



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.11

(21) Номер заявки
201790165

(22) Дата подачи заявки
2015.07.29

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) ПРОИСХОДЯЩИЕ ОТ ЧЕЛОВЕКА АНТИТЕЛА К ГЕНТИНГТИНУ (НТТ) И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 14179004.8

(32) 2014.07.29

(33) EP

(43) 2017.07.31

(86) PCT/EP2015/067327

(87) WO 2016/016278 2016.02.04

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

(72) Изобретатель:
Майер Марсель, Гримм Ян (CH)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) DAVID C. BUTLER ET AL.: "Bifunctional Anti-Huntingtin Proteasome-Directed Intrabodies Mediate Efficient Degradation of Mutant Huntingtin Exon 1 Protein Fragments", PLOS ONE, vol. 6, no. 12, 22 December 2011 (2011-12-22), page e29199, XP055160792, DOI: 10.1371/journal.pone.0029199, abstract, page e29199, right-hand column

LECERF J-M ET AL.: "Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ huntingtin aggregation in cellular models of Huntington's disease", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 98, no. 8, 10 April 2001 (2001-04-10), pages 4764-4769, XP002323805, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.071058398, abstract, page 4764, right-hand column, paragraphs 1,3 page 4765, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column, paragraph 3

US-A1-2003232052

JAN KO ET AL.: "New anti-huntingtin monoclonal antibodies: implications for huntingtin conformation and its binding proteins", BRAIN RESEARCH BULLETIN, ELSEVIER SCIENCE LTD, OXFORD, GB, vol. 56, no. 3-4, 1 October 2001 (2001-10-01), pages 319-329, XP002509144, ISSN: 0361-9230, DOI: 10.1016/S0361-9230(01)00599-8, abstract; figure 2

KHOSHMAN ALI ET AL.: "Effects of intracellular expression of anti-huntingtin antibodies of various specificities on mutant huntingtin aggregation and toxicity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 99, no. 2, 22 January 2002 (2002-01-22), pages 1002-1007, XP002401586, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.022631799, abstract, page 1003, right-hand

column, paragraph 1 - page 1004, right-hand column, paragraph 3

J. LEGLEITER ET AL.: "Monoclonal Antibodies Recognize Distinct Conformational Epitopes Formed by Polyglutamine in a Mutant Huntingtin Fragment", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, no. 32, 7 August 2009 (2009-08-07), pages 21647-21658, XP055161156, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M109.016923, abstract, page 21651, right-hand column, paragraph 3 - page 21654, right-hand column, paragraph 1

COLBY D. W. ET AL.: "Development of a Human Light Chain Variable Domain (VL) Intracellular Antibody Specific for the Amino Terminus of Huntingtin via Yeast Surface Display", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 342, no. 3, 17 September 2004 (2004-09-17), pages 901-912, XP004536915, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2004.07.054, abstract, page 905, left-hand column, paragraph 4 - page 907, right-hand column, paragraph 3

WO-A2-2005052002

C. LANDLES ET AL.: "Proteolysis of Mutant Huntingtin Produces an Exon 1 Fragment That Accumulates as an Aggregated Protein in Neuronal Nuclei in Huntington Disease", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 12, 19 March 2010 (2010-03-19), pages 8808-8823, XP055160798, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M109.075028, Supplemental data: Table of Primary Antibodies; figure 1

WO-A1-2008081008

SOUTHWELL AMBER L. ET AL.: "Intrabody Gene Therapy Ameliorates Motor, Cognitive, and Neuropathological Symptoms in Multiple Mouse Models of Huntington's Disease", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 29, no. 43, October 2009 (2009-10), pages 13589-13602, XP002752702, ISSN: 0270-6474, abstract, page 13598, left-hand column, paragraph 4 - page 13600, right-hand column, paragraph 4

SOUTHWELL AMBER L. ET AL.: "Intrabodies binding the proline-rich domains of mutant huntingtin increase its turnover and reduce neurotoxicity", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 28, no. 36, September 2008 (2008-09), pages 9013-9020, XP002752703, ISSN: 0270-6474, abstract, page 9018, left-hand column, paragraph 2 - page 9019, right-hand column, paragraph 1, page 9016, left-hand column, paragraph 1

DEHAY BENJAMIN ET AL.: "Mapping of the epitope of monoclonal antibody 2B4 to the proline-rich region of human Huntingtin, a region critical for aggregation and toxicity", BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 2, no. 5, May 2007 (2007-05), pages 559-564, XP002752704,

(57) В изобретении предложены новые происходящие от человека антитела к гентингтину (НТТ) и их биотехнологические производные, предпочтительно способные к связыванию мутированных и/или агрегированных видов НТТ, и/или их фрагментов, а также связанные с ними способы. Указанные происходящие от человека антитела к НТТ и их биотехнологические производные могут применяться в фармацевтических и диагностических композициях для направленной на НТТ иммунотерапии и диагностики болезни Гентингтона.

046697 B1

046697 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится в целом к основанной на антителах терапии болезни Гентингтона (БГ), которая ассоциирована с белком гентинггином (НТТ). В частности, настоящее изобретение относится к новым молекулам, специфически связывающимся с НТТ человека и/или его антигенам, в частности, к происходящим от человека антителам, а также НТТ-связывающим фрагментам, синтетическим и биотехнологическим производным указанных антител, которые могут быть применены для лечения заболеваний и состояний, индуцируемых такими изоформами НТТ, которые вызывают заболевание.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим и диагностическим композициям, содержащим такие НТТ-связывающие молекулы, антитела и их миметики, представляющие ценность как в качестве диагностического инструмента для выявления заболеваний и/или расстройств, связанных с агрегацией НТТ, так и для применения при стратегии пассивной вакцинации для лечения расстройств, связанных с заболеваниями, ассоциированными с НТТ-амилоидозом.

Уровень техники

Болезнь Гентингтона (БГ) представляет собой аутосомно-доминантное неврологическое амилоидогенное заболевание. Указанное аутосомное заболевание поражает от 5 до 10 индивидуумов на каждые 100 000 человек. Однако в США частота случаев данного заболевания значительно выше; исследования показали, что почти у 200 000 индивидуумов в США имеется 50% риск развития БГ; в частности, в США зарегистрировано 30 000 пациентов, при общем числе зарегистрированных в мире пациентов, составляющем 100 000.

Как показал ряд исследований, БГ развивается в результате экспансии (удлинения) тринуклеотидного повтора CAG в гене гентинггина (НТТ), в частности, в экзоне 1 гена НТТ, расположенного на хромосоме 4 (MacDonald et al., Cell 72, (1993), 971-983), которая приводит к образованию протяженного участка (тракта) полиглутамина (поли-Q) в белке НТТ в результате трансляции. БГ возникает, если длина полиглутаминового тракта превышает порог, составляющий 35-40 остатков глутамина, при этом существует выраженная обратная корреляция между длиной участка с повторами и возрастом, при котором происходит манифестация заболевания. Указанный поли-Q участок обуславливает неправильную укладку и агрегацию НТТ в нескольких областях организма, например, в нейронах и глиальных клетках. С возрастом происходит накопление агрегатов НТТ, что приводит к дегенерации ГАМК-эргических нейронов полосатого тела и кортикальных пирамидальных нейронов. Симптомы неправильной укладки и агрегации НТТ включают непроизвольные движения, нарушение координации движений, депрессию, снижение когнитивных способностей, например потерю памяти и/или деменцию.

Начиная с 1993 г., когда была идентифицирована мутация, обуславливающая БГ, понимание патофизиологии и молекулярной биологии указанного заболевания значительно улучшилось. Были разработаны медикаменты, такие как, например, ксеназин (Xenazine®) (тетрабеназин, Lundbeck), ингибирующее VMAT2 производное гексагидродиметоксibenзохинолизина, предназначенное для симптоматического лечения, направленного на непроизвольные мышечные движения.

Кроме того, в качестве потенциальных способов терапии было предложено использование подходов, основанных на сайленсинге генов, например, РНК-интерференции (RNAi). В частности, было показано, что применение миРНК против гена НТТ в модели БГ на мышах (R6/2) ингибирует экспрессию мутантного гена НТТ, см., например, источники: Warby et al., Am. J. Hum. Genet. 84 (2009), 351-366 и Olshina et al., Biological Chemistry 285 (2010), 21807-21816. При этом одно из ограничений указанного способа заключается в сложности введения достаточного количества миРНК в целевые клетки или ткани, как показано, например, Boudreau et al. (Brain Research 1338 (2010), 112-121). Кроме того, при указанном подходе может возникать необходимость обеспечения безопасности применения указанных подходов, так как исследования делеций генов в моделях на животных и на культивируемых клетках позволяют предположить необходимость постоянной экспрессии гентинггина (Dragatsis et al., Nat. Genet. 26 (2000), 300-306; Gauthier et al., Cell. 118 (2004), 127-138; Zuccato et al., Nat. Genet. 35 (2003), 76-83).

Соответственно, имеется потребность в новых терапевтических стратегиях эффективной и безопасной терапии заболеваний, связанных с агрегацией НТТ, предпочтительно непосредственно влияющих на образование амилоида мутантным НТТ.

Указанную техническую задачу решают варианты реализации настоящего изобретения, описанные в формуле изобретения и дополнительно описанные далее и проиллюстрированные примерами и чертежами.

Краткое описание изобретения

В соответствии с настоящим изобретением предложены антитела к гентинггину (НТТ) и эквивалентные НТТ-связывающие молекулы для применения при профилактическом или терапевтическом лечении заболеваний и состояний, связанных с НТТ-амилоидозом. Конкретнее, предложены подходящие для терапии происходящие от человека антитела, которые распознают мутированные и/или агрегированные формы НТТ, а также НТТ-связывающие фрагменты, синтетические и биотехнологические производные указанных антител.

В частности, в ходе экспериментов, проведенных в соответствии с настоящим изобретением, было успешно проведено рекомбинантное клонирование и получение происходящих от человека монокло-

нальных НТТ-специфических антител, специфических в отношении мутированных и/или агрегированных видов НТТ, и/или их фрагментов. Субъекты, представляющие собой людей, от которых получали В-клетки, из которых была выделена кДНК, кодирующая варибельный домен происходящих от человека моноклональных антител к НТТ, соответственно, являлись здоровыми донорами. Однако согласно другому варианту реализации настоящего изобретения В-клетки, из которых могут быть выделены происходящие от человека моноклональные антитела к НТТ и кДНК, кодирующие их варибельный домен, соответственно, получают от пациентов с БГ, у которых произошла экспансия тринуклеотидного повтора САG в гене НТТ, у которых отсутствуют симптомы, либо демонстрирующих необычно медленное прогрессирование или стабильное течение заболевания; либо, в качестве альтернативы, демонстрирующих типичные клинические признаки болезни Гентингтона. Кроме того, как показано на примерах, антитела согласно настоящему изобретению способны ослаблять потерю шипиков дендритов, улучшать показатели поведенческой активности при целенаправленном обучении для выполнения определенных задач и повышать сенсомоторные способности в модели БГ на мышах. Соответственно, разумно ожидать, что моноклональные антитела человека к НТТ согласно настоящему изобретению и их производные, помимо отсутствия иммуногенности, будут также обеспечивать благоприятный терапевтический эффект у человека.

Согласно настоящему описанию, в разделе "Уровень техники", описано, что к настоящему времени осуществляли попытки блокировать патогенез БГ с применением внутриклеточных способов, таких как РНК-интерференция (RNAi); см. также, например, Stanek et al., *Human Gene Therapy* 25 (2014), 461-474, где описан сайленсинг мутантного гентингтина с применением опосредованной аденоассоциированным вирусом РНК-интерференции. Что касается иммунотерапевтического подхода, на протяжении последнего десятилетия была исследована внутриклеточная экспрессия одноцепочечных фрагментов антител (scFv), т.е. интрател, лишенных константной области иммуноглобулина, например, класса IgG; см., например, выше и Butler et al., *Prog Neurobiol.* 97 (2012), для терапии сконструированными внутриклеточными scFv и однодоменными (dAb; нанотело) антителами с целью противодействия мутантному гентингтину и родственным токсическим внутриклеточным белкам.

Например, в источнике: Lecerc et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98 (2001), 4764-4769 описано антитело, состоящее из одноцепочечного фрагмента варибельной области (scFv), специфическое в отношении 17 N-концевых остатков гентингтина, смежных с полиглутамином, кодированном экзоном 1 при БГ, выбранное из большой библиотеки человека на основе фагового дисплея. Соответствующее scFv-антитело, scFv-C4, содержащее варибельную область легкой (V_L) цепи лямбда (Kvam et al., *PLoS One* 4 (2009), e5727; номер доступа GenBank ACA53373), согласно описанию, обладает некоторым нейропротекторным действием у трансгенных мышей B6.CgHDR6/1 в модели БГ на мышах, однако, указанное действие ослабевает как при большей тяжести заболевания, а также с течением времени после введения. Для улучшения показателей стабильной концентрации интратела и для направления N-концевых фрагментов белка, кодированных экзоном 1 htt (httex1), связанных scFv-C4, в протеасому для деградации с целью предотвращения их агрегации, к антителу scFv-C4 присоединяли сигнальную последовательность PEST орнитиндекарбоксилазы мыши (mODC); см. Butler and Messer, *PLoS One* 6 (2011), e29199. О проведении экспериментов *in vivo* пока не сообщалось.

Также группа Khoshnan и др. занималась разработкой терапевтических средств на основе интрател к БГ и, в том числе, ими были описаны scFv-антитела против гентингтина, происходящие из моноклональных антител мыши, связывающие эпитопы полиглутамина (поли-Q), полипролина (поли-P) и C-конец, и их влияние на внутриклеточную экспрессию, агрегацию и токсичность мутантного гентингтина; см., например, Ko et al., *Brain Research* 56 (2001), 319-329, Khoshnan et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99 (2002), 1002-1007 и Legleiter et al., *J. Biol. Chem.* 284 (2009), 21647-21658 и их заявку на патент США 2003/0232052 A1. В заявке на патент США также описано scFv-антитело "человека", называемое "hMW9", которое было выделено из фаговой библиотеки scFv человека с применением рекомбинантного мутантного белка гентингтина. Однако в отличие от полученных из моноклональных антител мыши scFv MW1, MW2, MW7 и MW8, данных о последовательности hMW9 представлено не было; также о нем более не сообщалось до настоящего времени.

В источнике Colby et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 342 (2004), 901-912 описана разработка варибельного домена легкой цепи (V_L) внутриклеточного антитела человека, специфического в отношении аминоконца гентингтина с использованием библиотеки неиммунных антител человека на основе поверхностного дисплея на дрожжах. Указанное однодоменное интратело, состоящее только из домена легкой цепи лямбда исходного scFv, как сообщалось, ингибирует агрегацию гентингтина в бесклеточном анализе *in vitro*, а также в модели БГ в культуре клеток млекопитающих; см. также соответствующую международную заявку WO 2005/052002. В данном случае также еще не сообщалось об экспериментах *in vivo*.

Таким образом, очевидно, что существующие подходы на основе интрател либо подходят только для клеточного анализа, либо их успешное применение в моделях БГ на животных, по меньшей мере, в долгосрочных экспериментах еще не было подтверждено. В частности, интратела обнаруживают ряд ограничений *in vivo*, таких как их потенциальная токсичность из-за внутриклеточного/внутриядерного накопления комплексов интратело-антиген, или ограниченное распределение, например, при вирусной

доставке в имеющие значительный объем области головного мозга у человека; см., например, Butler et al., *Prog. Neurobiol.* 97 (2012), 190-204 и Sothwell et al., *J. Neurosci.* 29 (2009), 13589-13602. Кроме того, общий недостаток внутриклеточных способов заключается в проблеме направления антитела и кодирующего его ДНК вектора, соответственно, в нужные клетки; и, при экзогенной доставке, неудобная схема введения, например, интрастриарные инъекции; см., например, Snyder-Keller et al., *Neuropathol. Exp. Neurol.* 69 (2010), 1078-1085. Кроме того, сохраняются и общие проблемы, связанные с генной терапией и применением вирусных векторов.

В то же время, эксперименты, проведенные в соответствии с настоящим изобретением, впервые показали, что полноразмерные IgG-антитела против разных эпитопов гентингина при системном введении могут быть успешно доставлены в головной мозг (пример 24 и фиг. 18), и что антитела согласно настоящему изобретению способны ослаблять потерю шипиков дендритов, улучшать показатели поведенческой активности во время целенаправленного обучения для выполнения определенных задач и повышать сенсорные способности в модели БГ на мышах (пример 34 и фиг. 34).

Соответственно, как показано в разделе "Примеры", антитело к НТТ или НТТ-связывающий фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное указанного антитела относится предпочтительно к классу IgG, то есть содержит, согласно общеизвестным данным и описанию в настоящем документе, два идентичных полипептида вариабельной области тяжелой (V_H) цепи и два идентичных полипептида вариабельной области легкой (V_L) цепи, а также константную область и домен, соответственно, т.е. по меньшей мере один или все константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3). Другими словами, согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены экспрессированные рекомбинантным способом бивалентные антитела, специфические в отношении гентингина и его агрегированных форм, фрагментов, пептидов и производных, подходящие для применения при лечении или диагностике *in vivo* гентингина и связанных с ним расстройств, и характеризующиеся наличием константной области иммуноглобулина. Дополнительно, согласно описанию ниже в настоящем документе, иммуноглобулин может относиться к любому классу, например IgG, IgM, IgA, IgG или IgE, и к соответствующим подклассам иммуноглобулинов (изотипам), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1. Предпочтительно однако указанное антитело относится к подтипу IgG человека.

Кроме того, дополнительно, согласно описанию в настоящем документе, происходящие от человека антитела согласно настоящему изобретению характеризуются наличием по меньшей мере одной или большего числа областей CDR, происходящих от человека, т.е. кодируемых кДНК, происходящей из В-клеток памяти человека; при этом предпочтительно V_H и/или V_L цепь также происходит из В-клеток памяти человека. Константная область или любой ее домен, в том случае, если он(а) происходит от человека, может происходить из того же источника, что и область(и) CDR(s) и V_H и/или V_L цепь, соответственно, либо из другого источника.

В указанном контексте, если не указано или не очевидно из контекста иное, упоминаемые в настоящем документе антитела согласно настоящему изобретению включают происходящие от человека антитела, проиллюстрированные примерами, а также их НТТ-связывающие фрагменты, синтетические и биотехнологические производные.

Дополнительно можно отметить, что согласно уровню техники, относящемуся к получению интрател, происходящих из фаговой библиотеки scFv человека, scFcv практически всегда получали из вариабельной легкой цепи V-лямбда; см. Kvam et al. и Colby et al., выше. При этом более чем для 90% происходящих от человека антител согласно настоящему изобретению используется легкая цепь V-каппа, в том числе в антителах NI-302.31F11 и NI-302.35C1, согласно примеру 24 способных проникать в головной мозг при системном введении, и, согласно примеру 34 (NI-302.35C1), оказывающих благоприятные эффекты на поведенческую активность и решение связанных с двигательной активностью задач у мышей в модели БГ на животных. Соответственно, возникает предположение, что антитела, содержащие легкую цепь V-каппа, могут обладать лучшими характеристиками по сравнению с антителами, содержащими легкую цепь, происходящую из V-лямбда. Соответственно, согласно предпочтительному варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению содержат вариабельную легкую цепь, происходящую из V-каппа.

Как показано в разделе примеров и на чертежах, антитело к НТТ, его НТТ-связывающий фрагмент, синтетический и биотехнологический вариант связывается с разными областями белка НТТ, кодируемыми экзоном 1, который демонстрирует "токсическое" изменение согласно описанию выше, т.е. удлинение за счет нестабильных тринуклеотидных повторов, как показано в разделе примеров. В частности, антитело согласно настоящему изобретению распознает полипролиновую область, полиглутаминовую/полипролиновую область, богатую пролином область, С-концевую область или N-концевую область белка НТТ, кодируемую экзоном 1. Эпитопы рассматриваемых антител, представленных в разделе примеров, обобщены на фиг. 20. Как упоминалось в разделе "Уровень техники", БГ возникает в тех случаях, когда длина полиглутаминового тракта превышает порог, составляющий 35-40 остатков глутамина, из-за агрегации НТТ. Соответственно, как показано в примере 3, получали агрегированные и растворимые белки Нтт, кодируемые экзоном 1, с 21, 35 или 49 полиглутаминовыми повторами и тестировали связывание идентифицированными антителами. Далее указанные конструкции будут обозначаться как HDX, при

этом X обозначает число остатков глутамина, например, экзон 1 НТТ с 21 полиглутаминовым повтором будет обозначен как HD21. Соответственно, если конкретным образом не указано иное, термин НТТ означает НТТ, кодируемый экзоном 1, и растворимый НТТ относится к соответствующим GST-гибридным белкам.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело к НТТ или НТТ связывающий-фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное указанного антитела способно(ен) преимущественно связывать агрегированные формы НТТ или формы НТТ с неправильной укладкой. Согласно описанию, например, в источнике: Legleiter et al., JBC 285 (19) (2010), 14777-14790 и в разделе примеров агрегация белков HDX, в отношении скорости и размеров, возрастает с увеличением числа остатков глутамина (Q).

Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения антитело к НТТ или его НТТ-связывающий фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное указанного антитела демонстрирует характеристики иммунологического связывания антитела, характеризующегося наличием любой из переменных областей V_H и/или V_L согласно фиг. 1. Предпочтительно, переменная область антитела содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) переменных областей V_H и/или V_L , т.е. пары цепей V_H и V_L согласно фиг. 1A-1AU, при этом возможна одна или большее число замен аминокислот, при условии, что сохраняется аналогичная специфичность связывания полученного антитела по сравнению с рассматриваемым антителом, содержащим соответствующую пару цепей V_H и V_L согласно фиг. 1A-1AU, как показано в разделе примеров, например, согласно общей информации на фиг. 20, т.е. сохраняется специфичность в отношении эпитопа и сохраняются значения EC_{50} того же порядка величины для определенного антигена, предпочтительно, в составляющем по меньшей мере 50%, более предпочтительно составляющем по меньшей мере 25% и наиболее предпочтительно составляющем по меньшей мере по меньшей мере 10% диапазоне величин. Предпочтительно, одна, две или все три области CDR цепи V_H и V_L содержат по меньшей мере одну консервативную аминокислоту в соответствующих положениях (т.е. идентичную аминокислоту или консервативную замену) по меньшей мере приблизительно для 20%, предпочтительно приблизительно для 40%, более предпочтительно приблизительно для 50% и наиболее предпочтительно приблизительно для 75% последовательностей аминокислот цепи V_H и V_L , соответственно, рассматриваемых антител, которые распознают один и тот же тип эпитопа НТТ, т.е. полипролиновую область, богатую пролином область, C-конец или N-конец. Например, выравнивание последовательностей рассматриваемых антител показывает присутствие преимущественно одного или двух тирозинов (Y) в CDRH1; см. фиг. 36. Аналогичная консервативная аминокислота может быть идентифицирована также и в других CDR.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения антитело к НТТ или его НТТ-связывающий фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное указанного антитела представляет собой биспецифическое антитело. Соответственно, антитело согласно настоящему изобретению может быть способно распознавать по меньшей мере два отличных эпитопа на одном или на разных антигенах. Например, первый антигенсвязывающий сайт, т.е. переменный домен может быть специфическим в отношении НТТ и предпочтительно содержит переменную область любого из рассматриваемых антител, представленных в прилагаемых примерах и на чертежах, и при этом второй антигенсвязывающий сайт может быть специфическим в отношении другого, предпочтительно также нейротоксического белка, и содержать переменную область соответствующего антитела. Таким образом, неправильная укладка и агрегация белка представляет собой основной отличительный признак нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП) и БГ. Хотя до недавнего времени общее мнение заключалось в том, что каждый подверженный агрегации белок характерен для определенного расстройства [α -синуклеин (α -syn) для БП, мутантный гентингтин (НТТ) для БГ, Таи и бета-амилоидный пептид для БА], все больше данных указывает на то, что подверженные агрегации белки на самом деле способны к совместной агрегации и взаимной модификации поведения и токсичности, так что, предположительно, указанный процесс может также вносить вклад в возникновение совпадающих клинических симптомов при разных заболеваниях; см., например, информацию о совместной агрегации α -syn и мутантного НТТ Pocas et al., Hum. Mol. Genet. 24 (2015), 1898-1907.

Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к НТТ или его НТТ-связывающий фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное указанного антитела представляет собой биспецифическое антитело, способное к связыванию НТТ и белка, связанного с нейродегенеративным расстройством, в частности, в головном мозге, предпочтительно, выбранного из группы, состоящей из α -синуклеина, Таи, бета-амилоидного пептида, SOD1, C9orf72 и TDP-43; см., например, Blokhuis et al., Acta Neuropathol. 125 (2013), 777-794. Происходящие от человека моноклональные антитела к указанным белкам известны в данной области техники; см., например, международную заявку WO 2008/081008, где описано антитело к А-бета, WO 2010/069603, где описано антитело к α -синуклеину; WO 2012/049570, где описано антитело к тау; WO 2012/080518, где описано антитело к SOD1; WO 2012/113775, где описано антитело к анкирину; WO 2013/061163, где описано антитело к TDP-43; и заявку на европейский патент EP 14187180.6 и последующую международную заявку, где

описано антитело к C9orf72. Биспецифические и мультиспецифические антитела могут быть получены с применением способов, хорошо известных в данной области техники, например, путем химической рекомбинации фрагментов моноклонального иммуноглобулина G1 согласно описанию, например, в источнике: Brennan et al., Science. 229 (1985), 81-83, или одновременного рекомбинантного коэкспрессирования подходящих тяжелой и легкой цепей и соответствующего спаривания; см., например, Lewis et al., Nature Biotechnology 32 (2014), 191-198; см. обзоры, например, в источниках: Kontermann, mAbs4 (2012), 182-197 и Kontermann and Brinkmann, Drug Discovery Today 20 (2015), 838-847.

Согласно альтернативному или дополнительному варианту би- или мультиспецифическое антитело содержит по меньшей мере первый и второй антигенсвязывающие сайты, т.е. вариабельный домен, специфический в отношении двух отличных эпитопов НТТ, при этом предпочтительно одна или обе вариабельные области происходят из любого из рассматриваемых антител, представленных в прилагаемых примерах и на чертежах, и дополнительно описанных в настоящем документе. Соответственно, согласно предпочтительному варианту реализации биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению содержит два связывающих сайта/домена антитела, которое распознает полипролиновую область, полиглутаминовую/полипролиновую область, богатую пролином область, С-концевую область, N-концевую область или конформационный эпитоп белка НТТ, кодируемого экзоном 1. Эпитопы рассматриваемых антител, проиллюстрированных примерами, обобщены на фиг. 20. Соответственно, согласно одному варианту реализации биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению распознает по меньшей мере два разных эпитопа, приведенных на фиг. 20, и отличается объединенными связывающими характеристиками когнатного рассматриваемого антитела, соответственно.

Антигенсвязывающий фрагмент любого из рассматриваемых антител согласно описанию в настоящем документе может представлять собой одноцепочечный Fv-фрагмент, F(ab')-фрагмент, F(ab)-фрагмент и F(ab')₂-фрагмент, или любой другой антигенсвязывающий фрагмент. При этом, как было упомянуто, согласно конкретному предпочтительному варианту реализации указанное антитело или его НТТ-связывающий фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное указанного антитела представляет собой антитело человека изотипа IgG и содержит по меньшей мере часть константной области. Как вариант, антитело представляет собой гибридное (химерное) антитело человека и грызуна; или содержащее элементы антител грызуна антитело, например антитело мыши или содержащее элементы антител мыши; антитело крысы или содержащее элементы антител крысы; варианты антител, происходящие от грызунов подходят, в частности, для применения в способах диагностики и для исследований на животных.

Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим антитело согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное указанного антитела, а также к способам иммунотерапии и иммунодиагностики с применением таких композиций для предотвращения, диагностики или лечения заболеваний и/или расстройств, связанных с НТТ-амилоидозом, отличающимся тем, что нуждающемуся в этом пациенту вводят эффективное количество указанной композиции.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим по меньшей мере вариабельную область цепи иммуноглобулина антитела согласно настоящему изобретению. Предпочтительно указанная вариабельная область содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) V_H и/или V_L вариабельной области согласно фиг. 1. Предпочтительно указанный полинуклеотид представляет собой кДНК.

Соответственно, настоящим изобретением также охвачены векторы, содержащие указанные полинуклеотиды, и трансформированные ими клетки-хозяева, а также их применение для получения антител и эквивалентных связывающих молекул, специфических для НТТ и предпочтительно способных связывать мутированные и/или агрегированные виды НТТ или их фрагменты. В данной области техники известны методы и способы рекомбинантного получения антител и их имитаторов, а также способы скрининга на конкурентно связывающие молекулы, которые могут представлять или не представлять собой антитела. Однако согласно описанию в настоящем документе, в частности, вариантов терапевтического применения у человека антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело человека в том смысле, что применение указанного антитела по существу не вызывает направленного против такого антитела иммунного ответа, который наблюдается при применении гибридных и даже гуманизированных антител. Таким образом, настоящее изобретение также относится к применению кДНК, вектора и клетки-хозяина, описанному в настоящем документе и проиллюстрированному в разделе примеров, для получения антитела к НТТ, в частности происходящего от человека антитела к НТТ или его биотехнологического производного.

Кроме того, предложены композиции и способы согласно описанию в настоящем документе, которые могут применяться для идентификации НТТ, в частности мутированных и/или агрегированных видов или фрагментов НТТ *in vitro*, например, в образцах и/или *in vivo*. Описанные антитела к НТТ и их связывающие фрагменты могут применяться для скрининга крови, плазмы, сыворотки, слюны, перитонеальной жидкости, спинномозговой жидкости ("СМЖ") и мочи человека на присутствие НТТ и/или мутированных и/или агрегированных видов НТТ или их фрагментов в образцах, например, с применением

анализа на основе ИФА (ELISA) или адаптированный поверхностный анализ. Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу диагностики или мониторинга прогрессирования (контроля) заболевания и/или расстройства, связанного с мутированными и/или агрегированными видами НТТ или их фрагментами, у субъекта, при этом указанный способ включает определение присутствия мутированных и/или агрегированных видов или фрагментов НТТ в образце от субъекта, у которого проводят диагностику, с применением по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению, или НТТ-связывающей молекулы, и/или связывающих молекул для мутированных и/или агрегированных видов или фрагментов НТТ, обладающих по существу такой же специфичностью связывания, что и что-либо из перечисленного, при этом присутствие мутированных и/или агрегированных видов или фрагментов НТТ указывает на наличие расстройства.

Соответственно, настоящее изобретение также относится к способу получения фармацевтической композиции для применения при лечении расстройства, связанного с агрегатами НТТ или вызываемого агрегатами НТТ, при этом указанный способ включает:

(а) экспрессирование кДНК согласно настоящему изобретению и/или культивирование клетки-хозяина согласно настоящему изобретению в условиях культивирования, подходящих для получения антитела к НТТ, в частности происходящего от человека антитела к НТТ или его биотехнологического производного;

(b) очищение указанного антитела, его биотехнологического производного или цепи(цепей) иммуноглобулина из реакционной смеси и культуры, соответственно, до фармацевтической степени чистоты и

(с) смешивание указанного антитела или его биотехнологического производного с фармацевтически приемлемым носителем.

Кроме того, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены антитела к НТТ и НТТ-связывающие молекулы, содержащие по меньшей мере одну область CDR антитела согласно настоящему изобретению, для получения композиции для *in vivo* детекции (также называемой *in vivo* визуализацией) или нацеливания терапевтического и/или диагностического агента на НТТ, в частности, мутированные и/или агрегированные виды или фрагменты НТТ в организме человека или животного. Способы и композиции согласно описанию в настоящем документе могут быть полезны при заболеваниях и/или расстройствах, связанных с агрегацией НТТ или амилоидозом и характеризующихся, например, возникновением агрегированных форм НТТ; они могут применяться для мониторинга прогрессирования заболевания и терапевтической эффективности применяемой терапии у субъекта, например, в связанных с *in vivo* визуализацией способах диагностики. Согласно одному варианту реализации указанная *in vivo* детекция (визуализация) включает сцинтиграфию, позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭТ), оптическую визуализацию в ближней инфракрасной области спектра (NIR) или магнитно-резонансную визуализацию (МРТ).

Таким образом, целью настоящего изобретения, в частности, является обеспечение способов лечения, диагностики или предотвращения заболевания и/или расстройства, связанного с НТТ-амилоидозом. Указанные способы включают введение субъекту предпочтительно антитела человека или производного антитела человека в эффективной концентрации, причем указанное антитело нацелено на НТТ или его фрагменты, предпочтительно мутированные и/или агрегированные виды НТТ, или виды НТТ с неправильной укладкой, или их фрагменты.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложен пептид, содержащий эпипептид НТТ, предпочтительно, мутированного и/или агрегированного вида НТТ или его фрагментов, специфически распознаваемый антителом согласно настоящему изобретению. Указанный пептид содержит или состоит из последовательности аминокислот, приведенной ниже в подробном описании и в примерах, или ее модифицированной последовательности, где заменена, удалена и/или добавлена одна или большее число аминокислот. Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ диагностики заболеваний и/или расстройств, связанных с НТТ-амилоидозом у субъекта, включающий этап определения присутствия антитела, которое связывается с указанным пептидом в биологическом образце, полученном от указанного субъекта.

Дополнительные варианты реализации настоящего изобретения будут очевидны из приводимых ниже описания и примеров.

Фиг. 1: Последовательности аминокислот переменных областей антител человека NI-302.33C11, NI-302.63F3, NI-302.35C1, NI-302.31F11, NI-302.2A2, NI-302.6N9, NI-302.74C11, NI-302.15F9, NI-302.39G12, NI-302.11A4, NI-302.22H9, NI-302.44D7, NI-302.37C12, NI-302.55D8, NI-302.7A8, NI-302.78H12, NI-302.71F6, NI-302.11H6, NI-302.3D8, NI-302.18A1, NI-302.8F1, NI-302.52C9, NI-302.46C9, NI-302.15E8, NI-302.15D3, NI-302.64E5, NI-302.7D8, NI-302.72F10, NI-302.12H2, NI-302.8M1 и NI-302.4A6. Отмечены каркасные (FR) и определяющие комплементарность области (CDR); области CDR выделены подчеркиванием. Использовали систему нумерации по Kabat (см. <http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

Фиг. 2: Определение характеристик белков и агрегатов гентингина (HTT), кодируемых экзон 1. (A) Клонирование экспрессионных конструкций GST-HttEx1Q21 (GST-HD21), GST-HttEx1Q35 (GST-HD35) и GST-HttEx1Q49 (GST-HD49); (B) окрашивание красителем кумасси при ДСН-ПААГ только очищенной GST (дорожка 1), белков GST-HttExon1-Q21 (GST-HD21, дорожка 2), GST-HttExon1-Q35

(GST-HD35, дорожка 3) и GST-HttExon1-Q49 (GST-HD49, дорожка 4), показывающее высокую чистоту, однако также и несколько дополнительных полос; (C) Определение характеристик продуктов реакций агрегации *in vitro* HD21, HD35 и HD49 с разрешением по времени с применением дот-блоттинга (слева) и анализа методом задержки на фильтре (справа) с поликлональным антителом HD-1 в качестве детекторного антитела. При реакциях агрегации HD35 через 24 ч или реакциях HD49 через 3 ч наблюдаются агрегаты, размер которых превышает размер пор 0,2 мкм, детектируемые HD-1 в анализе методом задержки на фильтре; (D) Определение *in vitro* состава HD35 и HD49 с применением электронной микроскопии. Реакции агрегации HD35 через 24 ч [A, E] или реакции HD49 через 1 ч [B, F], 3 ч [C, G] или 24 ч [D, H]. Общий вид [A-D] с увеличением 1000х и подробные структуры [E-H] с увеличением 66 000х.

Фиг. 3: Определение аффинности связывания антитела NI-302.33C11 с полипролиновым доменом. (A) аффинность связывания NI-302.33C11 в отношении разных видов HTT, определенная с применением прямого ИФА (ELISA); (B) определение EC₅₀ NI-302.33C11 для агрегированного HD49 (●), агрегированного HD21 (■), растворимого GST-HD49 (▲) и GST-HD21 (▼) белков Htt, кодируемых экзоном 1 с применением прямого ИФА (ELISA). Антитело NI-302.33C11 связывает с аналогичными значениями EC₅₀ все четыре вида HTT и (C) Анализ связывания NI-302.33C11 с агрегатами HTT *in vitro* в реакциях агрегации HD21, HD35 и HD49 с разрешением по времени с применением дот-блоттинга (слева) и анализа методом задержки на фильтре (справа), с предпочтительным связыванием на поздних стадиях реакций (агрегированных) HD35 и HD49 в анализах методом дот-блоттинга и агрегатов HD35 и HD49 в анализе методом задержки на фильтре.

Фиг. 4: Определение связывающего эпитопа антитела NI-302.33C11 путем сканирования перекрывающихся пептидов. Наверху: снимок Pepscan после гибридизации антитела NI-302.33C11. Внизу: общие изображения последовательностей пептидов, связанных антителом NI-302.33C11. Перекрывающиеся аминокислоты в пептидах (предполагаемый связывающий эпитоп), распознаваемые антителом NI-302.33C11, выделены в консенсусных последовательностях жирным шрифтом. Конъюгированное с HRP детекторное антитело осла против IgG Fcγ человека само по себе не связывает ни один из линейных пептидов гентингина.

Фиг. 5: NI-302.33C11 связывается с полипролиновым доменом HTT. Определение EC₅₀ для GST-HD49 (●), конъюгированного с БСА богатого пролином пептидного домена (◆), конъюгированного с БСА С-концевого пептида (■) или конъюгированного с БСА полипролинового пептида (▲) с применением прямого ИФА (ELISA).

Фиг. 6: Определение чистоты и целостности, а также специфичности связывания антитела NI-302.33C11. ДСН-ПААГ-анализ с последующим окрашиванием Кумасси 2 и 10 мкг рекомбинантного антитела человека NI-302.33C11 к полипролиновому домену.

Фиг. 7: Определение аффинности связывания антитела с богатым пролином доменом NI302.63F3.

(A) Аффинность связывания NI-302.63F3 в отношении разных видов HTT, определенная с применением прямого ИФА (ELISA); (B) определение EC₅₀ NI-302.63F3 для агрегированного HD49 (●), агрегированного HD21 (■), растворимого GST-HD49 (▲) и GST-HD21 (▼) белков Htt, кодируемых экзоном 1, с применением прямого ИФА (ELISA). Антитело NI-302.63F3 отличается аналогичными значениями EC₅₀ для всех четырех видов; (C) Определение характеристик антитела NI-302.63F3 для продуктов реакций агрегации *in vitro* HD21, HD35 и HD49 с разрешением по времени *in vitro* с применением дот-блоттинга (слева) и анализ методом задержки на фильтре (справа) с предпочтительным связыванием с гентингином, удлинненным за счет поли-Q трактов (HD49>HD35) в анализах методом дот-блоттинга, и агрегатов HD35 и HD49 в анализе методом задержки на фильтре.

Фиг. 8: Определение связывающего эпитопа антитела NI-302.63F3 путем сканирования перекрывающихся пептидов. Наверху: снимок Pepscan после гибридизации антитела NI-302.63F3. Внизу: общие изображения последовательностей пептидов, связанных антителом NI-302.63F3. Перекрывающиеся аминокислоты в разных пептидах (предполагаемый связывающий эпитоп), распознаваемые антителом NI-302.63F3, выделены жирным шрифтом в консенсусных последовательностях. Конъюгированное с HRP детекторное антитело осла против IgG Fcγ человека само по себе не связывает ни один из линейных пептидов гентингина.

Фиг. 9: NI-302.63F3 связывается с богатым пролином доменом HTT. Определение EC₅₀ для GST-HD49 (●), конъюгированного с БСА богатого пролином пептидного домена (◆), конъюгированного с БСА С-концевого пептида (■) или конъюгированного с БСА полипролинового пептида (▲) с применением прямого ИФА (ELISA).

Фиг. 10: Определение чистоты и целостности, а также специфичности связывания антитела NI-302.63F3. ДСН-ПААГ-анализ с последующим окрашиванием Кумасси 2 и 10 мкг рекомбинантного антитела человека NI-302.63F3 к богатому пролином домену.

Фиг. 11: Определение аффинности связывания антитела к С-концевому домену NI 302.35C1. (A) Аффинность связывания NI-302.35C1 в отношении разных видов HTT, определенная с применением прямого ИФА (ELISA); (B) определение EC₅₀ NI-302.35C1 для агрегированного HD49 (●), агрегированного HD21 (■), растворимого GST-HD49 (▲) и GST-HD21 (▼) белков Htt, кодируемых экзоном 1, с приме-

нением прямого ИФА (ELISA); (C) Определение характеристик антитела NI-302.35C1 для продуктов реакций агрегации *in vitro* HD21, HD35 и HD49 с разрешением по времени *in vitro* с применением дот-блоттинга (слева) и анализа методом задержки на фильтре (справа), с предпочтительным связыванием с поздними (агрегированными) продуктами реакции HD35 и HD49 в анализе методом дот-блоттинга, и агрегатов HD35 и HD49 в анализе методом задержки на фильтре.

