~~W~~GQGT~~T~~VTVSS

NI-203.15C7-VL (последовательность вариательной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGN~~N~~YVSWYQ~~L~~PGTAPKLLIYNSDKRPSGIPDRFSASKS

-----CDR3-----JK-----
 GTSATLGITGLQTGDEADY~~C~~ATWD~~T~~RLSAGV~~F~~GGG~~T~~KLTVL

Фиг. 1

A NI-203.1D10-VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTNSWIAWVRQMPGKGLDYVGIIYPGDSDTKYGPSFQG

FR3-----CDR3-----JH-----
 HVTISADNFANTAYLQWSSLKASDTAIYYCARRAAAAINWFDSWGQGTTLVTVSS

NI-203.1D10-VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3---
 DIQLTQSPPLSLVTPGEPASISCRSSQSLHPNGNDYLDWYVQKPGQSPQIVIIYMGSNRAAGVPDF

-----CDR3-----JK-----
 SSGSGTDFTLKISRVEAEDVGTYYCLQALRGYTFGQGTKEIK

B NI-203.2A11-VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QQLVQSGGGVQPGGSLRLSCVASGFTFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFTVRYDGSNKYYADSVKG

FR3-----CDR3-----JH-----
 RFTISRDNKNSLSLQMNSLRTEDTAVYYCAKEQEDHKEAFDYWGQGTTLVTVSS

NI-203.2A11-VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQRVTTIAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATDIPARFSGSGS

-----CDR3-----JK-----
 GTDFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNQWPLTFGGGKLEIK

C NI-203.10C4-VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EVQLVQSGAEVRKPGASVRVSCQTSQYSVTDYYLHWVRQAPGQGLEWVMGVMNPSNGNVGYPQKFQG

FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTMTADTSTGTVYMLTGLTAGDTAVYYCARGGSTPGQEVRSPhVLDLWGQGTTLVTVSS

NI-203.10C4-VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH после PIMC)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLVQSGAEVRKPGASVRVSCQTSQYSVTDYYLHWVRQAPGQGLEWVMGVMNPSNGNVGYPQKFQG

FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTMTADTSTGTVYMLTGLTAGDTAVYYCARGGSTPGQEVRSPhVLDLWGQGTTLVTVSS

NI-203.10C4-VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 DVVMTQSP^{LS}SVTPGQPASISCR^SDESLLHSDGRTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVS^{NR}FS^{GV}PNRF

-----CDR3-----JK-----
 SGSGSGTDFTL^{KI}SRVEAEDVGVYYCMQGVHFPQT^{FG}QGTKLEIK

NI-203.10C4-VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK после PIMC)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 DIVMTQ^TPL^SSVTPGQPASISCR^SDESLLHSDGRTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVS^{NR}FS^{GV}PNRF

-----CDR3-----JK-----
 SGSGSGTDFTL^{KI}SRVEAEDVGVYYCMQGVHFPQT^{FG}QGTKLEIK

D NI-203.20H9-VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLVQSGSELK^KPGASV^{KV}SCKASGYIFSKHG^{IN}WVRQAPGQGLEWIGWINTNTGNPT^{YA}QDFTG

FR3-----CDR3-----JH-----
 RFV^FSLDTSVSTAYLEISS^LKAEDTAVYYCARESEPIFGVIY^{MD}VWGKGT^{TV}VSS

NI-203.20H9-VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQMTQSPSSLSASVGD^{SV}ITCRASQ^SISTNLN^{WY}QKPGQAPT^{VLI}YAASSLQGGVPSRFRGRGS

-----CDR3-----JK-----
 GTYFTL^TISGLQPEDFATYYCQHNYNDL^{WT}FGQTKVEIK

E NI-203.26D2-VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLVESGGGVVQPGGSLRLS^{CA}ASGFTFRTCGMH^{WVR}QAPGKLEWVAFVRS^{DG}TTRYADSLMG

FR3-----CDR3-----JH-----
 RFTISRDN^{SK}NSLYLQMN^{SL}RPEDTALY^{CARE}KEDHREAFDYWGQGL^{TV}VSS

NI-203.26D2-VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVMTQSPATLSVSPGERATL^{SCR}ASQ^RVSTVAWYQKPGQAPRL^{LI}YDASTRATDIPARFSGSGS

-----CDR3-----JK-----
 GTDFTL^TISTLQSEDSAVYYCQY^{NR}WPLTFGGG^TKVEIK

F NI-203.60H3-VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EVQLVESGGGLARPGGSLRLS^{CA}VAGFTFSGYEM^{NWVR}QAPGKLEWISYISGPGDVIY^{YAD}SVKG

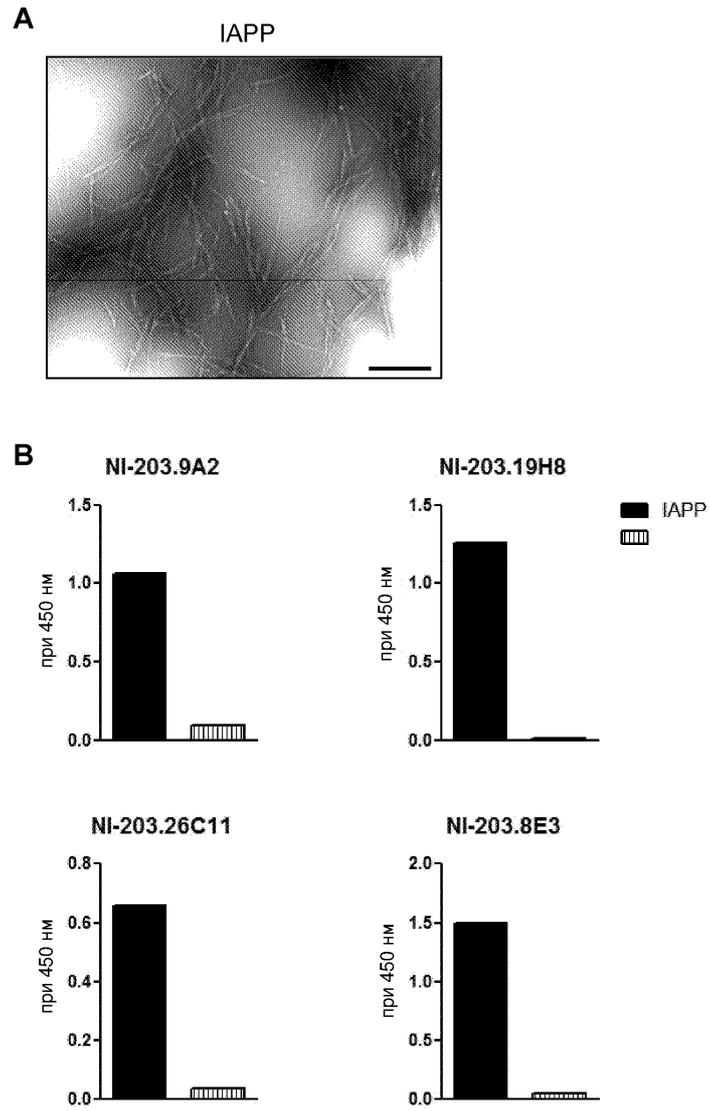
FR3-----CDR3-----JH-----
 RFTISRDN^{AK}NSLFLQMN^{SL}RAEDTAVYYCTR^VPPDISYGF^{DY}WGQGL^{TV}VSS