Фиг. 12: NI-302.35C1 связывается с конъюгированным с БСА С-концевым пептидным доменом НТТ. Определение EC₅₀ для GST-HD49 (●), конъюгированного с БСА богатого пролином пептидного домена (◆), конъюгированного с БСА С-концевого пептида (■) или конъюгированного с БСА полипролинового пептида (▲) с применением прямого ИФА (ELISA).

Фиг. 13: Определение чистоты и целостности, а также специфичности связывания антитела NI-302.35C1. ДСН-ПААГ-анализ с последующим окрашиванием Кумасси 2 и 10 мкг рекомбинантного антитела человека NI-302 к С-концевому домену.

Фиг. 14: Определение аффинности связывания антитела с N-концевым доменом NI302.15E8.

(A) Аффинность связывания NI-302.15E8 в отношении разных видов НТТ, определенная с применением прямого ИФА (ELISA); (B) определение EC₅₀ NI-302.15E8 для агрегированного HD49 (●), агрегированного HD21 (■), растворимого GST-HD49 (▲) и GST-HD21 (▼) белков Нт, кодируемых экзоном 1 с применением прямого ИФА (ELISA). Антитело NI-302.15E8 отличается более высокими значениями EC₅₀ для аффинности связывания с неагрегированными видами.

Фиг. 15: NI-302.15E8 связывается с конъюгированным с БСА N-концевым пептидным доменом НТТ. Определение EC₅₀ для GST-HD49 (●), конъюгированного с БСА N-концевого пептида (▼), конъюгированного с БСА богатого пролином пептидного домена (◆), конъюгированного с БСА С-концевого пептида (■) или конъюгированного с БСА полипролинового пептида (▲) с применением прямого ИФА (ELISA).

Фиг. 16: Анализ специфичности в отношении мишени с применением прямого ИФА (ELISA). Антитела NI-302 (A) NI-302.33C11, (B) NI-302.63F3 и (C) NI-302.35C1 и (D) NI-302.15E8 не связывают нерелевантные агрегирующие белковые мишени, как показано в анализе специфичности связывания с применением прямого ИФА (ELISA).

Фиг. 17: Плотность шипиков значимо уменьшена в культурах срезов гиппокампа трансгенных мышей Tg(HDexon1)62Gpb/1J по сравнению с нетрансгенными однопометными животными. (A-D) Сравнение общего вида положительных по GFP гиппокампальных нейронов нетрансгенных однопометных животных (A, C) и мышей Tg(HDexon1)62Gpb/1J (B, D), и одиночный дендрит с индивидуальными шипиками при большем увеличении (C, D). (E) Значимое снижение плотности дендритных шипиков у трансгенных животных по сравнению с животными дикого типа (n=3-7 срезов на группу, включающую 2 животных дикого типа или 3 трансгенных животных). (F) Уменьшение потери плотности дендритных шипиков при применении антител NI-302.11F11 и 302.63F3 на срезах от трансгенных мышей. (n=8-13 срезов на группу, включающую всего 12 трансгенных животных). Представленные данные соответствуют среднему ± SEM. *p<0,05 (MWU), # p=0,05.

Фиг. 18: Проникновение антител NI-302 в головной мозг в модели на животных R6/1. (A) Средние уровни лекарственного средства NI-302.31F11 (●) и NI-302.35C1 (■) в плазме и головном мозге трансгенных животных R6/1 после одной внутрибрюшинной инъекции в дозе 50 мг/кг. Представленные данные соответствуют среднему ± SEM. n=3 для каждой группы; (B) Уровни лекарственного средства в плазме и головном мозге индивидуальных мышей после введения однократной дозы 50 мг/кг.

Фиг. 19: Определение EC₅₀ происходящих от человека НТТ антител для агрегированного HD49 (●), агрегированного HD21 (■), растворимого GST-HD49 (▲) и GST-HD21 (▼) белков Нт, кодируемых экзоном 1, с применением прямого ИФА (ELISA). Некоторые антитела (например NI-302.37C12 (I), NI-302.55D8 (J), NI-302.11A4 (F) или NI-302.22H9 (G)), по-видимому, связываются в основном с неусеченным белком GST-НТТ, что указывает на преимущественное распознавание указанными антителами конструкций с неусеченным растворимым GST-БГ, тогда как некоторые антитела (например, NI-302.74C11 (C) или NI-302.71F6 (M)) демонстрировали высокую аффинность связывания, при аналогичных значениях EC₅₀ со всеми составами с НТТ, что предполагает, что они связываются с эпитопом, аналогичным экспонируемому на конструкциях агрегированного неусеченного НТТ, кодируемого экзоном 1, в ИФА (ELISA).

Фиг. 20: Определение аффинности связывания с применением прямого ИФА (ELISA). Аффинность происходящих от человека НТТ-специфических антител по отношению к связыванию разных белков НТТ

Фиг. 21: Определение характеристик антител NI-302.44D7, NI-302.37C12, NI-302.15F9 и NI-302.71F6 для продуктов реакций агрегации *in vitro* HD21, HD35 и HD49 с разрешением по времени *in vitro* с применением дот-блоттинга (слева) и анализа методом задержки на фильтре (справа), с предпочтительным связыванием в частности, NI-302.15F9 и NI-302.71F6 с поздними (агрегированными) продуктами реакций HD35 и HD49 в анализах методом дот-блоттинга, и со стабильными в ДСН агрегатами HD35 и HD49 в анализе методом задержки на фильтре.

Фиг. 22: Анализ специфичности в отношении мишени с применением прямого ИФА (ELISA). Антитела NI-302 (A) NI-302.31F11, (B) NI-302.6N9, (C) NI-302.46C9, (D) NI-302.8F1, (E) NI-302.2A2, (F) NI-302.74C11, (G) NI-302.15F9, (H) NI-302.39G12, (I) NI-302.11A4, (J) NI-302.22H9, (K) NI-302.44D7, (L) NI-302.55D8, (M) NI-302.7A8, (N) NI-302.78H12, (O) NI-302.71F6, (P) NI-302.11H6, и (Q) NI-302.3D8 не связывают нерелевантные агрегирующие белковые мишени, как было показано в анализе на специфичность связывания с применением прямого ИФА (ELISA)

Фиг. 23: Определение связывающего эпитопа антитела NI-302 путем сканирования перекрывающихся пептидов. Наверху: снимок PerScan после гибридизации антитела NI-302. Внизу: приведены общие изображения последовательностей пептидов и показатели связывания антитела NI-302 с одиночными пептидами. Перекрывающиеся аминокислоты в разных пептидах (предполагаемый связывающий эпитоп), распознаваемые антителом NI-302, выделены серым цветом в консенсусных последовательностях. Конъюгированное с HRP детекторное антитело осла против IgG Fc γ человека само по себе не связывает ни один из линейных пептидов гентингтина. (A) 1 мкг/мл NI-302.31F11 на мембране с 21 спотом, (B) 1 мкг/мл NI-302.74C11 на мембране с 16 спотами, (C) 1 мкг/мл NI-302.15F9 на мембране с 16 спотами, (D) 1 мкг/мл NI-302.39G12 на мембране с 16 спотами, (E) 1 мкг/мл NI-302.11A4 на мембране с 16 спотами, (F) 1 мкг/мл NI-302.22H9 на мембране с 16 спотами, (G) 1 мкг/мл NI-302.44D7 на мембране с 16 спотами, (H) 1 мкг/мл NI-302.37C12 на мембране с 16 спотами, (I) 1 мкг/мл NI-302.55D8 на мембране с 16 спотами, (J) 1 мкг/мл NI-302.7A8 на мембране с 21 спотом, (K) 1 мкг/мл NI-302.78H12 на мембране с 16 спотами, (L) 1 мкг/мл NI-302.71F6 на мембране с 16 спотами, (M) 1 мкг/мл NI-302.11H6 на мембране с 21 спотом, (N) 1 мкг/мл NI-302.18A1 на мембране с 21 спотом, (O) 1 мкг/мл NI-302.3D8 на мембране с 21 спотом, (P) 1 мкг/мл NI-302.46C9 на мембране с 21 спотом и (Q) 1 мкг/мл NI-302.52C9 на мембране с 21 спотом, (R) 1 мкг/мл NI-302.2A2 на мембране с 21 спотом, (S) 1 мкг/мл NI-302.15E8 на мембране с 21 спотом и (T) 1 мкг/мл NI-302.15D3 на мембране с 21 спотом.

Фиг. 24: Иммуногистохимический анализ антител NI-302 показывает ярко выраженное окрашивание внутриядерных включений нейронов в стриарных нейронах на поздней стадии заболевания у трансгенных животных Tg(HDexon1)62Gpb/1J при использовании концентрации 5 нМ (74C11, 39C12, 11A4, 22H9, 78H12, 37C12, 7D8, 72F10) или 50 нМ (15F9, 71F6, 55D8, 44D7, 7A8, 64E5). Mab5492 представляет собой коммерчески доступное антитело к N-концу HTT.

Фиг. 25: Определение основных характеристик модели на трансгенных R6/1 мышах Tg(HDexon1)61Gpb/J. (A) Кривая выживания, (B) кривая массы тела и (C) общая масса сырой ткани головного мозга при прогрессировании заболевания в указанной модели на животных. (D-H) Определение наличия внутриядерных включений нейронов при прогрессировании заболевания в стриатуме путем окрашивания антителом к HTT NI-302.33C11.

Фиг. 26: Определение основных характеристик модели на трансгенных мышах B6C3-Tg(HD82Gln)81Dbo/J (N171-82Q). (A) Кривая выживания, (B) кривая массы тела при прогрессировании заболевания и (C) общая масса сырой ткани головного мозга на конечной стадии указанной модели на животных. (D-F) Определение наличия внутриядерных включений нейронов при прогрессировании заболевания в стриатуме путем окрашивания антителом Mab5492 к HTT.

Фиг. 27: Иммуногистохимический анализ при концентрации NI-302.33C11 (полипролиновый эпитоп), составляющей 50 нМ, показывает окрашивание внутриядерных включений нейронов в кортикальных нейронах у четырех разных пациентов с болезнью Гентингтона (A-D) и в стриарных нейронах трансгенных животных B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J на поздней стадии заболевания возрастом 270 дней, при концентрации 1 (E) и 5 нМ (F). Окрашивание у нетрансгенных однопометных животных не детектируется (G), если при окрашивании не используется первичное антитело (H) или при окрашивании контрольных образцов тканей, не пораженных болезнью Гентингтона, NI-302.33C11 в концентрации 50 нМ.

Фиг. 28: Иммуногистохимический анализ при концентрации NI-302.63F3 50 нМ (эпитоп богатого пролином домена) показывает окрашивание внутриядерных включений нейронов (A-C) и окрашивание некоторых нейритов (D) кортикальных нейронов у четырех разных пациентов с болезнью Гентингтона пациенты (A-D) и в стриарных нейронах трансгенных животных B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J на поздней стадии заболевания возрастом 270 дней, в концентрации 1 нМ (E) и 50 нМ (F). Окрашивание у нетрансгенных однопометных животных не детектируется (G), если при окрашивании не используется первичное антитело (H) или при окрашивании контрольных образцов тканей, не пораженных болезнью Гентингтона, 50 нМ NI-302.63F3.

Фиг. 29: Иммуногистохимический анализ с 100 нМ NI-302.35C1 (концевой эпитоп экзона 1) показывает окрашивание внутриядерных включений нейронов (A-C) и окрашивание некоторых нейритов (D) кортикальных нейронов у четырех разных пациентов с болезнью Гентингтона (A-D) и в стриарных нейронах трансгенных животных B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J на поздней стадии заболевания возрастом 270 дней в концентрации 1 нМ (E) и 50 нМ (F). Окрашивание у нетрансгенных однопометных животных не детектируется (G), если при окрашивании не используется первичное антитело (H) или при окрашивании контрольных образцов тканей, не пораженных болезнью Гентингтона, 100 нМ NI-302.35C1.

Фиг. 30: Иммуногистохимический анализ с коммерчески доступным антителом к поли-Q Mab1574 (1:2000, Chemicon) показывает окрашивание нейронных внутриядерных и цитоплазматических включе-

ний и окрашивание некоторых нейритов (A, D) кортикальных нейронов у четырех разных пациентов с болезнью Гентингтона (A-D) и в стриарных нейронах предсимптоматических трансгенных животных B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J) на поздней стадии заболевания возрастом 150 дней (E) и 270 дней (F). Окрашивание у нетрансгенных однопометных животных не детектируется (G), если при окрашивании не используется первичное антитело (H) или при окрашивании контрольных образцов тканей, не пораженных болезнью Гентингтона, антителом Mab 1574.

Фиг. 31: Определение ЕС₅₀ происходящих от человека НТТ антител для агрегированного HD49 (●), агрегированного HD21 (■), растворимого GST-HD49 (▲) и GST-HD21 (▼) белков Htt, кодированных экзоном 1, с применением прямого ИФА (ELISA). Некоторые антитела (например, NI-302.64E5 (A) или NI-302.7D8 (B)), по-видимому, связываются в основном с неусеченным белком GST-HD49 что указывает на преимущественное распознавание указанными антителами конструкций с неусеченным растворимым GST-БГ, содержащих более длинные полиглутаминовые повторы. Антитело NI-302.72F10 (C) демонстрирует преимущественное связывание с конструкциями HD21; некоторые антитела (например, NI-302.4A6 (D), NI-302.12H2 (E) или NI-302.8M1 (E)) демонстрировали высокую аффинность связывания, при аналогичных значениях ЕС, со всеми составами с НТТ, что предполагает, что они связываются с эпитопом, аналогичным экспонируемому на конструкциях агрегированного неусеченного НТТ, кодированного экзоном 1, в ИФА (ELISA).

Фиг. 32: Определение характеристик антител (A) NI-302.64E5, (B) NI-302.7D8, (C) NI-302.72F10, (D) NI-302.4A6, (E) NI-302.12H2, (F) NI-302.8M1 и (G) NI-302.33C11 (в качестве контроля) для продуктов реакций агрегации HD21, HD35 и HD49 *in vitro* с разрешением по времени с применением дот-блоттинга (слева) и анализа методом задержки на фильтре (справа) с предпочтительным связыванием в частности, NI-302.64E5 и NI-302.72F10 с поздними (агрегированными) продуктами реакций HD35 и/или HD49 в анализах методом дот-блоттинга и со стабильными в ДСН агрегатами HD35 и HD49 в анализе методом задержки на фильтре.

Фиг. 33: Анализ специфичности в отношении мишени с применением прямого ИФА (ELISA). Антитела NI-302 (A) NI-302.64E5, (B) NI-302.7D8, (C) NI-302.72F10, (E) NI-302.12H2 и (F) NI-302.8M1 не связывают нерелевантные агрегирующие белковые мишени, как было показано в анализе на специфичность связывания с применением прямого ИФА (ELISA), за исключением (D) NI-302.4A6, демонстрирующего некоторый уровень связывания р53.

Фиг. 34: Исследование действия связывающего С-концевой домен антитела NI 302.35C1 на поведенческую активность при целенаправленном обучении для выполнения определенных задач и сенсомоторные способности в модели БГ на мышах. (A) Тест с приподнятым крестообразным лабиринтом использовали для исследования уровня тревожности у мышей R6/1. В возрасте 6 месяцев получавшие NI-302.35C1 мыши R6/1 проводят меньше времени в открытых рукавах лабиринта, реже заходят в открытые рукава и реже совершают незащищенные наклоны головы в открытом рукаве по сравнению с получавшими основу животными R6/1. Таким образом, у получавших лечение NI-302.35C1 мышей R6/1 наблюдался характеризующийся большей тревожностью по сравнению с нетрансгенными однопометными животными фенотип. (B) У получавших NI-302.35C1 животных R6/1 наблюдались улучшенные показатели в тесте "вертикальный стержень" по сравнению с получавшими основу животными R6/1, достигая уровней, аналогичных уровням у нетрансгенных животных.

Фиг. 35: Определение связывающего эпитопа антитела NI-302 путем сканирования перекрывающихся пептидов. Наверху: снимок Pepscan после гибридизации антитела NI-302. Внизу: приведены общие изображения последовательностей пептидов. Перекрывающиеся аминокислоты в разных пептидах (предполагаемый связывающий эпитоп), распознаваемые антителом NI-302, приведены в консенсусной последовательности ниже. Конъюгированное с HRP детекторное антитело осла против IgG Fc γ человека само по себе не связывает ни один из линейных пептидов гентингтина. (A) NI-302.64E5, (B) NI-302.7D8, (C) NI-302.72F10, (D) NI-302.4A6, (E) NI-302.12H2, (F) NI-302.8M1, все антитела в концентрации 1 мкг/мл, на мембране с 21 спотом.

Фиг. 36: Выравнивание последовательности аминокислот областей CDR в V_H и V_L или V_K цепях антител NI-302. Каждую последовательность проверяли на наличие консервативных аминокислот, сегментов или других мотивов, указывающих на накопление остатков тирозина в областях CDR.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится в целом к иммунотерапии и неинвазивным способам детекции заболеваний и/или расстройств, а также состояний, связанных с присутствием патологических, часто мутантных и/или агрегированных форм гентингтина (НТТ). Более конкретно, настоящее изобретение относится к рекомбинантным происходящим от человека моноклональным антителам и их НТТ-связывающим фрагментам, синтетическим и биотехнологическим производным, которые были получены на основании информации о последовательностях, полученных от выбранных популяций доноров-людей, и способны связываться с такими изоформами НТТ и его антигенами. Рекомбинантное происходящее от человека моноклональное антитело согласно настоящему изобретению обеспечивает преимущество, состоящее в специфическом связывании с мутированными и/или агрегированными видами НТТ, и/или их фрагментами, что обеспечивает нацеливание для лечения или диагностики патологически изме-

ненных видов НТТ. Имеются основания предполагать, что, ввиду происхождения от человека, полученные согласно настоящему изобретению рекомбинантные антитела могут быть эффективными и безопасными при применении в качестве терапевтического агента, и высокоспецифичными в качестве диагностического реагента для детекции патологического НТТ без ложноположительных результатов.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению моноклонального антитела человека и любым его производным, описанным в настоящем документе, при лечении пациентов, отдельно или в сочетании с другими агентами, применяемыми при симптомах, связанных с НТТ-амилоидозом, отличающемся тем, что антитело согласно настоящему изобретению и любые его производные сконструированы для одновременного введения с агентом, подавляющим побочные эффекты, или последовательного введения до или после введения указанного антитела или его производных. В указанном контексте антитело к НТТ и НТТ-связывающий фрагмент согласно настоящему изобретению предпочтительно являются по существу неиммуногенными у человека. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие как моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению или любые его производные, так и одно или большее число лекарственных средств, применяемых при симптомах, связанных с НТТ-амилоидозом.

I. Определения

Если не указано иное, определения терминов в настоящем документе соответствуют определениям, предусмотренным Оксфордским словарем биохимии и молекулярной биологии, Oxford University Press (Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology), 1997, переработанным в 2000 г. и переизданным в 2003 г., ISBN 0198506732.

Следует отметить, что термины, приведенные в единственном числе, подразумевают "один или большее число"; например, термин "антитело" подразумевает одно антитело или большее число антител. Таким образом, термины в единственном числе, термин "один или большее количество" и "по меньшей мере один" могут применяться в настоящем документе взаимозаменяемо.

Гентингтин (НТТ), также известный как IT15, представляет собой ген заболевания, связанный с болезнью Гентингтона (БГ), нейродегенеративным расстройством, характеризующимся утратой стриарных нейронов. Считается, что БГ вызывается удлинённым нестабильным тринуклеотидным повтором в гене НТТ, который транслируется в полиглутаминовый повтор в белковом продукте. Для нормальных контролей был определен достаточно широкий диапазон числа тринуклеотидных повторов; число повторов, превышающее 35-40, было описано как патологическое. Лocus НТТ (NG_009378.1; 4830-174286; NCBI RefSeqGene) имеет значительный размер, охватывает 180 Кб и состоит из 67 экзонов.

В указанном контексте было продемонстрировано, что N-концевой фрагмент мутантного НТТ, т.е. белок, кодируемый экзоном 1 гена НТТ, удлинённый за счет повторов CAG, представляет собой "токсический" вид НТТ, достаточный для стимуляции агрегации и прогрессирующего неврологического фенотипа у трансгенных мышей; см., например, Mangiarini et al., Cell 87 (1996), 493-506 и Ross et al., Lancet Neurol. 10 (2011), 83-98, DiFiglia et al., Science 277 (1997), 1990-1993, Gutekunst et al., J Neurosci 19(7) (1999), 2522-2534.