NI-203.60H3-VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

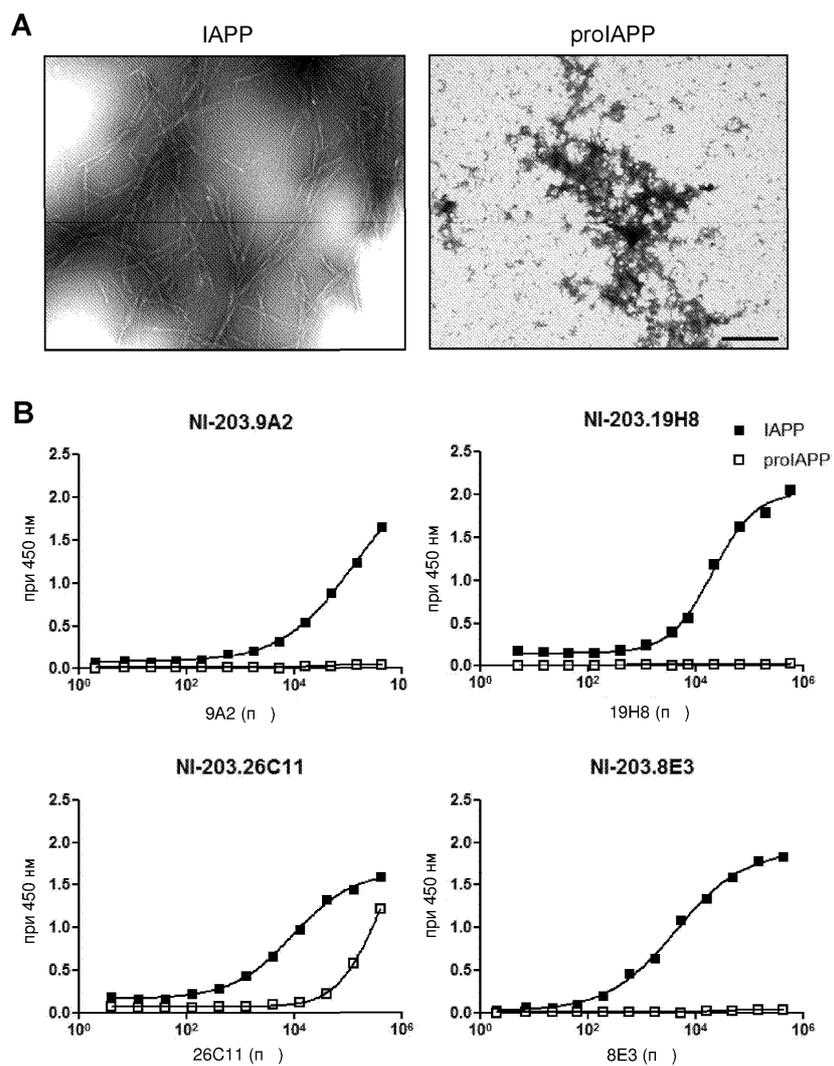
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQMTQSPSSLSASV^RDSVTITCRASQ^SISTYL^{NWY}QKPGKAPNLLIH^{DT}DILQSGVPSR^FSGTGS