Если не указано иное, под антителами, "специфически распознающими НТТ", "антителом, специфическим в отношении/для НТТ" и "антителом к НТТ" подразумеваются антитела, которые специфическим образом, в общем и целом, связываются с НТТ, при этом НТТ относятся к разным формам НТТ, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, к нативной форме НТТ, а также другим формам НТТ, например, патологически изменённым НТТ, таким как мутированные, с неправильной укладкой и/или агрегированные НТТ. В настоящем изобретении предложены происходящие от человека антитела, селективные в отношении полноразмерных НТТ и/или фрагментов НТТ, и/или мутированных, с неправильной укладкой и/или агрегированных форм НТТ.

В том случае, если конкретным образом не указано иное, термин "НТТ" используется взаимозаменяемо для специфического обозначения разных форм гентингтина (НТТ). Термин "НТТ" также используется для общего обозначения других конформеров НТТ, например, патологически изменённых форм НТТ, например, форм НТТ с неправильной укладкой и/или агрегированных форм НТТ. Кроме того, если конкретным образом не указано иное, термин НТТ означает, в частности, НТТ, кодируемый экзоном 1, а растворимый НТТ относится к соответствующим GST-гибридным белкам. Термин "НТТ" также используется для обозначения в совокупности всех типов и форм НТТ, таких как мутированный НТТ. Символы, добавленные в начале терминов, например, термина НТТ, используются для обозначения организма, из которого происходит конкретный ортолог, например, hНТТ в случае НТТ человека или mНТТ в случае происходящего от мыши НТТ.

Антитела к НТТ согласно описанию в настоящем документе специфически связывают НТТ и его эпитопы, а также различные конформационные формы НТТ и их эпитопы. Например, в настоящем документе описаны антитела, которые специфически связывают патологически изменённые виды НТТ или их фрагменты, такие как мутированные, с неправильной укладкой и/или агрегированные формы НТТ или их фрагменты. Термины (патологические) "мутированные", "с неправильной укладкой", и/или "агрегированные/агрегаты" НТТ используют взаимозаменяемо для специфического обозначения вышеупомянутых форм. Термин (патологические) "агрегированные формы" или "агрегаты" в настоящем документе описы-

вает продукты накопления или формирование кластеров в результате ошибочного/патологического взаимодействия НТТ друг с другом. Указанные агрегаты, сгустки или кластерные формы могут по существу состоять или состоят как из НТТ и/или фрагментов НТТ, так и из нефибриллярных олигомеров и/или фибриллярных олигомеров и их фибрилл. В настоящем документе упоминание антитела, которое "специфически связывает", "селективно связывает", или "преимущественно связывает" НТТ, относится к антителу, которое не связывает другие нерелевантные белки. В одном примере антитело к НТТ согласно описанию в настоящем документе способно связывать НТТ или его эпитоп и не демонстрирует связывания, более чем в 2 раза превышающего фоновое, для других белков. Согласно предпочтительному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению по существу не распознает нерелевантные амилоид-образующие белки, выбранные из группы, состоящей из парных спиральных филаментов (ПСФ)- τ ау, τ AU, альфа-синуклеина, TAR-ДНК-связывающего белка 43 (TDP43), островкового амилоидного полипептида (IAPP), транстиретина (TTR), сывороточного амилоида А (SAA); см. примеры 8, 13, 18 и 31. Антитело, которое "специфически связывает" или "селективно связывает" конформер НТТ, относится к антителу, которое не связывает все конформационные формы НТТ, т.е. не связывает по меньшей мере один другой конформер НТТ. Например, в настоящем документе описаны антитела, способные преимущественно связываться с мутированными и/или агрегированными формами НТТ, как *in vitro*, так и в тканях, полученных от пациентов с заболеваниями и/или расстройствами, связанными с НТТ-амилоидозом, или имеющих риск развития заболеваний и/или расстройств, связанных с НТТ-амилоидозом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению специфическим образом нацелены на разные области НТТ, кодированного экзон 1; см., например, фиг. 5, 9, 12, 14, 15. Поскольку антитела к НТТ согласно настоящему изобретению были получены от субъектов-людей, они могут также называться "аутоантителами человека" или "происходящими от человека антителами", чтобы подчеркнуть, что указанные антитела были фактически исходно экспрессированы субъектами, и не являются синтетическими конструкциями, полученными, например, с применением фаговых библиотек для экспрессии иммуноглобулинов человека, или ксеногенными антителами, продуцированными трансгенным животным, экспрессирующим часть репертуара иммуноглобулинов человека, что до настоящего времени было одним из распространенных способов при попытках получить антитела, подобные антителам человека. С другой стороны, происходящее от человека антитело согласно настоящему изобретению может называться синтетическим, рекомбинантным и/или биотехнологическим, чтобы отличить его от собственно антител сыворотки человека, которые могут быть очищены на колонке с белком А или колонке для аффинной хроматографии.

Однако особое преимущество терапевтического подхода согласно настоящему изобретению заключается в том, что антитела согласно настоящему изобретению происходят из В-клеток или В-клеток памяти здоровых субъектов-людей без признаков заболевания, при котором наблюдается возникновение НТТ с неправильной укладкой/агрегированного НТТ, или заболевания, связанного с НТТ, имеющим неправильную укладку/агрегированным НТТ, и, соответственно, указанные антитела с определенной вероятностью способны предотвращать клинические проявления заболевания, связанного с НТТ с неправильной укладкой/агрегированного НТТ, или уменьшать риск возникновения клинического проявления заболевания, или задерживать начало или прогрессирование клинического проявления заболевания. Как правило, антитела согласно настоящему изобретению также успешно прошли соматическое созревание, т.е. оптимизацию селективности и эффективности за счет высокой аффинности связывания целевой молекулы НТТ путем соматических мутаций переменных областей антитела. То, что *in vivo*, например, у человека такие клетки не были активированы родственными или другими физиологическими белками или клеточными структурами с возникновением аутоиммунной или аллергической реакции, также имеет большое медицинское значение, поскольку указывает на значимое повышение вероятности успешного прохождения через фазы клинических испытаний. Можно сказать, что эффективность, приемлемость и переносимость уже были продемонстрированы до доклинических и клинических разработок профилактического или терапевтического антитела по меньшей мере у одного субъекта-человека. Таким образом, можно ожидать, что специфическая эффективность в отношении целевых структур при использовании в качестве терапевтического агента, наряду с уменьшением вероятности побочных эффектов, значительно повышают клиническую вероятность успешного применения происходящих от человека антител к НТТ согласно настоящему изобретению.

В то же время, антитела, происходящие из библиотеки кДНК или фаговых дисплеев, представляют собой искусственные молекулы, как, например, гуманизированное антитело, происходящее, тем не менее, от мыши, и, соответственно, чужеродное для организма человека. Соответственно, клиническую ценность и эффективность терапевтических антител может ограничивать продуцирование антител к лекарственному средству (ADA), которые могут влиять на эффективность и фармакокинетику указанных антител и иногда приводить к серьезным побочным эффектам, см. например Igawa et al., MAbs. 3 (2011), 243-252. В частности, гуманизированные антитела или антитела, полученные с применением недавно появившихся технологий получения антител человека, в отличие от происходящих от человека антител, например, антител согласно настоящему изобретению, демонстрируют тенденцию к стимуляции синтеза антител; сообщалось, что указанные подобные антителам человека антитела, полученные, например, с

применением фагового дисплея, такие как адалимумаб, индуцируют синтез антител ADA, см., например, Mansour, Br. J. Ophthalmol 91 (2007), 274-276 и Igawa et al., MAbs. 3 (2011), 243-252. Соответственно, происходящие от человека антитела, не демонстрирующие тенденции к стимуляции нежелательного иммунного ответа, более благоприятны для пациента, чем искусственные молекулы, происходящие из библиотек или дисплеев.

Термином "пептид" охвачены также термины "полипептид" и "белок" (которые в настоящем документе иногда могут применяться взаимозаменяемо). Аналогичным образом охвачены также фрагменты белков и полипептиды, которые могут называться в настоящем документе "пептидами". Тем не менее, термин "пептид" предпочтительно относится к полимеру аминокислот, включающему 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 в соответствии с настоящим изобретением, как правило, содержит не более чем 100 последовательных аминокислот, предпочтительно менее чем 80 последовательных аминокислот и более предпочтительно менее чем 50 последовательных аминокислот.

Полипептиды:

В настоящем документе термин "полипептид" охватывает один "полипептид", а также совокупность "полипептидов", и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно соединенных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям из двух или большего числа аминокислот, и не относится к конкретной длине продукта. Соответственно, "пептиды", "дипептиды", "трипептиды", "олигопептиды", "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или большего числа аминокислот, включены в определение "полипептида"; термин "полипептид" может применяться вместо любого из указанных терминов или взаимозаменяемо с любым из указанных терминов.

Термин "полипептид" также относится к продуктам пост-экспрессионных модификаций полипептида, в том числе, без ограничения, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, амидирования и дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления или модификации не встречающимися в природе аминокислотами. Полипептид может происходить из естественного биологического источника или быть получен посредством рекомбинантной технологии, однако не обязательно транслируется с заданной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, в том числе путем химического синтеза.

Размер полипептида согласно настоящему изобретению может составлять приблизительно 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 отличаться определенной трехмерной структурой, хотя они не обязательно имеют такую структуру. Полипептиды с определенной трехмерной структурой называют имеющими укладку полипептидами, а полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, однако могут принимать значительное число разных конформаций, называют полипептидами без укладки. В настоящем документе термин гликопротеин относится к белку, связанному по меньшей мере с одним фрагментом углевода, который присоединен к указанному белку посредством кислородсодержащей или азотсодержащей боковой цепи или остатка аминокислоты, например, остатка серина или остатка аспарагина.

Под "выделенным" полипептидом или его фрагментом, вариантом или производным подразумевается полипептид, находящийся вне естественной для него среды. Конкретный уровень очищения не требуется. Например, выделенный полипептид может быть извлечен из его нативной или естественной среды. Полученные рекомбинантным способом полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, считают выделенными для целей настоящего изобретения, также как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были отделены, фракционированы, или частично или по существу очищены путем применения любой подходящей техники.

"Рекомбинантные пептиды, полипептиды или белки" относятся к пептидам, полипептидам или белкам, полученным с применением техник рекомбинантной ДНК, т.е. полученным из клеток микроорганизмов или млекопитающих, трансформированных экспрессионными конструкциями с экзогенной рекомбинантной ДНК, кодирующей гибридный белок, включающий требуемый пептид. Белки или пептиды, экспрессируемые в большинстве бактериальных культур, как правило, не содержат гликанов. Белки или полипептиды, экспрессируемые в дрожжах, могут отличаться паттерном гликозилирования, отличным от паттерна белков или полипептидов, экспрессируемых в клетках млекопитающих.

Полипептиды согласно настоящему изобретению включают фрагменты, производные, аналоги или варианты описанных выше полипептидов, а также любые их комбинации. Термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог" включают пептиды и полипептиды с последовательностью аминокислот, достаточно сходной с последовательностью аминокислот естественного пептида. Термин "достаточно сходные" означает, что первая последовательность аминокислот, которая содержит достаточное или минимально число идентичных или эквивалентных остатков аминокислот относительно второй последовательности аминокислот, так что указанные первая и вторая последовательности аминокислот имеют об-

щий структурный домен и/или отличаются общей функциональной активностью. Например, последовательности аминокислот, которые содержат общий структурный домен, идентичность которого составляет по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или по меньшей мере приблизительно 100%, определены в настоящем документе как достаточно сходные. Предпочтительно варианты достаточно сходны с последовательностью аминокислот предпочтительных пептидов согласно настоящему изобретению, в частности, НТТ, вариантов, производных или аналогов чего-либо из перечисленного. Такие варианты обычно сохраняют функциональную активность пептидов согласно настоящему изобретению. Варианты включают пептиды, последовательность аминокислот которых отличается от нативного пептида и пептида дикого типа, соответственно, за счет одного или большего числа удалений, добавлений и/или замен аминокислот. Они могут быть представлены встречающимися в природе вариантами, а также вариантами, сконструированными искусственным путем.

Кроме того, термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог" в отношении антител или полипептидов антител согласно настоящему изобретению включают любые полипептиды, которые сохраняют по меньшей мере некоторые антигенсвязывающие свойства соответствующей нативной связывающей молекулы, антитела или полипептида. Фрагменты полипептидов согласно настоящему изобретению включают протеолитические фрагменты, а также удаляемые фрагменты, помимо специфических фрагментов антител, обсуждаемых в других разделах настоящего документа. Варианты антител и полипептидов антител согласно настоящему изобретению включают фрагменты согласно описанию выше, а также полипептиды с измененными в результате замен, удалений или вставок аминокислот последовательностями. Варианты могут либо возникать естественным образом, либо представлять собой не встречающиеся в природе варианты. Не встречающиеся в природе варианты могут быть получены с применением известных в данной области техник мутагенеза. Варианты полипептидов могут включать консервативные или неконсервативные замены, удаления или добавления аминокислот. Производные специфически НТТ-связывающих молекул, например, антител и полипептидов антител согласно настоящему изобретению, представляют собой полипептиды, которые были таким образом изменены, что они демонстрируют дополнительные признаки, не обнаруживаемые у нативного полипептида. Примеры включают гибридные белки. Варианты полипептидов могут также называться в настоящем документе "аналогами полипептидов". В настоящем документе "производное" связывающей молекулы или ее фрагмента, антитела, или полипептид антитела относится к рассматриваемому полипептиду, содержащему один или большее количество химически дериватизированных остатков в результате проведения реакции с функциональной боковой группой. Также включены в качестве "производных" пептиды, которые содержат одно или большее количество встречающихся в природе производных двадцати стандартных аминокислот. Например, пролин может быть заменен 4-гидроксипролином; 5-гидроксилизин может быть заменен лизин; гистидин может быть заменен 3-метилгистидином; серин может быть заменен гомосерином; и лизин может быть заменен орнитином.

Определение сходства и/или идентичности молекул:

"Сходство" двух пептидов определяют путем сравнения последовательности аминокислот одного пептида с последовательностью второго пептида; см. Пример 35, а также фиг. 36. Аминокислота одного пептида аналогична соответствующей аминокислоте второго пептида, если она идентична указанной аминокислоте или представлена консервативной заменой аминокислоты. Консервативные замены включают описанные в источниках: Dayhoff, M.O., ed., *The Atlas of Protein Sequence and Structure* 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. (1978), и Argos, *EMBO J.* 8 (1989), 779-785. Например, аминокислоты, принадлежащие к одной из следующих групп, соответствуют консервативным изменениям или заменам: -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" двух полинуклеотидов определяют путем сравнения последовательности нуклеиновой кислоты одного полинуклеотида с последовательностью другого полинуклеотида. Нуклеиновая кислота одного полинуклеотида аналогична соответствующей нуклеиновой кислоте второго полинуклеотида, если она идентична или, если указанная нуклеиновая кислота представляет собой часть кодирующей последовательности, соответствующий триплет в указанной нуклеиновой кислоте кодирует ту же аминокислоту или консервативную замену аминокислоты.

Определение процента идентичности или сходства двух последовательностей предпочтительно осуществляют с применением математического алгоритма Карлина-Альтшуля (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), предоставляемые Национальным центром биотехнологиче-

ской информации (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Определение процента идентичности или сходства осуществляют с использованием стандартных параметров программ BLASTn для поиска полинуклеотидов BLAST и программ BLASTp для поиска белков BLAST, согласно рекомендациям на веб-странице NCBI и в руководстве "BLAST Program Selection Guide" относительно последовательностей определенной длины и состава.

Поиск полинуклеотидов BLAST осуществляют с помощью программы BLASTn.

Общие параметры: значение в окне "максимальное количество целевых последовательностей" (max target sequences) может быть определено как 100, параметр "поиск коротких последовательностей" (short queries) может быть включен, значение в окне "порог ожидания" (expect threshold) может быть определено как 1000; и значение в окне "длина сегмента" (word size) может быть определено как 7, согласно рекомендации для коротких последовательностей (менее 20 оснований) на веб-странице NCBI. Для более длинных последовательностей значение в окне "порог ожидания" может быть определено как 10, и значение в окне "длина сегмента" может быть определено как 11. Параметры оценки: значения "показатель совпадения/несовпадения" (Match/mismatch Scores) могут быть определены как 1, -2; "штраф за пропуск" (Gap Costs) может быть определен как линейный. Фильтры и маскирование: параметр "области низкой сложности" (Low complexity regions) может быть отключен; параметр "видоспецифические повторы" (Species-specific repeats) может быть отключен; параметр "Маска только для таблицы поиска" (Mask for lookup table only) может быть включен, параметр "настройки фильтров DUST" (DUST Filter Settings) может быть включен; и параметр "маскировать высококонсервативные положения" (Mask lower case letters) может быть отключен. В общем случае при этом может применяться "Поиск коротких почти точных совпадений" (Search for short nearly exact matches), включающий большинство описанных настроек. Соответствующая дополнительная информация приведена в руководстве "BLAST Program Selection Guide", опубликованном на веб-странице NCBI.

Поиск белков BLAST осуществляют с применением программы BLASTp. Общие параметры: значение в окне "максимальное количество целевых последовательностей" (max target sequences) может быть определено как 100, параметр "поиск коротких последовательностей" (short queries) может быть включен, значение в окне "порог ожидания" (expect threshold) может быть определено как 10; и значение в окне "длина сегмента" может быть определено как "3". Параметры оценки: в окне "матрица" (Matrix) может быть выбрана опция "BLOSUM62", значения в окне "штрафы за пропуски" определены как 11 для введения пропуска и 1 за продолжение пропуска, "коррекция состава" (Compositional adjustments) может быть определена как "Условная коррекция состава на основе матрицы вкладов" (Conditional compositional score matrix adjustment). Фильтры и маскирование: параметр "области низкой сложности" (Low complexity regions) может быть отключен, параметр "Маска только для таблицы поиска" (Mask for lookup table only) может быть отключен; и параметр "маскировать высококонсервативные положения" (Mask lower case letters) может быть отключен.

Модификации обеих программ, например, касающиеся длины искомы последовательностей, осуществляют в соответствии с рекомендациями в руководстве "BLAST Program Selection Guide", доступном в форматах HTML и PDF на веб-странице NCBI.

Полинуклеотиды:

Термин "полинуклеотид" включает одиночную нуклеиновую кислоту, а также совокупность нуклеиновых кислот, и относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты или конструкциям, например, матричной РНК (мРНК) или плазмидной ДНК (пДНК). Полинуклеотид может включать стандартную фосфодиэфирную связь или нестандартную связь (например, амидную связь, например, обнаруживаемую в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Термин "нуклеиновая кислота" относится к любому одному или большему числу сегментов нуклеиновых кислот, например, фрагментов ДНК или РНК, присутствующих в полинуклеотиде. Под "выделенной" нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом понимают молекулу нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая была извлечена из естественной среды. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий антитело, содержащийся в векторе, для целей настоящего изобретения считают выделенным. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, содержащиеся в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или по существу) полинуклеотиды в растворе. Выделенные молекулы РНК включают *in vivo* или *in vitro* РНК-транскрипты полинуклеотидов согласно настоящему изобретению. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением дополнительно включают такие молекулы, полученные синтетическим путем. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота может представлять собой или может включать регуляторный элемент, такой как промотор, участок связывания рибосомы или терминатор транскрипции.

В настоящем документе "кодирующая область" означает часть нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA, или TAA) не транслируется в аминокислоту, он может считаться частью кодирующей области, однако любые фланкирующие последовательности, например промоторы, участки связывания рибосомы, терминаторы транскрипции, интроны и т.п. не входят в кодирующую область. Две или большее число кодирующих областей согласно настоящему изобретению могут располагаться в одной полинуклеотидной конструкции, напри-

мер, на одном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например, на отдельных (разных) векторах. Кроме того, любой вектор может содержать одну кодирующую область, или может содержать две или большее число кодирующих областей, например, один вектор может отдельно кодировать вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина. Кроме того, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может кодировать гетерологичные кодирующие области, соединенные или не соединенные с нуклеиновой кислотой, кодирующей связывающую молекулу, антитело или его фрагмент, вариант или производное. Гетерологичные кодирующие области включают, без ограничения, специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен.

Согласно определенным вариантам реализации указанный полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В случае ДНК полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, обычно может включать промотор и/или другие элементы контроля транскрипции или трансляции, функционально связанные с одной или большим числом кодирующих областей. Функциональная связь означает, что кодирующая область генного продукта, например, полипептида, связана с одной или большим числом регуляторных последовательностей, таким образом, что экспрессия указанного генного продукта находится под влиянием или контролем указанной(ых) регуляторной(ых) последовательности(ей). Два фрагмента ДНК (например, кодирующая область полипептида и связанный с ней промотор) "функционально связаны", если индукция функции промотора приводит к транскрипции мРНК, кодирующей требуемый генный продукт, и если природа связи между двумя фрагментами ДНК не нарушает способность последовательностей регуляции экспрессии направлять экспрессию генного продукта или не влияет на возможность транскрипции ДНК-матрицы. Соответственно, промоторная область функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если указанный промотор способен обеспечивать транскрипцию указанной нуклеиновой кислоты. Промотор может представлять собой клеточноспецифический промотор, направляющий транскрипцию ДНК по существу только в определенных клетках. Другие элементы контроля транскрипции, помимо промоторов, например, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминирования транскрипции, могут быть функционально связаны с полинуклеотидом, направляя клеточноспецифическую транскрипцию. Подходящие промоторы и другие области контроля транскрипции описаны в настоящем документе.

Специалистам в данной области техники известны различные области контроля транскрипции. Указанные области включают, без ограничения, области контроля транскрипции, функционирующие в клетках позвоночных, такие как, не ограничиваясь перечисленными, промоторные и энхансерные сегменты цитомегаловирусов (немедленный ранний промотор, в сочетании с интроном-А), вирус обезьян 40 (ранний промотор) и ретровирусы (такие как вирус саркомы Рауса). Другие области контроля транскрипции включают происходящие из генов позвоночных, такие как актин, белки теплового шока, бычий гормон роста и β -глобин кролика, а также другие последовательности, способные контролировать генную экспрессию в эукариотических клетках. Дополнительные подходящие области контроля транскрипции включают тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также индуцируемые лимфокинами промоторы (например, промоторы, индуцируемые интерферонами или интерлейкинами).

Аналогичным образом, различные элементы контроля трансляции известны специалистам в данной области техники. Они включают, не ограничиваясь перечисленными, участки связывания рибосомы, кодоны инициации и терминирования транскрипции, и элементы, происходящие из пикорнавирусов (в частности, участок внутренней посадки рибосомы, или IRES, также называемый последовательностью CITE).

Согласно другим вариантам реализации полинуклеотид согласно настоящему изобретению представляет собой РНК, например, в форме матричной РНК (мРНК).

Полинуклеотиды и кодирующие области нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению могут быть связаны с дополнительными кодирующими областями, кодирующими секреторные или сигнальные пептиды, которые направляют секрецию полипептида, кодируемого полинуклеотидом согласно настоящему изобретению. В соответствии с гипотезой сигнальной последовательности, белки, секретлируемые клетками млекопитающих, содержат сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, отщепляемую от зрелого белка после начала экспорта растущей белковой цепи через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Специалистам в данной области техники известно, что полипептиды, секретлируемые клетками позвоночных, обычно содержат сигнальный пептид, соединенный с N-концом полипептида, который отщепляется от полного, или "полноразмерного" полипептида с получением секретлируемой, или "зрелой" формы указанного полипептида. Согласно определенным вариантам реализации используют нативный сигнальный пептид, например, сигнальный пептид тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина, или функциональное производное указанной последовательности, сохраняющий(ее) способность направлять секрецию функционально связанного с ним полипептида. Как вариант, может применяться гетерологичный сигнальный пептид млекопитающих или его функциональное производное. Например, лидерная последовательность дикого типа может быть заменена лидерной последовательностью тканевого активатора плазминогена (ТРА) человека или β -глюкуронидазы мыши.

"Связывающая молекула" в контексте настоящего изобретения относится в основном к антителам и их фрагментам, однако может также относиться к другим, не являющимся антителами молекулам, которые связываются с НТТ, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, молекулам гормонов, рецепторов, лигандов, анкиринов, главного комплекса гистосовместимости (МНС), шаперонов, таких как белки теплового шока (HSP), а также молекулам межклеточной адгезии, таким как представители суперсемейств кадгеринов, интегринов, лектинов С-типа и иммуноглобулинов (Ig). Соответственно, исключительно для наглядности и без ограничения объема настоящего изобретения в большинстве представленных ниже вариантов реализации описаны антитела и антителоподобные молекулы, представляющие собой предпочтительные связывающие молекулы при разработке терапевтических и диагностических агентов.

Антитела:

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

Согласно приведенному ниже более подробному описанию, термин "иммуноглобулин" включает различные обширные классы полипептидов, которые могут различаться биохимически. Специалистам в данной области техники понятно, что тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, ($\gamma, \mu, \alpha, \delta, \epsilon$), и включают ряд подклассов (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Природа указанной цепи определяет "класс" антитела: IgG, IgM, IgA IgG или IgE соответственно. Подклассы иммуноглобулинов (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.п., подробно описаны, и известно, что они обеспечивают функциональную специализацию. Специалист сможет легко отличить модифицированные варианты каждого из указанных классов и изотипов в свете настоящего описания и, соответственно, они входят в объем настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов явным образом включены в объем настоящего изобретения; последующее описание относится, в основном, к молекулам иммуноглобулина класса IgG. В случае IgG стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи, имеющих молекулярную массу, составляющую приблизительно 23 000 Да, и два идентичных полипептида тяжелой цепи, имеющих молекулярную массу 53000-70000. Указанные четыре цепи, как правило, соединены дисульфидными связями с формированием "Y"-образной конфигурации, в которой легкие цепи обрамляют тяжелые цепи, начинаясь у расширения "Y" и продолжаясь вдоль переменной области.

Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда (κ, λ). Тяжелая цепь любого класса может связываться как с легкой цепью каппа, так и с легкой цепью лямбда. В общем случае, легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны между собой, а "хвостовые" части двух тяжелых цепей соединены друг с другом посредством ковалентных дисульфидных связей или нековалентных связей, если указанные иммуноглобулины получены с применением гибридом, В-клеток или генетически сконструированных клеток-хозяев. Последовательности аминокислот тяжелой цепи начинаются на N-конце в области "вилка" Y-образной конфигурации и идут в направлении С-конца, расположенного в нижней части каждой цепи.

Как легкие, так и тяжелые цепи разделены на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константный" и "переменный" используют в функциональном смысле. В указанном отношении следует понимать, что переменные домены как легкой (V_L), так и тяжелой (V_H) цепи определяют распознавание антигенов и специфичность. В свою очередь, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) обеспечивают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная мобильность, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и т.п. По соглашению, нумерацию доменов константной области ведут в направлении удаления от антигенсвязывающего сайта или аминоконца антитела. N-концевая часть представляет собой переменную область; С-концевая часть представляет собой константную область; домены CH3 и CL, фактически, содержат карбоксильные концы тяжелой и легкой цепей, соответственно. Как отмечалось выше, переменная область позволяет антителу селективно распознавать и специфически связывать эпитопы на антигенах. Соответственно, домен V_L и домен V_H , или совокупность определяющих комплементарность областей (CDR) антитела в комбинации образуют переменную область, определяющую трехмерный антигенсвязывающий сайт. Указанная четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого "плеча" Y-образного антитела. Более конкретно, антигенсвязывающий сайт определен тремя областями CDR на каждой из цепей V_H и V_L . Любой фрагмент антитела или иммуноглобулина, который содержит достаточную для специфического связывания с НТТ структуру, в настоящем документе взаимозаменяемо называется "связывающим фрагментом" или "иммуноспецифическим фрагментом".

Встречающиеся в природе антитела содержат шесть гиперпеременных областей, иногда называемых "определяющими комплементарность областями (участками)", или "CDR", присутствующих в каж-

дом антигенсвязывающем домене и представляющих собой короткие содержащие несмежные участки последовательности аминокислот, расположенные специфическим образом, обеспечивающим образование антигенсвязывающего домена при принятии антителом трехмерной конфигурации в водной среде. Области "CDR" фланкированы четырьмя относительно консервативными "каркасными" областями, или "FR", демонстрирующими меньшую межмолекулярную вариабельность. Каркасные области в основном имеют β -складчатую конформацию, а области CDR образуют петли, соединяющие и, в некоторых случаях, образующие часть указанной β -складчатой структуры. Соответственно, функция каркасных областей заключается в формировании "скаффолда", обеспечивающего расположение областей CDR в правильной ориентации за счет межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образуемый расположенными заданным образом CDR, определяет поверхностную комплементарность эпитопу на иммунореактивном антигене. Указанная комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с когнатным эпитопом. Аминокислоты, составляющие области CDR и каркасные области, соответственно, любой вариабельной области тяжелой или легкой цепи могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области техники, поскольку они были точно определены; см. источники: "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); а также Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылок.

В том случае, если существует два или большее число определений термина, который используется и/или принят в данной области техники, определение термина в настоящем документе включает все такие значения, если явным образом не указано иное. Конкретным примером является применение термина "определяющая комплементарность область" ("CDR") для описания содержащих несмежные участки антигенсвязывающих сайтов, обнаруживаемых в составе полипептидов вариабельной области как тяжелых, так и легких цепей. Указанная конкретная область была описана в источниках: Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983), а также Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, включенных в настоящий документ посредством ссылки, при этом определения включают перекрывающиеся остатки или совокупности остатков сравниваемых последовательностей аминокислот. При этом предполагается, что использование любого определения, относящегося к CDR антитела или его вариантов входит в объем термина, определенного и используемого в настоящем документе. Подходящие остатки аминокислот, составляющие области CDR, согласно определению в каждом из указанных выше источников, приведены ниже в табл. I для сравнения. Точное количество остатков, составляющих конкретную область CDR, варьирует в зависимости от последовательности и размера указанной CDR. Специалисты в данной области техники могут с помощью стандартных методов определить остатки, составляющие конкретную гипервариабельную область или CDR антитела человека подтипа IgG, на основании последовательности аминокислот вариабельной области указанного 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

¹ Нумерация всех областей CDR в табл. I соответствует соглашениям о нумерации по Kabat et al. (см. ниже).

У Kabat et al. также описана система нумерации последовательностей вариабельных доменов, применимая к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначным образом определить любую последовательность вариабельного домена с применением указанной системы "нумерации по Kabat", не прибегая к каким-либо экспериментальным данным помимо собственно последовательности. В настоящем документе "нумерация по Kabat" относится к системе нумерации, представленной в источнике: Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983). Если не указано иное, приведенная нумерация конкретных положений аминокислот антитела или антигенсвязывающего фрагмента, его варианта или производного согласно настоящему изобретению соответствует системе нумерации Kabat, которая, однако, является теоретической и не может быть в равной степени применима к каждому антителу. Например, в зависимости от положения первой области CDR следующие области CDR могут сдвигаться в любом направлении.

Помимо происходящего от человека моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, синтетического или биотехнологического производного указанного антитела, которые рассмотрены, в частности, предпочтительными вариантами реализации настоящего изобретения, антитела

или их антигенсвязывающие фрагменты, иммуноспецифические фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленными, поликлональные, моноклональные, мультиспецифические антитела, антитела человека, гуманизированные, содержащее элементы антител приматов, содержащие элементы антител мыши или гибридные антитела, одноцепочечные антитела, связывающие эпитопы фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидами Fv (sdFv), фрагменты, содержащие домен V_L или V_H, фрагменты, полученные из экспрессионной библиотеки Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, антиидиотипические антитела к антителам согласно описанию в настоящем документе). Молекулы ScFv известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США 5892019. Молекулы иммуноглобулинов или антител согласно настоящему 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.

Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению не является IgM или его производным с пентавалентной структурой. Более конкретно, согласно конкретным вариантам применения настоящего изобретения, в частности, при терапевтическом применении, использование IgM является менее целесообразным, чем использование IgG и других бивалентных антител или соответствующих связывающих молекул, поскольку IgM, ввиду пентавалентной структуры и отсутствия аффинного созревания, часто демонстрируют неспецифическую перекрестную реактивность и очень низкую аффинность.

Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению не является поликлональным антителом, т.е. по существу образовано одним конкретным видом антител, а не смесью, полученной из образца иммуноглобулинов плазмы.

Фрагменты антител, в том числе одноцепочечных антител, могут содержать вариabельную(ые) область(и), отдельно или в комбинации со следующими полными или частичными последовательностями: шарнирная область, домены CH1, CH2 и CH3. Также в настоящее изобретение включены НТТ-связывающие фрагменты, которые содержат любую комбинацию вариabельной(ых) области(ей) 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 указанные антитела происходят из антител человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. Согласно другому варианту реализации указанная вариabельная область может происходить от хрящевых рыб (например, акул).

Согласно одному аспекту антитело согласно настоящему изобретению представляет собой происходящее от человека моноклональное антитело, полученное от человека, при этом экспрессирующая указанное антитело В-клетка, и, в свою очередь, антитело или предпочтительно кДНК, кодирующая вариabельный домен и, необязательно, кДНК когнатного константного домена, получено(а) от человека. Необязательно, каркасная область антитела человека выравнена и соотнесена с подходящими последовательностями вариabельной области зародышевой линии человека из базы данных; см., например, базу Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) (<http://www.vbase2.org/>) Центра конструирования белков Совета медицинских исследований (MRC Centre for Protein Engineering, Кембридж, Великобритания). Например, аминокислоты, потенциально происходящие из истинной последовательности зародышевой линии, могут на самом деле происходить из последовательностей ПЦР-праймеров, включенных во время процесса клонирования. По сравнению с искусственно полученными антителами, подобными антителам человека, например, одноцепочечными фрагментами антител (scFv), полученными из библиотеки антител на основе фагового дисплея или с применением ксеногенных мышей, моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению характеризуется (i) получением с использованием иммунного ответа у человека, а не суррогатных животных, т.е. указанное антитело было синтезировано в ответ на естественный НТТ в релевантной конформации в организме человека, (ii) защищает индивидуума или, по меньшей мере, оказывает значимое влияние на присутствующий НТТ, и (iii) поскольку антитело происходит от человека, риски перекрестной реактивности в отношении собственных антигенов минимизированы. Соответственно, в соответствии с настоящим изобретением термины "моноклональное антитело человека", "моноклональное аутоантитело человека", "антитело человека" и т.п. используют для обозначения НТТ-связывающей молекулы, которая происходит от человека, т.е. либо была выделена из клетки человека, например, В-клетки или гибридомы на основе В-клеток, либо ее кДНК была клонирована непосредственно из мРНК клетки человека, например В-клетки памяти человека. Антитело человека остается "человеческим", т.е. происходящим от человека, даже в том случае, если осуществляются замены аминокислот, например, для улучшения связывающих характеристик. В указанном контексте, в отличие от гуманизированных антител и иных подобных антителам человека антител, см. также обсуждение выше, происходящие от человека антитела согласно настоящему изобретению характеризуются наличием областей CDR, которые контактировали с организмом человека и, соответственно, риск их иммуногенности по существу отсутствует. Соответственно, антитело согласно настоящему изобретению все же может считаться происходящим от человека в том случае, если по меньшей мере одна, предпочтительно две и наиболее предпочтительно все три области CDR вариabельных областей легкой и тяжелой, или обеих

цепей антитела происходят из антител человека, примеры которых приведены в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации происходящие от человека антитела согласно настоящему изобретению содержат гетерологичные относительно встречающихся в природе антител области, например, замены аминокислот в каркасной области, константную область, экзогенно соединенную с вариабельной областью, другие аминокислоты на C- или N-концах и т.п.

Антитела, происходящие из библиотек иммуноглобулинов человека или от животных, трансгенных по одному или нескольким иммуноглобулинам человека, не экспрессирующие эндогенные иммуноглобулины согласно описанию ниже и, например в патенте США №5939598, Kucherlapati et al., называются подобными антителам человека антителами, чтобы отличать их от истинных антител человека согласно настоящему изобретению.

Например, спаривание тяжелых и легких цепей в антителах, подобных антителам человека, например, синтетических и полусинтетических антителах, как правило, выделенных с применением фагового дисплея, не обязательно отражает исходное спаривание, происходящее в исходной В-клетке человека. Соответственно, фрагменты Fab и scFv, полученные из библиотек для рекомбинантной экспрессии, обычно используемые на существующем уровне техники, могут считаться искусственными, со всеми возможными сопутствующими эффектами в отношении иммуногенности и стабильности.

В то же время, в настоящем изобретении предложены выделенные прошедшие аффинное созревание антитела, полученные от выбранных субъектов-людей, характеризующиеся терапевтической полезностью и переносимостью для человека. В настоящем документе термин "содержащее элементы антител грызуна антитело" или "содержащий элементы антител грызуна иммуноглобулин" относится к антителу, содержащему одну или большее число областей CDR из антитела человека согласно настоящему изобретению; и каркасную область человека, которая содержит замены и/или удаления и/или вставки аминокислот на основе последовательности антитела грызуна. В качестве последовательностей грызуна предпочтительно используют последовательности, происходящие от мышей и крыс, при этом антитела, содержащие такие последовательности, называют "содержащим элементы антител мыши" или "содержащим элементы антител крысы", соответственно. Иммуноглобулин человека, который является источником областей CDR, называют "исходным", или "акцепторным", а антитело грызуна, который является источником изменений каркасных областей, называют "донорным". Константные области не должны присутствовать в обязательном порядке, однако в случае их наличия они, как правило, по существу идентичны константным областям антитела грызуна, т.е. идентичны, по меньшей мере, приблизительно на 85-90%, предпочтительно приблизительно на 95% или более. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации полноразмерный иммуноглобулин человека с содержащей элементы антитела мыши тяжелой или легкой цепью содержит константную область мыши, области CDR человека, и по существу происходящую от человека каркасную область, которая содержит ряд "соответствующих антителам мыши" замен аминокислот. Как правило, "содержащее элементы антител мыши антитело" представляет собой антитело с содержащей элементы антител мыши вариабельной легкой цепью и/или содержащей элементы антител мыши вариабельной тяжелой цепью. Например, содержащее элементы антител мыши антитело не включает типичные гибридные антитела, поскольку полная вариабельная область гибридного антитела не происходит от мыши.

Модифицированное антитело, в которое были "введены элементы антител мыши" посредством процесса "введения элементов антител мыши", связывается с тем же антигеном, что и исходное антитело, из которого получены CDR, и обычно является менее иммуногенным для мышей по сравнению с исходным антителом. Приведенное описание "содержащих элементы антител мыши" антител также аналогичным образом применимо к "содержащим элементы антител грызуна" антителам, например, "содержащим элементы антител крысы антителам", при этом вместо последовательностей мыши используют последовательности крысы.

В настоящем документе термин "относящаяся к тяжелой цепи часть" включает последовательности аминокислот, происходящие из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий относящуюся к тяжелой цепи часть, содержит по меньшей мере что-либо одно из: домена CH1, шарнирного домена (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю шарнирную область), домена CH2, домена CH3 или их варианта или фрагмента. Например, связывающий полипептид для применения в настоящем изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую домен CH1; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH2; полипептидную цепь, содержащую домен CH1 и домен CH3; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH3, или полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен CH2 и домен CH3. Согласно другому варианту реализации полипептид согласно настоящему изобретению включает полипептидную цепь, содержащую домен CH3. Кроме того, в связывающем полипептиде для применения в настоящем изобретении может отсутствовать по меньшей мере часть домена CH2 (например, домен CH2, полностью или частично). Как отмечалось выше, специалисту в данной области техники будет понятно, что указанные домены (например, относящиеся к тяжелой цепи части) могут быть модифицированы таким образом, чтобы отличаться последовательностью аминокислот от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина.

В определенных антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных согласно описанию в настоящем документе относящиеся к тяжелой цепи части одной полипептидной цепи мультимера идентичны относящимся к тяжелой цепи частям второй полипептидной цепи мультимера. Как вариант, мономер, содержащий относящуюся к тяжелой цепи часть согласно настоящему изобретению, не является идентичным. Например, каждый мономер может содержать отличный связывающий мишень сайт, с формированием, например, биспецифического антитела или диатела.

В настоящем документе термин "биспецифическая", или "бифункциональная" молекула антитела относится к молекуле антитела, содержащей два разных эпитоп/антигенсвязывающих сайта, и, соответственно, обладающей специфичностью связывания в отношении двух разных целевых эпитопов. Указанные два эпитопа могут представлять собой эпитопы одного антигена или разных антигенов. Напротив, "бивалентное антитело" может содержать связывающие сайты, отличающиеся идентичной антигенной специфичностью. Способы получения биспецифического антитела известны в данной области техники, например, химическая конъюгация двух разных моноклональных антител согласно примеру 36, или, например, химическая конъюгация двух фрагментов антител, например двух Fab-фрагментов (Brennan et al., *Science* 229 (1985), 81-83; Nitta et al., *Eur. J. Immunol.* 19 (1989), 1437-1441; Glennie et al., *J. Immunol.* 139 (1987), 2367-2375; Jung et al., *Eur. J. Immunol.*, 21 (1991), 2431-2435). Как вариант, биспецифические антитела получают рекомбинантным способом (Gruber et al., *J. Immunol.* 152 (1994), 5368-5374; Kurucz et al., *J. Immunol.* 154 (1995), 4576-4582; Mallender and Voss, *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 199-206). Традиционно, рекомбинантное получение биспецифических антител основано на коэкспрессировании двух пар цепей, каждая из которых состоит из тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, при этом две тяжелых цепи обладают разной специфичностью связывания. В результате случайного выбора тяжелых и легких цепей потенциально получают смесь десяти антител с разной структурой, из которых только одно обладает требуемой специфичностью связывания (Milstein and Cuellar, *Nature* 305 (1983), 537-540; Lanzavecchia and Scheidegger, *Eur. J. Immunol.* 17 (1987), 105-111). Альтернативный способ включает соединение вариабельных доменов с требуемой специфичностью связывания с константной областью тяжелой цепи, включающей по меньшей мере часть шарнирной области, областей CH2 и CH3. Согласно одному варианту реализации указанная область CH1, содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствует по меньшей мере в одном из указанных гибридов. ДНК, кодирующие указанные гибриды, и, при необходимости, легкие цепи встраивают в отдельные экспрессионные векторы и затем котрансфицируют ими подходящий организм-хозяина. Возможно встраивание кодирующих последовательностей двух или всех трех цепей в один экспрессионный вектор.