-----CDR3-----JK-----
 GTDFTL^TISGLQPEDFATYYCQ^SYSTPPT^{FG}QGTKLEIK

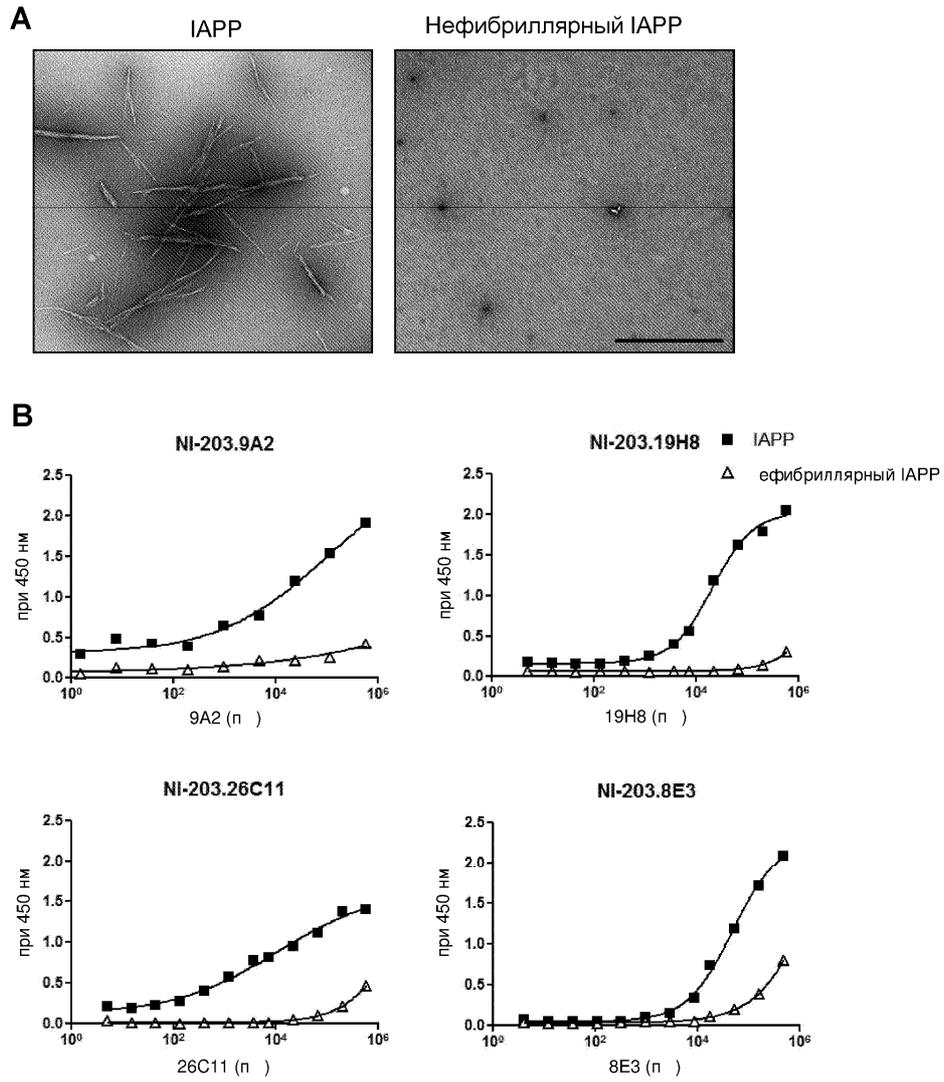
Фиг. 2



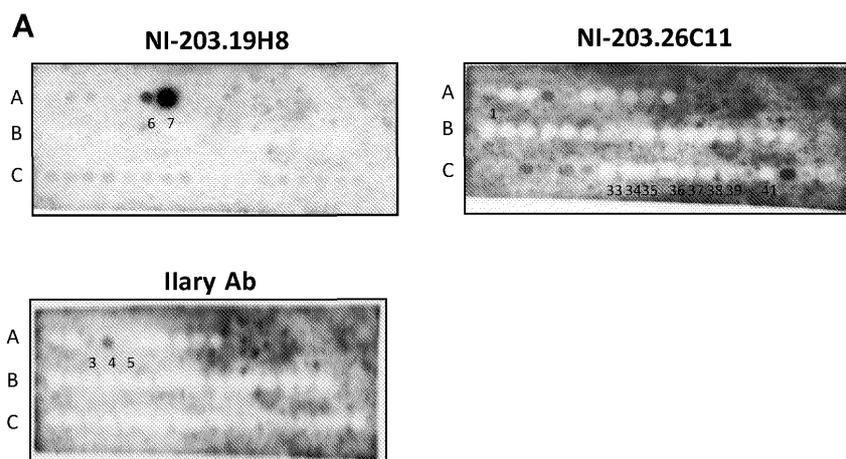
Фиг. 3



Фиг. 4