Согласно другому варианту реализации антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно описанию в настоящем документе состоят из одной полипептидной цепи, например, scFv, и должны быть экспрессированы внутриклеточно (интратела) для потенциального терапевтического и диагностического применения *in vivo*.

Относящиеся к тяжелой цепи части связывающего полипептида для применения в способах диагностики и лечения согласно описанию в настоящем документе могут происходить из разных молекул иммуноглобулина. Например, относящаяся к тяжелой цепи часть полипептида может содержать домен CH1, происходящий из молекулы IgG1, и шарнирную область, происходящую из молекулы IgG3. Согласно другому примеру относящаяся к тяжелой цепи часть может содержать шарнирную область, происходящую частично из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG3. Согласно другому примеру относящаяся к тяжелой цепи часть может содержать гибридный шарнир, происходящий частично из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG4.

В настоящем документе термин "легкая цепь часть" включает последовательности аминокислот, происходящие из легкой цепи иммуноглобулина. Предпочтительно, содержащая легкую цепь часть содержит по меньшей мере один из доменов V_L или CL.

Минимальный размер пептидного или полипептидного эпитопа для антитела составляет, как полагают, приблизительно 4-5 аминокислот. Пептидные или полипептидные эпитопы предпочтительно содержат по меньшей мере 7, более предпочтительно по меньшей мере 9 и наиболее предпочтительно по меньшей мере от приблизительно 15 до приблизительно 30 аминокислот. Поскольку область CDR способна распознавать антигенный пептид или полипептид в третичной форме, составляющие эпитоп аминокислоты не обязательно должны быть смежными, и, в некоторых случаях, не обязательно даже располагаются на одной пептидной цепи. Согласно настоящему изобретению пептидный или полипептидный эпитоп, распознаваемый предложенными в настоящем изобретении антителами, содержит последовательность, включающую 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 от приблизительно 15 до приблизительно 30 смежных или несмежных аминокислот НТТ, в частности, в N-концевой, полипролиновой области, богатой пролином области или C-концевой области, кодированной экзон 1.

Под терминами "специфическое связывание", или "специфическое распознавание", используемыми взаимозаменяемо в настоящем документе, обычно подразумевается, что связывающая молекула, например, антитело, связывается с эпитопом посредством антигенсвязывающего домена, и что указанное свя-

зывание подразумевает некоторую степень комплементарности антигенсвязывающего домена и эпитопа. В соответствии с настоящим определением, антитело называют "специфически связывающимся" с эпитопом, если оно связывается с указанным эпитопом посредством антигенсвязывающего домена с большей легкостью, чем могло бы связаться со случайным нерелевантным эпитопом. Термин "специфичность" в настоящем документе используется для обозначения относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, может считаться, что антитело "А" имеет более высокую специфичность в отношении определенного эпитопа, чем антитело "В"; или может быть указано, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью, чем с родственным эпитопом "D".

При использовании термина "характеристики иммунологического связывания" или термина для других связывающих характеристик антитела с антигеном, все грамматические формы указанного термина относятся к специфичности, аффинности, перекрестной реактивности и другим связывающим характеристикам антитела.

Под "преимущественным связыванием" подразумевается, что связывающая молекула, например, антитело, специфически связывается с эпитопом легче, чем связывалось бы с родственным, сходным, гомологичным или аналогичным эпитопом. Соответственно, антитело, которое "преимущественно связывается" с заданным эпитопом, будет связываться с указанным эпитопом с большей вероятностью, чем с родственным эпитопом, даже если такое антитело может вступать в реакции перекрестного связывания с родственным эпитопом.

Согласно неограничивающему примеру связывающей молекулы, например, может считаться, что антитело преимущественно связывает первый эпитоп, если оно связывает указанный первый эпитоп с константой диссоциации (K_D), величина которой меньше K_D указанного антитела для второго эпитопа. Согласно другому неограничивающему примеру может считаться, что антитело преимущественно связывает первый антиген, если оно связывает указанный первый эпитоп с аффинностью, величина которой по меньшей мере на один порядок величины меньше K_D указанного антитела для второго эпитопа. Согласно другому неограничивающему примеру может считаться, что антитело преимущественно связывает первый эпитоп, если оно связывает указанный первый эпитоп с аффинностью, величина которой по меньшей мере на два порядка величины меньше, чем K_D указанного антитела для второго эпитопа.

Согласно другому неограничивающему примеру связывающая молекула, например, может считаться, что антитело преимущественно связывает первый эпитоп, если оно связывает указанный первый эпитоп со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$), меньшей чем $k(\text{off})$ антитела для второго эпитопа. Согласно другому неограничивающему примеру может считаться, что антитело преимущественно связывает первый эпитоп, если оно связывает указанный первый эпитоп с аффинностью, значение которой по меньшей мере на один порядок величины меньше $k(\text{off})$ антитела для второго эпитопа. Согласно другому неограничивающему примеру может считаться, что антитело преимущественно связывает первый эпитоп, если оно связывает указанный первый эпитоп с аффинностью, значение которой по меньшей мере на два порядка величины меньше $k(\text{off})$ антитела для второго эпитопа.

Связывающая молекула, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант, или производное согласно описанию в настоящем документе, как может быть указано, связывает НТТ или его фрагмент, вариант или специфическую конформационную форму со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$), составляющей $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, 10^{-2} c^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-3} c^{-1} или менее. Более предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению, как может быть указано, связывает НТТ или его фрагмент, вариант или специфическую конформационную форму со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$), составляющей $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, 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} или менее.

Связывающая молекула, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное согласно описанию в настоящем документе, как может быть указано, связывает НТТ или его фрагменты, варианты или специфическую конформационную форму со скоростью ассоциации ($k(\text{on})$), составляющей $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или более. Более предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению, как может быть указано, связывает НТТ или его фрагмент, вариант или специфическую конформационную форму со скоростью ассоциации ($k(\text{on})$), составляющей $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, или $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или более.

Указывается, что связывающая молекула, например, антитело, конкурентно ингибирует связывание референсного антитела с заданным эпитопом, если оно преимущественно связывается с указанным эпитопом в такой степени, что блокирует, до определенного уровня, связывание референсного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование может быть определено любым способом, известным в данной области техники, например, с применением конкурентного ИФА (ELISA). Может быть указано, что антитело конкурентно ингибирует связывание референсного антитела с заданным 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 "аффинность/сродство" относится к величине силы связывания индивидуального эпитопа с областью CDR связывающей молекулы, например, молекулы иммуноглобули-

на; см., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988), стр. 27-28. В настоящем документе термин "авидность" относится к общей стабильности комплекса популяции иммуноглобулинов и антигена, то есть сила функционального связывания смеси иммуноглобулинов с антигеном; см., например, Harlow, стр. 29-34. Авидность связана как с аффинностью индивидуальных молекул иммуноглобулина в популяции в отношении специфических эпитопов, так и с валентностями иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между бивалентным моноклональным антителом и антигеном, содержащим эпитоп с высоко повторяющейся структурой, например, полимер, отличается высокой авидностью. Аффинность или авидность антитела в отношении антигена может быть определена экспериментально с применением любого подходящего способа; см., например, Berzofsky et al., *"Antibody-Antigen Interactions"*, 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 способов, описанных в настоящем документе. Общие техники измерения аффинности антитела к антигену включают ИФА (ELISA), РИА и поверхностный плазмонный резонанс. Измеренная аффинность конкретного взаимодействия антитело-антиген может варьировать при измерении в разных условиях, например, при разной концентрации солей, значениях pH. Соответственно, измерения аффинности и других показателей связывания антигена, например, K_D , IC_{50} , предпочтительно осуществляют в стандартизированных растворах антитела и антигена, и с применением стандартизированного буфера.

Связывающие молекулы, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или их производные согласно настоящему изобретению могут также быть описаны или определены исходя из их перекрестной реактивности. В настоящем документе термин "перекрестная реактивность" относится к способности антитела, специфического в отношении одного антигена, вступать в реакцию со вторым антигеном; это мера родства двух разных антигенных веществ. Соответственно антитело является перекрестно-реактивным, если оно связывается с эпитопом, отличным от индуцировавшего его образование. Перекрестно-реактивный эпитоп обычно содержит значительное число комплементарных структурных признаков, идентичных индуцирующему эпитопу, и в некоторых случаях, фактически может подходить лучше, чем исходный.

Например, определенные антитела могут отличаться некоторой степенью перекрестной реактивности, то есть они связывают родственные, однако неидентичные эпитопы, например эпитопы, идентичные референсному эпитопу по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 55% и по меньшей мере на 50% (по оценке с применением способов, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе). Может быть указано, что антитело отличается незначительной перекрестной реактивностью или отсутствием перекрестной реактивности, если оно не связывает эпитопы, идентичные референсному эпитопу менее чем на 95%, менее чем на 90%, менее чем на 85%, менее чем на 80%, менее чем на 75%, менее чем на 70%, менее чем на 65%, менее чем на 60%, менее чем на 55% и менее чем на 50% (по оценке с применением способов, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе). Антитело может быть сочтено "высокоспецифичным" в отношении определенного эпитопа, если он не связывает любой другой аналог, ортолог или гомолог указанного эпитопа.

Связывающие молекулы, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению, могут также быть описаны или определены исходя из их аффинности к связыванию НТТ и/или мутированных, с неправильной укладкой и/или агрегированных видов НТТ, и/или их фрагментов. Предпочтительные показатели аффинности связывания включают соответствующие константе диссоциации, или K_d , составляющей менее чем 5×10^{-2} М, 10^{-2} М, 5×10^{-3} М, 10^{-3} М, 5×10^{-4} М, 10^{-4} М, 5×10^{-5} М, 10^{-5} М, 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 указано выше, субъединичные структуры и трехмерная конфигурация константных областей иммуноглобулинов различных классов хорошо известны. В настоящем документе термин "домен V_H " включает аминоконцевой варибельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, а термин "домен $CH1$ " включает первую (ближайшую к аминоконцу) константную область домена тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен $CH1$ примыкает к домену V_H и расположен в направлении аминоконца относительно шарнирной области молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина.

В настоящем документе термин "домен $CH2$ " включает часть молекулы тяжелой цепи, захватывающую, например, остатки антитела приблизительно с 244 по 360, согласно стандартным схемам нумерации (остатки 244-360, система нумерации Kabat; и остатки 231-340, система нумерации EU; см. Kabat EA et al., *цит.*). Домен $CH2$ уникален отсутствием тесного сопряжения с другим доменом; $CH2$ представляют собой две N-связанных разветвленных углеводных цепи, которые расположены между двумя доменами $CH2$ интактной нативной молекулы IgG. Также хорошо известно, что домен $CH3$ отходит от домена $CH2$ в направлении С-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

В настоящем документе термин "шарнирная область" включает часть молекулы тяжелой цепи, со-

единяющую домен СН1 с доменом СН2. Указанная шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, соответственно, позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимым образом. Шарнирные области могут быть подразделены 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, образующуюся между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, способную образовывать дисульфидную связь, или мостик с второй тиольной группой. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG области СН1 и СL соединены дисульфидной связью, и две тяжелых цепи соединены двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих положениям 239 и 242 в соответствии с системой нумерации Kabat (положения 226 или 229 в системе нумерации EU).

В настоящем документе термины "соединенный", "гибридный" или "соединение/слияние" используются взаимозаменяемо. Указанные термины относятся к соединению двух или более элементов или компонентов любым способом, в том числе с применением химической конъюгации или рекомбинантных способов. "Слияние с сохранением рамки считывания" относится к объединению двух или большего числа открытых рамок считывания (ORF) полинуклеотидов с образованием непрерывной более длинной ORF, таким образом, чтобы обеспечить сохранение корректной трансляционной рамки считывания исходной ORF. Соответственно, рекомбинантный гибридный белок представляет собой одиночный белок, содержащий два или большее количество сегментов, которые соответствуют полипептидам, кодируемым исходными ORF (причем указанные сегменты обычно не соединены таким образом в природе). Хотя полученная рамка считывания для всех объединенных сегментов, соответственно, является непрерывной, указанные сегменты могут быть физически или пространственно разделены, например, линкерной последовательностью внутри рамки считывания. Например, полинуклеотиды, кодирующие области CDR варибельной области иммуноглобулина могут быть соединены внутри рамки считывания, однако быть разделены полинуклеотидом, кодирующим по меньшей мере одну каркасную область или дополнительные области CDR иммуноглобулина, при условии, что "слитые" CDR транслируются совместно как часть единого полипептида.

Термин "экспрессия" в настоящем документе относится к процессу, обеспечивающему получение из гена биохимического вещества, например, РНК или полипептида. Указанный процесс включает любые проявления функционального присутствия гена в клетке, включая, без ограничений, нокдаун гена, а также как транзientную, так и стабильную экспрессию. Он включает, без ограничения, транскрипцию гена в матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК), малую шпилечную РНК (мшРНК), малую интерферирующую РНК (миРНК) или любой другой РНК-продукт, и трансляцию мРНК в полипептид(ы). В том случае, если конечный требуемый продукт представляет собой биохимический агент, экспрессия включает получение указанного биохимического агента и любых его предшественников. Экспрессия гена приводит к образованию "генного продукта". В настоящем документе генный продукт может представлять собой либо нуклеиновую кислоту, например матричную РНК, синтезируемую в результате транскрипции гена, или полипептид, который транслируется с транскрипта. Генные продукты, описанные в настоящем документе, дополнительно включают нуклеиновые кислоты, подвергшиеся посттранскрипционным модификациям, таким как полиаденилирование, или полипептиды, подвергшиеся посттрансляционным модификациям, таким как метилирование, гликозилирование, добавление липидов, связывание с другими белковыми субъединицами, протеолитическое расщепление и т.п.

В настоящем документе термин "образец" относится к любому биологическому материалу, полученному от субъекта или пациента. Согласно одному аспекту образец может включать кровь, перитонеальную жидкость, СМЖ, слюну или мочу. Согласно другим аспектам образец может включать цельную кровь, плазму крови, сыворотку крови, В-клетки, выделенные из образцов крови и культивированные клетки (например, В-клетки, полученные от субъекта). Образец может также включать биоптат или образец ткани, в том числе нервной ткани. Согласно другим аспектам образец может включать целые клетки и/или лизат клеток. Образцы крови могут быть собраны с применением способов, известных в данной области техники. Согласно одному аспекту осадок может быть ресуспендирован перемешиванием на вортексе при 4°C в объеме буфера 200 мкл (20 mM Tris, pH7,5, 0,5 % Nonidet, 1 mM ЭДТК, 1 mM ПМСФ, 0,1 M NaCl, ингибитор протеаз IX Sigma и ингибиторы фосфатаз IX Sigma 1 и 2). Суспензия может быть выдержана на льду в течение 20 мин с периодическим перемешиванием на вортексе. После перемешивания при 15 000 × g в течение 5 мин при приблизительно 4°C, аликвоты супернатанта могут быть помещены на хранение при температуре, составляющей приблизительно -70°C.

Заболевания:

Если не указано иное, термины "расстройство" и "заболевание" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и включают любое нежелательное физиологическое изменение у субъекта, животного, в выделенном органе, ткани или клетке/клеточной культуре.

Болезнь Гентингтона (БГ) представляет собой аутосомно-доминантное прогрессирующее нейродегенеративное расстройство, характеризующееся удлинением за счет тринуклеотидного CAG-повтора гена гентингтина (HTT) (Объединенная группа по изучению болезни Гентингтона (Huntington's Disease Collaborative Research Group), Cell 72(6) (1993), 971-983), при этом порог патогенности указанного удли-

нения составляет приблизительно 37 повторов, тогда как меньшее число повторов не приводит к патогенезу, см. например Trottier et al., *Nature* 378(6555) (1995), 403-406. Удлинение за счет тринуклеотидных CAG-повторов приводит к образованию удлиненного полиглутаминового (поли-Gln, поли-Q) тракта на аминоконце белка гентингина (НТТ), который связан с агрегацией НТТ. Однако точный механизм, приводящий к накоплению НТТ и появлению связанных с ним симптомов, пока не установлен.

Исследования показали, что обе фланкирующие области полиглутаминового (поли-Q) тракта, т.е. аминоконцевая область, состоящая из амфипатического альфа-спирального нацеливающего домена, и карбоксиконцевая область, характеризующаяся двумя пролиновыми трактами (полипролиновая область) и богатым лейцином/пролином трактом (богатая пролином область), по-видимому, критически важны для опосредования токсичности мутированного НТТ, см. например, Caron et al., *PNAS* 110 (2013), 14610-14615.

Механизм, который вносит вклад в возникновение патологических симптомов БГ, таких как гиперкинезия, гипокинезия, психические и двигательные расстройства, в том числе аффективные расстройства и расстройства влечения, снижение двигательной стабильности, безответственное и импульсивное поведение, избегание впечатлений и депрессия, расстройства обработки визуальной информации, подкорковая деменция, снижение когнитивных способностей, дезориентация и нарушения речи, бредовые расстройства, двигательное беспокойство в области рук, ног, лица, головы и туловища, хореический гиперкинез, дизартрия, дисфагия, анартрия, дистонии, пока не выяснен. Возможные механизмы включают, не ограничиваясь перечисленными, пониженную гибкость шарнирной области, обусловленную удлинением полиглутаминового тракта НТТ, а также действие протеаз, приводящее к образованию других фрагментов НТТ в результате наличия удлиненного полиглутаминового тракта.

Поскольку антитела согласно настоящему изобретению, как было показано, терапевтически эффективны в модели БГ на мышах, см. например, пример 24 и фиг. 17, а также пример 34 и фиг. 34, и, кроме того, способны связываться с амилоидами НТТ в срезах тканей пациентов с БГ, см. например, пример 31 и фиг. 27-30, происходящие от человека антитела и их биотехнологические производные подходят как для лечения, так и для диагностики БГ и вышеупомянутых симптомов. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложенные в изобретении антитела, связывающие молекулы, отличающиеся по существу идентичной чему-либо из перечисленного специфичностью связывания, полинуклеотиды, векторы или клетки согласно настоящему изобретению используют для получения фармацевтической или диагностической композиции для профилактики и/или терапевтического лечения БГ, в частности, связанных с НТТ-амилоидозом заболеваний и/или расстройств, для мониторинга прогрессирования заболевания и/или отклика на лечение, и для диагностики заболеваний, связанных с НТТ-амилоидозом.

Лечение:

В настоящем документе, термины "лечить" или "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, целью которых является предотвращение или замедление (смягчение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как развитие сердечной недостаточности. Благоприятные или требуемые клинические результаты включают, не ограничиваясь перечисленными, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) болезненного состояния, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или ослабление болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), детектируемые или недетектируемые. "Лечение" может также означает увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие лечения. Нуждающиеся в лечении включают уже страдающих указанным состоянием или расстройством, а также предрасположенных к указанному состоянию или расстройству, или подлежащих профилактике проявления указанного состояния или расстройства.

Если не указано иное, термины "лекарственное средство", "лекарство" или "медикамент" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и включают, не ограничиваясь перечисленными, все (А) изделия, лекарства и составы для внутреннего или внешнего применения, и любое вещество или смесь веществ, предназначенное(ую) для применения в диагностике, для излечения, смягчения, лечения или предотвращения заболевания у человека или других животных; и (В) изделия, лекарства и составы (не являющиеся пищевыми продуктами), предназначенные для воздействия на структуру или любую функцию организма человека или других животных; и (С) изделия, предназначенные для применения в качестве компонента любого изделия, описанного в пп. (А) и (В). Термин "лекарственное средство", "лекарство" или "медикамент" включает полную формулу состава, предназначенного для применения у человека или других животных, содержащего один или большее число "агентов", "соединений", "веществ" или "(химических) композиций", а также, в другом контексте, другие фармацевтически неактивные вспомогательные вещества, такие как наполнители, разрыхлители, смазывающие вещества, скользящие вещества, связующие вещества или обеспечивающие простоту транспорта, распадаемость, дезагрегацию, растворение и биологическую доступность "лекарственного средства", "лекарства" или "медикамента" в предполагаемой целевой области в организме человека или других животных, например, на коже, в желудке или кишечнике. Термины "агент", "соединение" или "вещество" используются в настоящем доку-

менте взаимозаменяемо и включают, в более конкретном аспекте, однако не ограничиваясь указанным, все фармакологически активные агенты, т.е. агенты, которые индуцируют требуемый биологический или фармакологический эффект, или агенты, которые исследуют или тестируют на способность индуцировать такой возможный фармакологический эффект с применением способов согласно настоящему изобретению.

Под "субъектом", "индивидуумом", "животным", "пациентом" или "млекопитающим" подразумевается любой субъект, в частности, субъект-млекопитающее, например, пациент-человек, которому требуется диагностика, получение прогноза, профилактика или терапия.

Фармацевтические носители:

Информация о фармацевтически приемлемых носителях и способах введения может быть найдена в соответствующих публикациях, известных специалисту в данной области техники. Составы с фармацевтическими композициями согласно настоящему изобретению могут быть получены в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники; см. например, источники: Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000), издание Университета Филадельфии (University of Sciences in Philadelphia), ISBN 0-683-306472; Vaccine Protocols, 2nd Edition, Robinson et al., Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2003; Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. 2nd Edition, Taylor and Francis. (2006), ISBN: 0-8493-1630-8. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают забуференный фосфатом солевой раствор, воду, эмульсии, такие как масляные/водные эмульсии, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.п. Составы с композициями, содержащие такие носители, могут быть получены с применением хорошо известных стандартных способов. Указанные фармацевтические композиции могут вводиться субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций может быть реализовано различными способами. Примеры включают введение композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, перорально, интраназально, ректально, местно, внутривенно, внутримышечно, подкожно, субдермально, чрескожно, интратекально и интракраниально. Аэрозольные составы, такие как назальные спреи, включают очищенные водные или другие растворы активного агента с консервирующими и изотоническими агентами. Такие составы предпочтительно доводят до изотоничности и значений pH, совместимых со слизистыми оболочками полости носа. Фармацевтические композиции для перорального введения, такие как молекулы однодоменных антител (например, "нанотелаTM") и т.п., также включены в настоящее изобретение. Такие составы для перорального применения могут быть представлены в форме таблеток, капсул, в порошковой, жидкой или полутвердой форме. Таблетка может содержать твердый носитель, такой как желатин или адъювант. Составы для ректального или вагинального введения могут быть представлены в виде суппозитория в подходящем носителе; см. также O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2(9) (2003), 727-735. Дальнейшие рекомендации относительно составов, подходящих для введения различными способами, можно найти в источнике: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985) с соответствующими обновлениями. Краткий обзор способов доставки лекарственных средств приведен в источнике: Langer, Science 249 (1990), 1527-1533.

II. Антитела согласно настоящему изобретению

Настоящее изобретение относится в целом к происходящим от человека антителам к НТТ и их НТТ-связывающим фрагментам, предпочтительно демонстрирующим характеристики иммунологического связывания и/или биологические свойства, описанные для проиллюстрированных в разделе примеров антител. В соответствии с настоящим изобретением моноклональные антитела человека, специфические в отношении НТТ клонировали из В-клеток популяции здоровых субъектов-людей. Однако согласно другому варианту реализации настоящего изобретения моноклональные антитела человека к НТТ могут также быть клонированы из В-клеток пациентов, у которых наблюдаются симптомы заболевания и/или расстройства, связанного с НТТ-амилоидозом.

В ходе экспериментов, проводимых в соответствии с настоящим изобретением, антитела, присутствующие в кондиционированной среде культивированных В-клеток человека памяти, оценивали на способность связываться с НТТ и более чем с 10 другими белками, в том числе бычьим сывороточным альбумином (БСА); см. примеры 8, 13, 18, 31 и 33. Только В-клеточные супернатанты, способные связывать белок НТТ, но не какой-либо из других белков в ходе скрининга, отбирали для дальнейшего анализа, в том числе для определения класса антител и подкласса легких цепей. Затем проводили обработку выбранных В-клеток для клонирования антител.

Вкратце указанная обработка заключалась в экстракции информационной РНК из выбранных В-клеток, обратной транскрипции посредством ПЦР с обратной транскрипцией, амплификации кодирующих антитело областей посредством ПЦР, клонирования в плазмидные векторы и секвенирования. Затем синтезировали и очищали выбранные антитела человека путем рекомбинантной экспрессии в клетках НЕК293 или СНО, после чего характеризовали их способность к связыванию белка НТТ человека. С применением комбинации различных тестов, например, рекомбинантной экспрессии антител в клетках НЕК293 или СНО и последующего определения специфичности связывания ими белка НТТ человека, и выраженного связывания патологически мутированных и/или агрегированных форм белка НТТ человека,

подтверждали, что впервые были клонированы антитела человека с высокой специфичностью в отношении НТТ, выраженным образом распознающие и селективно связывающие патологически агрегированные формы белка НТТ. В некоторых случаях получали также гибридные антитела мыши на основе вариабельных доменов антител человека согласно настоящему изобретению.

Соответственно, настоящее изобретение относится в целом к рекомбинантным происходящим от человека моноклональным антителам к НТТ и их НТТ-связывающим фрагментам, синтетическим и биотехнологическим производным и вариантам указанных антител. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело способно к связыванию НТТ человека.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело специфически связывает эпитоп в полипролиновой области НТТ, которая содержит последовательность аминокислот PPPPPPP (NI-302.33C11; NI-302.44D7; NI-302.7A8; NI-302.3D8; NI-302.46C9) (SEQ ID No: 139, 151, 154, 158, 161), последовательность аминокислот PPPPPP (NI-302.11H6, NI-302.18A1, NI-302.52C9) (SEQ ID No: 157, 159, 160), последовательность аминокислот PPPPPPPPP (NI-302.74C11, NI-302.15F9, NI-302.39G12, NI-302.11A4, NI-302.22H9, NI-302.37C12, NI-302.55D8, NI-302.78H12, NI-302.71F6) (SEQ ID No: 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 155, 156), эпитоп в богатой Р области, которая содержит последовательность аминокислот PQPPPQAQPL (NI-302.63F3 SEQ ID No: 140, NI-302.64E5 SEQ ID No: 200), последовательность аминокислот PPPQLQPPP (NI-302.31F11, SEQ ID No: 141), последовательность аминокислот QAQPLLQPQPPPP (NI-302.2A2; SEQ ID No: 142) или последовательность аминокислот PPPQLQPPPQAQPL (NI-302.15D3; SEQ ID No: 143), эпитоп в С-концевой области, которая содержит последовательность аминокислот PPGPAVAEEPLHRP (NI-302.35C1, SEQ ID No: 145) или PPPGPAVAEEPLH (NI-302.72F10, SEQ ID No: 202), эпитоп в N-концевой области, которая содержит последовательность аминокислот KAFESLKSQ (NI-302.15E8, SEQ ID No: 144) или эпитоп в богатой Р/Q области, которая содержит последовательность аминокислот QQQQQQQQPP (NI-302.7D8 SEQ ID No: 201); или конформационный эпитоп.

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к НТТ, или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или биотехнологическим производным, при этом указанное антитело специфически связывается с тем же эпитопом в полипролиновой области НТТ, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.33C11, NI-302.74C11, NI-302.15F9, NI-302.39G12, NI-302.11A4, NI-302.22H9, NI-302.44D7, NI-302.37C12, NI-302.55D8, NI-302.7A8, NI-302.78H12, NI-302.71F6, NI-302.11H6, NI-302.3D8, NI-302.18A1, NI-302.8F1, NI-302.52C9, NI-302.46C9. При картировании эпитопов идентифицирована последовательность в составе полипролиновой (поли-Р) области НТТ человека, включающая аминокислоты PPPPPPPPP (SEQ ID No: 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 155, 156) в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителами NI-302.74C11, NI-302.15F9, NI-302.39G12, NI-302.11A4, NI-302.22H9, NI-302.37C12, NI-302.55D8, NI-302.78H12, NI-302.71F6 согласно настоящему изобретению. Кроме того, при картировании эпитопов идентифицирована последовательность в составе полипролиновой области НТТ человека, включающая аминокислоты PPPPPPP (SEQ ID No: 139, 151, 154, 158, 161) в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителами NI-302.33C11, NI-302.44D7, NI-302.7A8, NI-302.3D8, NI-302.46C9 согласно настоящему изобретению, и аминокислоты PPPPPP (SEQ ID No: 157, 159, 160) в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителами NI-302.11H6, NI-302.18A1, NI-302.52C9 согласно настоящему изобретению. Соответственно, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложено антитело, отличающееся тем, что указанное антитело специфически связывается с эпитопом в полипролиновой области НТТ, который содержит последовательность аминокислот PPPPPPPPP (SEQ ID No: 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 155, 156), PPPPPPP (SEQ ID No: 139, 151, 154, 158, 161) или PPPPPP (SEQ ID No: 157, 159, 160).

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к НТТ, или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или биотехнологическим производным, при этом указанное антитело специфически связывается с тем же эпитопом в богатой Р области НТТ, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.63F3, NI-302.31F11, NI-302.2A2 и NI-302.15D3. При картировании эпитопов идентифицирована последовательность в составе богатой Р области НТТ человека, включающая аминокислоты PQPPPQAQPL (SEQ ID No: 140) в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-302.63F3 согласно настоящему изобретению, PPPQLQPPP (SEQ ID No: 141) в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-302.31F11 согласно настоящему изобретению, PPPQLQPPP (SEQ ID No: 141) в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-302.31F11 согласно настоящему изобретению, QAQPLLQPQPPPP (SEQ ID No: 142) в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-302.2A2, PPPQLQPPPQAQPL (SEQ ID No: 143) в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-302.15D3, PQPPPQAQPL в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-302.64E5. Соответственно, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложено антитело, отличающееся тем, что указанное антитело специфически связывается с эпитопом в богатой Р области НТТ, которая содержит последовательность аминокислот PQPPPQAQPL (SEQ ID No: 140), PPPQLQPPP (SEQ ID No: 141), QAQPLLQPQPPPP (SEQ ID No: 142), PPPQLQPPPQAQPL

(SEQ ID No: 143).

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к НТТ, или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или биотехнологическим производным, отличающемуся тем, что указанное антитело специфически связывается с тем же эпитопом в полиглутаминовой/полипролиновой области НТТ, что и референсное антитело NI-302.7D8. При картировании эпитопов идентифицирована последовательность в составе богатой Q/P области НТТ человека, включающая аминокислоты QQQQQQPPPP (SEQ ID No: 201) в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-302.7D8 согласно настоящему изобретению. Соответственно, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложено антитело, отличающееся тем, что указанное антитело специфически связывается с эпитопом в полиглутаминовой/полипролиновой области НТТ, которая содержит последовательность аминокислот QQQQQQPPPP (SEQ ID No: 201).

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к НТТ, или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или биотехнологическим производным, при этом указанное антитело специфически связывается с тем же эпитопом в С-концевой области НТТ, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.35C1. При картировании эпитопов идентифицирована последовательность в составе С-концевой области НТТ человека, включающая аминокислоты PPGPAVAEEPLHRP (SEQ ID No: 145) в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-302.35C1 согласно настоящему изобретению. Соответственно, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложено антитело, отличающееся тем, что указанное антитело специфически связывается с эпитопом в С-концевой области НТТ, которая содержит последовательность аминокислот PPGPAVAEEPLHRP (SEQ ID No: 145).

Согласно дополнительному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к НТТ, или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или биотехнологическим производным, при этом указанное антитело специфически связывается с тем же эпитопом в С-концевой области НТТ в качестве референсного антитела NI-302.72F10. При картировании эпитопов идентифицирована последовательность в составе С-концевой области НТТ человека, включающая аминокислоты PPPGPAVAEEPLH (SEQ ID No: 202) в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-302.72F10 согласно настоящему изобретению. Соответственно, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложено антитело, отличающееся тем, что указанное антитело специфически связывается с эпитопом в С-концевой области НТТ, которая содержит последовательность аминокислот PPPGPAVAEEPLH (SEQ ID No: 202).

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к НТТ, или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или биотехнологическим производным, при этом указанное антитело специфически связывается с тем же эпитопом в N-концевой области НТТ, что и референсное антитело NI-302.15E8. При картировании эпитопов идентифицирована последовательность в составе N-концевой области НТТ человека, включающая аминокислоты KAFESLKSFQ (SEQ ID No: 144) в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-302.15E8 согласно настоящему изобретению. Соответственно, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложено антитело, отличающееся тем, что указанное антитело специфически связывается с эпитопом в N-концевой области НТТ, которая содержит последовательность аминокислот KAFESLKSFQ (SEQ ID No: 144).

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к НТТ, или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или биотехнологическим производным, при этом указанное антитело специфически связывается с тем же эпитопом НТТ, кодированным экзоном 1, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.6N9, NI-302.4A6, NI-302.12H2 или NI-302.8M1 которые, как было показано, не связываются с линейными пептидами НТТ, кодированными экзоном 1, но связывают агрегированные белки НтТ, кодированные экзоном 1 с 21 или 49 полиглутаминовыми повторами (HD21 и HD49) с высокой аффинностью и значением EC_{50} в субнанолярном диапазоне; см., например, общую информацию в примере 25 и на фиг. 20. Соответственно, согласно одному предпочтительному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению специфически связывает агрегированные формы НТТ, в частности, белковые агрегаты, происходящие из НТТ, кодированного экзоном 1, со значением EC_{50} , составляющим менее 1 нМ, предпочтительно менее 0,1 нМ и наиболее предпочтительно менее 0,01 нМ.

Кроме того, без связи с первоначальными экспериментальными исследованиями, как показано на примерах и на чертежах, моноклональные антитела человека NI-302.33C11, NI-302.63F3, NI-302.35C1, NI-302.31F11, NI-302.6N9, NI-302.46C9, NI-302.8F1, NI-302.74C11, NI-302.15F9, NI-302.39G12, NI-302.11A4, NI-302.22H9, NI-302.44D7, NI-302.55D8, NI-302.7A8, NI-302.78H12, NI-302.71F6, NI-302.11H6, NI-302.3D8, и NI-302.64E5 и NI-302.72F10 к НТТ согласно настоящему изобретению предпочтительно характеризуются специфическим связыванием с патологическим мутированным и/или агрегированным НТТ и существенно меньшей аффинностью в отношении распознавания физиологической формы НТТ, см. например, примеры 7, 13, 18 и фиг. 3, 7, 11, 21, 32. Таким образом, в настоящем изобретении предложен набор антител человека к НТТ, отличающихся связывающими характеристиками, подходящими, в

частности, для диагностических и терапевтических целей. Соответственно, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложены антитела, которые способны к специфическому связыванию патологически агрегированных форм НТТ. При этом согласно альтернативному или дополнительному варианту антитела согласно настоящему изобретению которые способны связываться с полипролиновой областью или богатой пролином областью НТТ, кодированной экзоном 1, могут также применяться для других целей. В частности, указанные антитела не ограничены НТТ и могут также связываться с другими мишенями, также выявляя полипролиновый тракт или богатую пролином область.

Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению демонстрирует связывающие характеристики примеров антител NI-302.33C11, NI-302.63F3, NI-302.35C1, NI.302-7D8 и NI.302-72F10 согласно описанию в разделе "Примеры". Антитело к НТТ согласно настоящему изобретению более предпочтительно распознает патологически измененный НТТ, например, мутированные и/или агрегированные виды НТТ и их фрагменты, чем физиологический НТТ. Соответственно, согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению по существу не распознает физиологические виды НТТ.

Термин "по существу не распознает", используемый в настоящем документе для описания аффинности к связыванию молекулы из группы, содержащей антитело, его фрагмент или молекулу, связывающую специфическую целевую молекулу, антиген и/или целевую молекулу и/или антиген в определенной конформации, означает, что молекула из вышеупомянутых групп связывает указанную молекулу, антиген и/или конформационную форму с аффинностью связывания, значение которой по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 раз меньше аффинности связывания молекулы из вышеупомянутой группы в отношении другой молекулы, антигена и/или конформации. Очень часто в качестве меры аффинности связывания используют константу диссоциации (KD). Иногда в конкретном анализе, например, в ИФА (ELISA) используют EC_{50} в качестве меры аффинности связывания. Предпочтительно, термин "по существу не распознает" в настоящем документе означает, что молекула вышеупомянутой группы связывает указанную молекулу, антиген и/или конформер с аффинностью, по меньшей мере в 10, 20, 50, 100, 1000 или 10000 раз меньшей, чем аффинность связывания молекулы вышеупомянутой группы с другой молекулой, антигеном и/или конформером.

Согласно описанию выше, предполагается, что агрегация НТТ при БГ происходит в результате удлинения полиглутаминового тракта Htt, кодированного экзоном 1. В частности, было показано, что БГ в основном возникает у пациентов с количеством остатков глутамина в НТТ, превышающим порог 35-40 остатков. Соответственно, как показано на примере 3, получали конструкции с агрегированными и растворимыми НТТ, кодированными экзоном 1 с 21, 35 или 49 полиглутаминовыми повторами, чтобы определить способность антител к НТТ согласно настоящему изобретению специфически связывать патологически измененный НТТ.

Термин HDX в описании ниже относится к конструкциям НТТ, полученным в соответствии с примером 3. В частности, X обозначает число глутаминовых повторов (Q), например, белок НТТ, кодированный экзоном 1 с 21 полиглутаминовыми повторами будет называться "HD21".

С применением конструкций согласно описанию в разделе "Примеры" можно отметить, что антитело к НТТ согласно дополнительному или альтернативному варианту настоящего изобретения связывается с патологическими, вызывающими заболевание, и/или мутированными, и/или агрегированными формами НТТ человека. В указанном контексте показатели аффинности связывания могут находиться в диапазоне, указанном в примерах для антител NI-302.33C11, NI-302.63F3, NI-302.35C1, NI-302.31F11, NI-302.6N9, NI-302.46C9, NI-302.8F1, NI-302.74C11, NI-302.15F9, NI-302.39G12, NI-302.11A4, NI-302.22H9, NI-302.44D7, NI-302.55D8, NI-302.7A8, NI-302.78H12, NI-302.71F6, NI-302.11H6 и NI-302.3D8 на фиг. 3(A), 7(A), 11(A), 14(A), соответствующих фиг. 19, 20 и 31, т.е. соответствуют полумаксимальным эффективным концентрациям (EC_{50}), составляющим от приблизительно 1 пМ до 250 нМ, предпочтительно EC_{50} , составляющей от приблизительно 25 пМ до 50 нМ, наиболее предпочтительно EC_{50} , составляющей от приблизительно 0,05 до 30 нМ для агрегированного HD49-НТТ человека и агрегированного рекомбинантного HD49-НТТ, или EC_{50} , составляющей от приблизительно 0,05 до 5 нМ для агрегированного HD21-НТТ человека и агрегированного рекомбинантного HD21-НТТ.

В частности, антитело к НТТ, его связывающий фрагмент или биотехнологическое производное указанного антитела отличается аффинностью связывания, соответствующей значению EC_{50} , составляющему ≤ 20 нМ, предпочтительно ≤ 10 нМ и наиболее предпочтительно ≤ 1 нМ для агрегированного НТТ HD49; и/или составляющему ≤ 40 нМ, предпочтительно ≤ 10 нМ и наиболее предпочтительно ≤ 1 нМ для НТТ HD21; см. фиг. 3, 7, 11, 19 и 31.

Агрегация НТТ, связанная с развитием БГ, чаще всего связана с полиглутаминовыми (поли-Q) трактами, содержащими > 35 повторов. Как показано в настоящем изобретении, антитела к НТТ согласно описанию в настоящем документе демонстрировали высокую эффективность связывания с БГ-трактами, содержащими значительное число повторов, см. например, примеры 7, 13, 18, 31 и 33. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к НТТ, НТТ-связывающая молекула, фрагмент, синтетический или биотехнологический вариант связывается с НТТ, удлиненным за

счет полиглутаминового (Q) тракта. Согласно предпочтительному варианту реализации оно связывается с НТТ, содержащим более чем 35 повторов. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело связывается с НТТ, удлиненным за счет полиглутаминового (Q) тракта, состоящего из 49 (HD49) повторов, более 35 повторов (HD35), а также более 21 повтора (HD21).

При этом в настоящем изобретении предложены также антитела к НТТ, НТТ-связывающие молекулы, их фрагменты, синтетические или биотехнологические варианты, которые связываются с полиглутаминовыми (поли-Q) трактами размером менее 35 повторов (HD35). Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело, связывающая молекула или их варианты связывают(ют)ся с НТТ, содержащим "нормальные" полиглутаминовые тракты. В частности, указанное антитело способно к связыванию НТТ, содержащего полиглутаминовые тракты размером < 35 повторов (HD35).