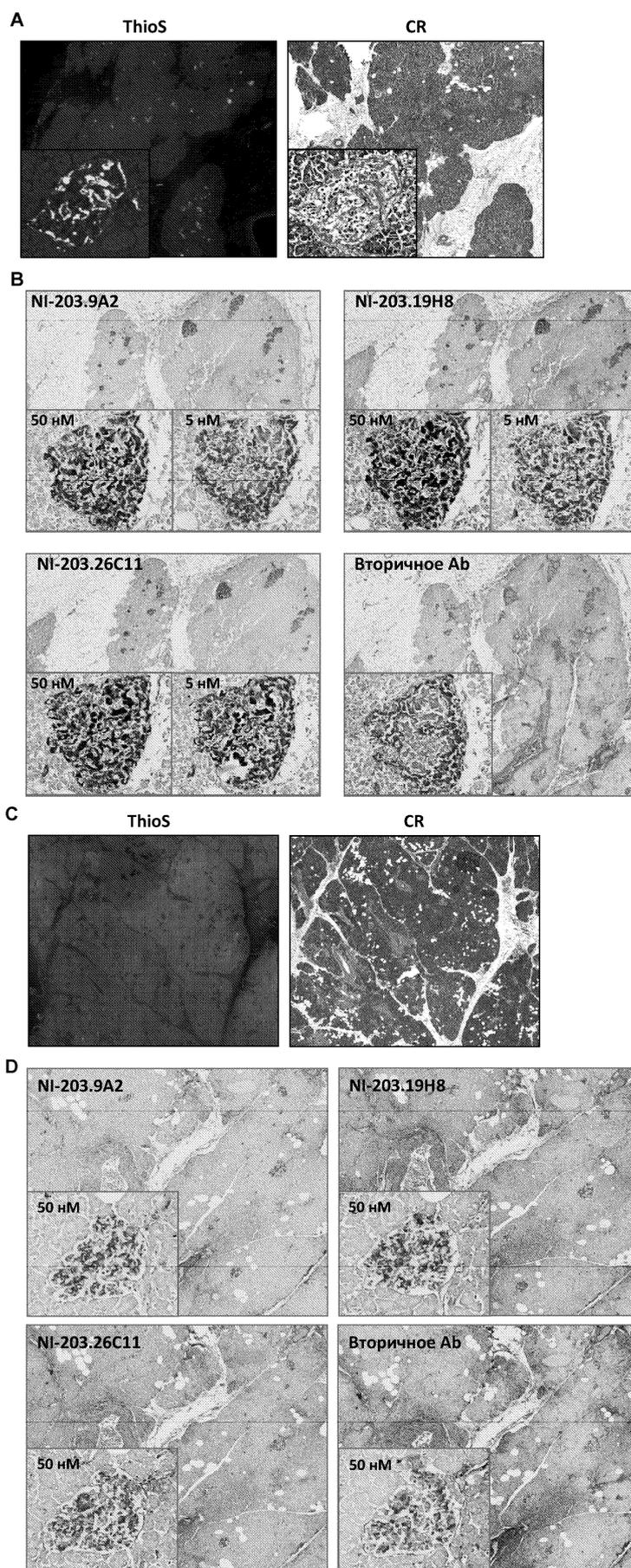
Фиг. 5

**B**

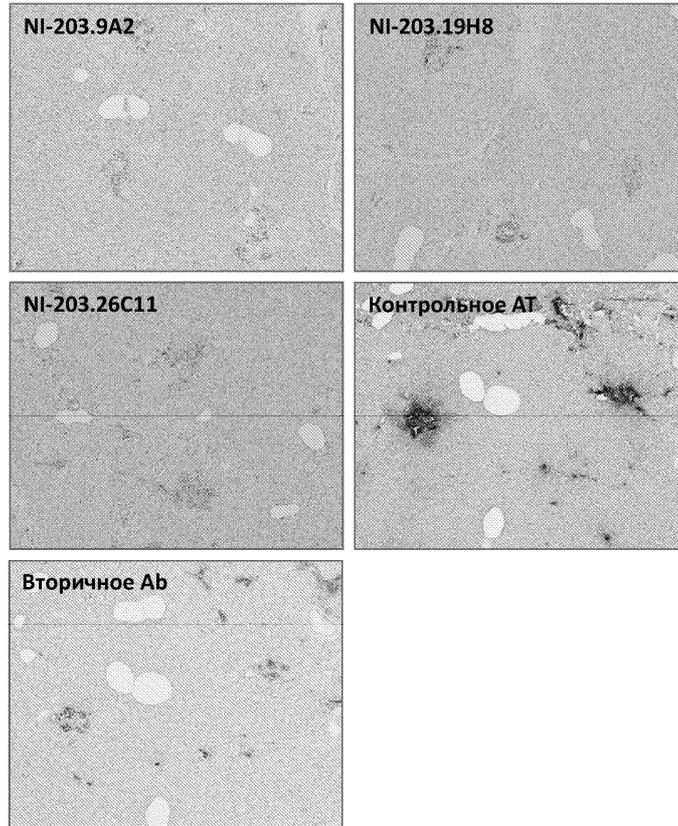
IAPP человека: 1-KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSSTNVGSNTY-37

Антитело	Эпитоп связывания
NI-203.9A2	NI
NI-203.19H8	19-SSNFGA-25
NI-203.26C11	N-концевая последовательность: 2- CNTATCA-8
NI-203.8E3	NI
NI-203.19F2	NI
NI-203.15C7	10-QRLANFLVHS-19

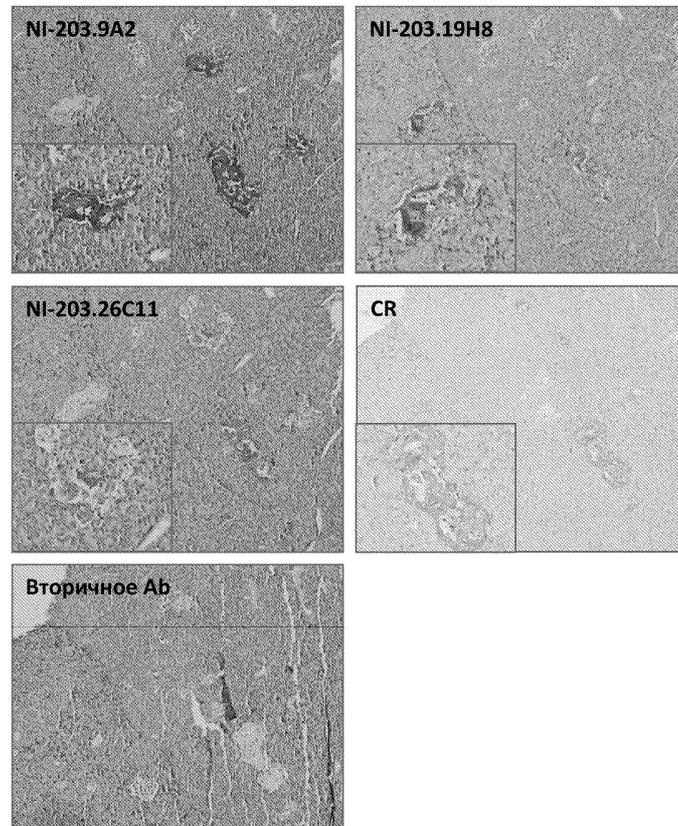
Фиг. 6



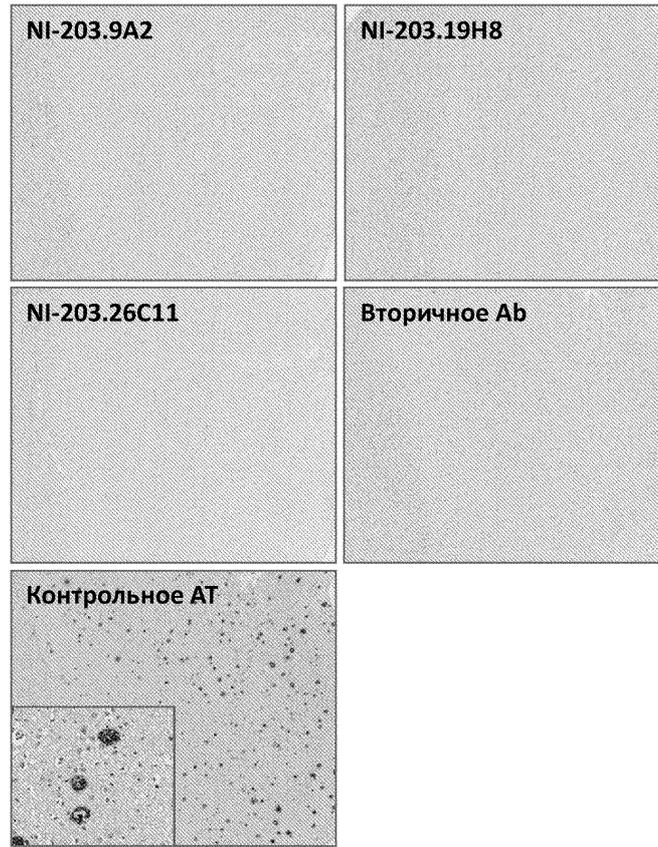
Фиг. 7



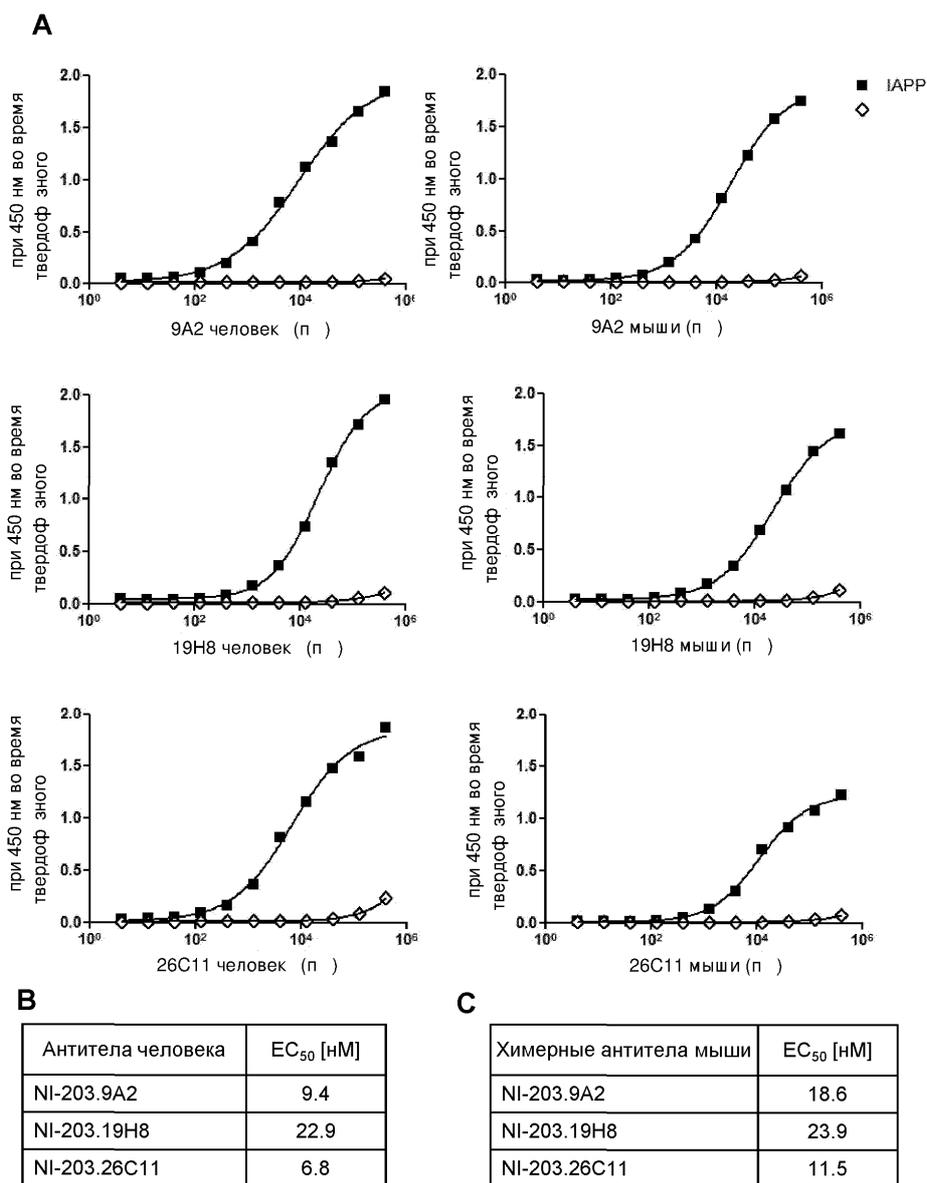
Фиг. 8



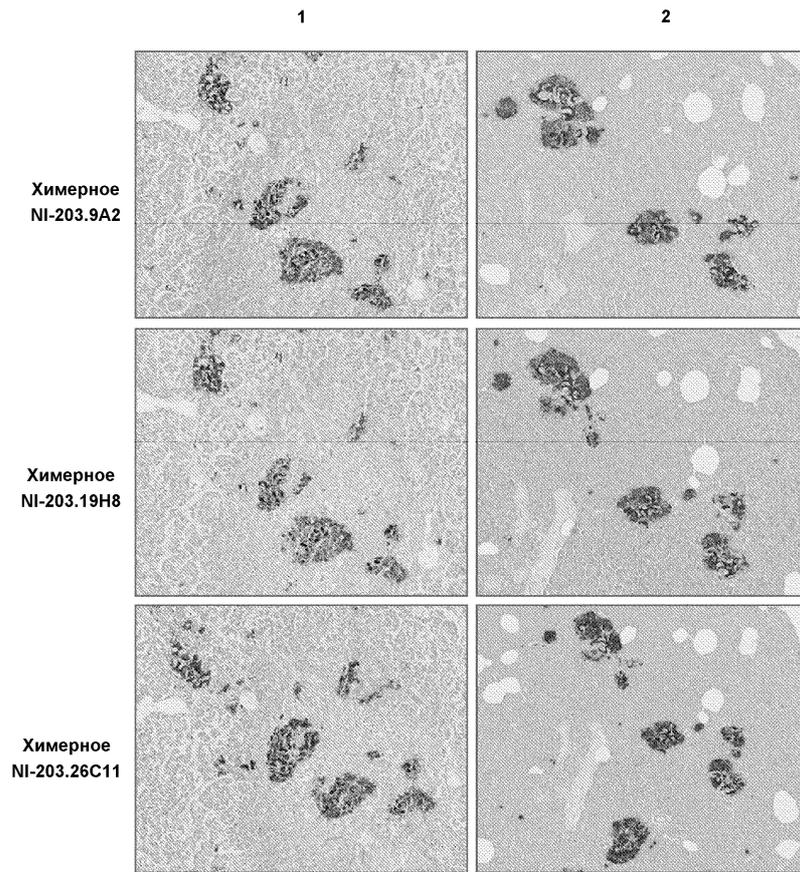
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12