Некоторые антитела способны связывать широкий спектр биомолекул, например, белков. Как будет понятно специалисту, термин "специфический" используется в настоящем документе для обозначения того, что другие биомолекулы помимо белков НТТ или их фрагментов значимо не связываются с антигенсвязывающей молекулой, например, одним из антител согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, уровень связывания с биомолекулой, отличной от НТТ, обуславливает аффинность связывания, составляющую не более 20% или менее, 10% или менее, только 5% или менее, всего 2% или менее или всего 1% или менее (т.е. по меньшей мере 5-, 10-, 20-, 50- или 100-кратно меньшую аффинность; включены также любые варианты помимо перечисленных) от аффинности к НТТ, соответственно; см., например, фиг. 20.

Согласно одному варианту реализации антитело к НТТ согласно настоящему изобретению связывает преимущественно агрегированные формы НТТ, и/или их фрагменты, производные, фибриллы и/или олигомеры. Согласно другому варианту реализации антитело к НТТ согласно настоящему изобретению преимущественно связывается как с нативными НТТ, так и с патологически мутированными и/или агрегированными формами НТТ.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения антитело к НТТ или его НТТ-связывающий фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное указанного антитела представляет собой биспецифическое антитело. Соответственно, антитело согласно настоящему изобретению может быть способно распознавать по меньшей мере два разных эпитопа либо на одном, либо на разных антигенах; см. также выше.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере один связывающий сайт/домен биспецифического антитела специфически распознает эпитоп в полипролиновой области НТТ, которая содержит последовательность аминокислот PPPPPPP (NI-302.33C11; NI-302.44D7; NI-302.7A8; NI-302.3D8; NI-302.46C9) (SEQ ID No: 139, 151, 154, 158, 161), последовательность аминокислот PPPPPP (NI-302.11H6, NI-302.18A1, NI-302.52C9) (SEQ ID No: 157, 159, 160), последовательность аминокислот PPPPPPPPPPP (NI-302.74C11, NI-302.15F9, NI-302.39G12, NI-302.11A4, NI-302.22H9, NI-302.37C12, NI-302.55D8, NI-302.78H12, NI-302.71F6) (SEQ ID No: 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 155, 156), эпитоп в богатой пролином области, которая содержит последовательность аминокислот PQPPPQAQPL (NI-302.63F3) (SEQ ID No: 140, NI-302.64E5) (SEQ ID No: 200), последовательность аминокислот PPPQLQPPP (NI-302.31F11, SEQ ID No: 141), последовательность аминокислот QAQPLLPQPQPPPP (NI-302.2A2; SEQ ID No: 142) или последовательность аминокислот PPPQLPQPPPQAQPL (NI-302.15D3; SEQ ID No: 143), эпитоп в С-концевой области, которая содержит последовательность аминокислот PPGPAVAEEPLHRP (NI-302.35C1, SEQ ID No: 145) или PPPGPAVAEEPLH (NI-302.72F10, SEQ ID No: 202), эпитоп в N-концевой области, которая содержит последовательность аминокислот KAFESLKSQF (NI-302.15E8, SEQ ID No: 144), эпитоп в богатой P/Q области, которая содержит последовательность аминокислот QQQQQQQQPPPP (NI-302.7D8) (SEQ ID No: 201), или конформационный эпитоп, распознаваемый любым из антител NI-302.6N9, NI-302.4A6, NI-302.12H2 или NI-302.8M1.

Как упоминалось ранее, накопление содержащих полиглутамин (поли-Gln, поли-Q) агрегатов белка НТТ во внутриядерных включениях нейронов представляет собой отличительный признак прогрессирующего нейродегенеративного расстройства - болезни Гентингтона (БГ). Электронные микрофотографии указанных агрегатов выявили фибриллярные структуры с морфологией, близкой В-амилоидным фибриллам при болезни Альцгеймера, см. например Caughey et al., Trends Cell Biol. 7 (1997), 56-62 и Caputo et al., Arch. Biochem. Biophys. 292 (1992), 199-205, что дает основания предполагать, что при БГ дегенеративный процесс, главным образом затрагивающий средние шипиковые нейроны стриатума и кортикальные нейроны, приводя к дисфункции и последующей утрате нейронов, повреждению тканей в результате эксайтотоксичности, повреждению митохондрий, образованию свободных радикалов, а также, возможно, воспалительные механизмы, в том числе активация микроглии и прогрессирующий характер дальнейших симптомов, обусловлены токсическим амилоидным фибриллогенезом. Соответственно, согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению подходит для лечения болезни Гентингтона (БГ) и ее симптомов.

К настоящему времени были описаны внутриклеточно экспрессируемые антитела (интратела), рассматриваемые в качестве терапевтических инструментов при БГ, нарушающих функцию НТТ, см. например, Ali et al., в источнике: *Neurobiology of Huntington's Disease: Applications to Drug Discovery*, Lo et al., Chapter 10, CRC Press (2011). Хотя указанные интратела оказывали положительный эффект на агрегацию и клеточную смерть, индуцированные НТТ, в клеточных анализах, см. например, Khoshnab et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 99 (2002), 1002-1007, способ их введения представляет собой один из недостатков, уменьшающих терапевтическую полезность. В частности, предпочтительным способом доставки терапевтических интрател в головной мозг является генная терапия на основе вирусных векторов. При этом основной недостаток указанного способа введения заключается, в том числе, в высокой иммуногенности для хозяина. Соответственно, для терапевтического или диагностического применения предпочтительно использование невирусных способов, задействующих другие пути введения. Антитела согласно настоящему изобретению, как было показано, уменьшают потерю плотности дендритных шипиков при добавлении в культуральную среду, т.е. внеклеточно. Соответственно, можно ожидать, что антитела согласно настоящему изобретению, в отличие от описанных ранее интрател, будут эффективны при использовании терапевтически предпочтительных способов введения. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело вводят путем подкожной инъекции (п/к), внутривенной инъекции (в/в), внутримышечной инъекции (в/м), внутривентрикулярной (в/б), интратекальной, струйной инъекции, при этом радиус действия не ограничен внутриклеточной экспрессией антитела.

Как уже упоминалось выше и как показано на примере 24 и на фиг. 17, была продемонстрирована терапевтическая полезность антител согласно настоящему изобретению. В частности, было показано, что антитела к НТТ согласно настоящему изобретению способны уменьшать снижение плотности дендритных шипиков. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к НТТ, его НТТ-связывающий фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное указанного антитела обеспечивает уменьшение снижения плотности шипиков.

Кроме того, терапевтическая полезность антител согласно настоящему изобретению была продемонстрирована в примере 34 и показана на фиг. 34. В частности, было показано, что антитела к НТТ согласно настоящему изобретению способствуют восстановлению поведенческой функции при целенаправленном обучении для выполнения определенных задач и улучшают двигательные функции. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к НТТ, его НТТ-связывающий фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное указанного антитела обеспечивает улучшение поведенческой активности во время целенаправленного обучения для выполнения определенных задач и повышению сенсомоторных способностей.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, содержащему(им) антигенсвязывающий домен, идентичный домену антитела, выбранного из группы, состоящей из NI-302.33C11, NI-302.63F3, NI-302.35C1, NI-302.31F11, NI-302.2A2, NI-302.6N9, NI-302.74C11, NI-302.15F9, NI-302.39G12, NI-302.11A4, NI-302.22H9, NI-302.44D7, NI-302.37C12, NI-302.55D8, NI-302.7A8, NI-302.78H12, NI-302.71F6, NI-302.11H6, NI-302.3D8, NI-302.18A1, NI-302.8F1, NI-302.52C9, NI-302.46C9, NI-302.15E8, NI-302.15D3, NI-302.64E5, NI-302.7D8, NI-302.72F10, NI-302.12H2, NI-302.8M1 и NI-302.4A6.

В настоящем изобретении также предложен ряд примеров связывающих молекул, например, антител и их связывающих фрагментов, распознающих полипролиновую область НТТ, которые могут характеризоваться наличием в вариабельной области, например, в связывающем домене, по меньшей мере одной определяющей комплементарности области (CDR) из вариабельной области V_H и/или V_L , содержащего любую из последовательностей аминокислот, приведенных на фиг. 1. Соответствующие последовательности нуклеотидов, кодирующие вышеописанные вариабельные области, приведены в табл. II ниже. Примеры совокупностей областей CDR описанных выше последовательностей аминокислот области V_H и/или V_L приведены на фиг. 1. При этом, как обсуждается ниже, специалисту в данной области техники хорошо известно, что могут быть использованы альтернативные или дополнительные варианты CDR, последовательность аминокислот которых отличается от последовательностей, приведенных на фиг. 1, одной, двумя, тремя или даже большим числом аминокислот, в случае CDR2 и CDR3. Соответственно, согласно одному варианту реализации предложен(о) антитело согласно настоящему изобретению или его НТТ-связывающий фрагмент, содержащее(ий) в вариабельной области по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) согласно фиг. 1, и/или одну или большее число соответствующих областей CDR, включающих одну или большее число замен аминокислот.

В настоящем изобретении также предложен ряд примеров связывающих молекул, например, антител и их связывающих фрагментов, распознающих богатую Р область НТТ, которые могут характеризоваться наличием в вариабельной области, например, в связывающем домене, по меньшей мере одной определяющей комплементарности области (CDR) из вариабельной области V_H и/или V_L , содержащей любую из последовательностей аминокислот, приведенных на фиг. 1. Соответствующие последовательности нуклеотидов, кодирующие вышеописанные вариабельные области, приведены в табл. III ниже. Примеры совокупностей областей CDR описанных выше последовательностей аминокислот области V_H

и/или V_L , приведены на фиг. 1. При этом, как обсуждается ниже, специалисту в данной области техники хорошо известно, что могут быть использованы альтернативные или дополнительные варианты CDR, последовательность аминокислот которых отличается от последовательностей, приведенных на фиг. 1, одной, двумя, тремя или даже большим числом аминокислот, в случае CDR2 и CDR3. Соответственно, согласно одному варианту реализации предложено антитело согласно настоящему изобретению или его НТТ-связывающий фрагмент, содержащее(ий) в вариабельной области по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) согласно фиг. 1, и/или одну или большее число соответствующих областей CDR, включающих одну или большее число замен аминокислот.

В настоящем изобретении также предложен ряд примеров связывающих молекул, например, антигенов и их связывающих фрагментов, распознающих С-концевую область НТТ, которые могут характеризоваться наличием в вариабельной области, например, связывающем домене по меньшей мере одной определяющей комплементарности области (CDR) вариабельной области V_H и/или V_L , содержащей любую из последовательностей аминокислот, приведенных на фиг. 1. Соответствующие последовательности нуклеотидов, кодирующие вышеописанные вариабельные области, приведены в табл. IV ниже. Примеры совокупностей областей CDR описанных выше последовательностей аминокислот области V_H и/или V_L приведены на фиг. 1. При этом, как обсуждается ниже, специалисту в данной области техники хорошо известно, что могут быть использованы альтернативные или дополнительные варианты CDR, последовательность аминокислот которых отличается от последовательностей, приведенных на фиг. 1, одной, двумя, тремя или даже большим числом аминокислот, в случае CDR2 и CDR3. Соответственно, согласно одному варианту реализации предложено антитело согласно настоящему изобретению или его НТТ-связывающий фрагмент, содержащее в вариабельной области по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) согласно фиг. 1, и/или одну или большее число соответствующих областей CDR, включающих одну или большее число замен аминокислот.

В настоящем изобретении также предложен ряд примеров связывающих молекул, например, антигенов и их связывающих фрагментов, распознающих N-концевую область НТТ, которые могут характеризоваться наличием в вариабельной области, например, в связывающем домене, по меньшей мере одной определяющей комплементарности области (CDR) из вариабельной области V_H и/или V_L , содержащей любую из последовательностей аминокислот, приведенных на фиг. 1. Соответствующие последовательности нуклеотидов, кодирующие вышеописанные вариабельные области, приведены в табл. VI ниже. Примеры совокупностей областей CDR описанных выше последовательностей аминокислот области V_H и/или V_L приведены на фиг. 1. При этом, как обсуждается ниже, специалисту в данной области техники хорошо известно, что могут быть использованы альтернативные или дополнительные варианты CDR, последовательность аминокислот которых отличается от последовательностей, приведенных на фиг. 1, одной, двумя, тремя или даже большим числом аминокислот, в случае CDR2 и CDR3. Соответственно, согласно одному варианту реализации предложено антитело согласно настоящему изобретению или его НТТ-связывающий фрагмент, содержащее в вариабельной области по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) согласно фиг. 1, и/или одну или большее число соответствующих областей CDR, включающих одну или большее число замен аминокислот.

Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению представлено любым из антигенов, содержащих последовательность аминокислот области V_H и/или V_L согласно фиг. 1, или соответствующей области V_H и/или V_L , включающей одну или большее число замен аминокислот. Предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению характеризуется сохранением когнатного спаривания тяжелых и легких цепей в соответствии с обнаруживаемым в В-клетке человека.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения антитело к НТТ, его НТТ-связывающий фрагмент, синтетический или биотехнологический вариант может быть оптимизирован(о) для обеспечения требуемой аффинности к связыванию мишени и фармакокинетических свойств. Соответственно, по меньшей мере одна аминокислота в области CDR или вариабельной области, подверженная модификациям, выбранным из группы, состоящей из гликозилирования, окисления, деаминации, расщепления пептидной связи, образования изоаспартата и/или неспаренного цистеина, заменяется мутированной аминокислотой, не содержащей такого изменения; либо из указанного антигена удаляют или в указанное антитело добавляют химическим или ферментативным путем по меньшей мере один фрагмент углевода. Примеры оптимизации аминокислот можно найти в табл. VII, где представлены антигены с индуцированными праймерами изменениями. Дополнительные модификации для оптимизации характеристик антигена описаны в источниках: Gavel et al., *Protein Engineering* 3 (1990), 433-442 и Helenius et al., *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004), 1019-1049.

Как вариант, антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, производное или вариант, которое(ый) конкурирует за связывание с НТТ по меньшей мере с одним из антигенов, содержащих область V_H и/или V_L согласно фиг. 1.

Антитело, содержащее по меньшей мере одну область V_H и/или V_L согласно фиг. 1, конкурирующее за связывание с НТТ, может быть дополнительно исследовано с применением дот-блоттинга и/или метода задержки на фильтре согласно описанию в примерах 6, 13, 18, 31 и/или 32. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанное антитело связывается с НТТ, предпоч-

тительно с НТТ, удлиненным за счет состоящего из 49 повторов полиглутаминового тракта (HD49), по оценке с применением дот-блоттинга и/или метода задержки на фильтре.

Результаты экспериментов, приведенные на фиг. 3, 7, 11, 21, 22, а также фиг. 32 и 33, и в примерах 6, 7, 13, 18, 26 и 32, предполагают, что некоторые из антител к НТТ согласно настоящему изобретению преимущественно связываются с обуславливающими заболевание мутированными и/или агрегированными формами НТТ человека, а не с другими белками, участвующими в образовании амилоида. Соответственно, согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению преимущественно распознает мутированные и/или агрегированные НТТ, и/или их фрагмент и/или производные, а не другие белки, участвующие в образовании амилоида.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к НТТ, его НТТ-связывающий фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное указанного антитела более предпочтительно распознает мутированные, агрегированные и/или растворимые формы НТТ, чем физиологичный НТТ.

Антитело согласно настоящему изобретению может представлять собой антитело человека, в частности, для терапевтического применения. Как вариант, антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело грызуна, содержащее элементы антител грызуна или гибридное антитело грызуна/человека, предпочтительно, антитело мыши, содержащее элементы антител мыши или гибридное антитело мыши/человека; или антитело крысы, содержащее элементы антител крысы или гибридное антитело крысы/человека, подходящие, в частности, для применения в способах диагностики и исследований на животных. Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению представляет собой гибридное антитело грызуна/человека или содержащее элементы антител грызуна антитело. Кроме того, согласно одному варианту реализации гибридное антитело согласно настоящему изобретению, т.е. содержащее переменные домены антитела человека и общие константные домены легких и тяжелых цепей мыши, связывается с высокой аффинностью с НТТ человека. Предпочтительно аффинность связывания гибридных антител аналогична аффинности связывания аналогов человека.

Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению получают из культивируемых моноклональных или олигоклональных культур В-клеток; проводят скрининг супернатанта культуры, содержащий продуцированные указанными В-клетками антитела, на присутствие антител к НТТ и их аффинность. Способ скрининга включает скрининг на связывание нативных мономеров, фибриллярных или нефибриллярных агрегатов, таких как олигомеры hНТТ, происходящие из синтетического полноразмерного пептида hНТТ, или, например, очищенные из плазмы человека или полученные путем рекомбинантной экспрессии.

Согласно описанию выше, благодаря синтезу в ходе иммунного ответа у человека моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению распознает эпитопы, в частности, обусловленные патологией, которые могут быть недоступны или менее иммуногенны при использовании иммунизации для получения, например, моноклональных антител мыши, и скрининга библиотек фагового дисплея *in vitro*, соответственно. Таким образом, целесообразно предположить, что эпитоп антитела человека к НТТ согласно настоящему изобретению является уникальным, и не существует других антител, способных к связыванию эпитопа, распознаваемого моноклональным антителом человека согласно настоящему изобретению. Уникальность антитела согласно настоящему изобретению дополнительно подтверждает тот факт, что, как показано на фиг. 19, 20, 24, 27-29, антитела согласно настоящему изобретению связывают специфические эпитопы мутированных и/или агрегированных форм НТТ, которые, как отмечено выше, в частности, обусловлены патологией, и обычные способы получения антител, такие как иммунизация или скрининг библиотек *in vitro*, могут не подходить для получения указанных антител.

Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение также охватывает в целом антитела к НТТ и НТТ-связывающие молекулы, конкурирующие с моноклональным антителом человека согласно настоящему изобретению за специфическое связывание с НТТ. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, отличающему(им)ся тем, что указанное антитело специфически связывается с тем же эпитопом в полипролиновой области НТТ, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.33C11, NI-302.74C11, NI-302.15F9, NI-302.39G12, NI-302.11A4, NI-302.22H9, NI-302.44D7, NI-302.37C12, NI-302.55D8, NI-302.7A8, NI-302.71F6, NI-302.11H6, NI-302.3D8, NI-302.18A1, NI-302.8F1, NI-302.52C9, NI-302.78H12 и NI-302.46C9. Кроме того, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение более конкретным образом относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, отличающему(им)ся тем, что указанное антитело специфически связывается с тем же эпитопом в богатой пролином области НТТ, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.63F3, NI-302.31F11, NI-302.2A2, NI-302.15D3 и/или NI-302.64E5. Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, которое(ый, ые) связывает(ют)ся с тем же эпитопом в С-концевой области НТТ, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.35C1 и/или NI-302-72F10. Согласно дополнительному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, которое(ый, ые) связыва-

ет(ют)ся с тем же эпитопом в N-концевой области НТТ, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.15E8. Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, которое(ый, ые) связывает(ют)ся с тем же эпитопом НТТ, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.6N9, NI-320.12H2, NI-302.8M1 и/или NI-302.4A6. Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, которое(ый, ые) связывает(ют)ся с тем же эпитопом НТТ, что и референсное антитело NI-302.7D8. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящее изобретение также относится в целом к антителам к НТТ и связывающим НТТ молекулам, конкурирующим с моноклональным антителом человека согласно настоящему изобретению за специфическое связывание с мутированными и/или агрегированными видами НТТ или их фрагментами, как показано на примерах 7, 13, 18, 31 и 33, а также на фиг. 7, 13, 19 и 31. Соответственно, настоящее изобретение также более конкретно относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, при этом указанное антитело специфически связывается с тем же эпитопом в полипролиновой области мутированных и/или агрегированных видов НТТ или их фрагментов, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.74C11, NI-302.15F9, NI-302.39G12, NI-302.11A4, NI-302.22H9, NI-302.37C12, NI-302.55D8, NI-302.78H12, NI-302.71F6, NI-302.33C11, NI-302.44D7, NI-302.7A8, NI-302.3D8, NI-302.46C9, NI-302.11H6, NI-302.18A1, NI-302.52C9 и/или NI-302.8F1. Кроме того, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение более конкретным образом относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, при этом указанное антитело специфически связывается с тем же эпитопом в богатой пролином области мутированных и/или агрегированных видов НТТ или их фрагментов, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.63F3, NI-302.31F11, NI-302.2A2, NI-302.15D3 и/или NI-302.64E5. Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, которое(ый, ые) связывает(ют)ся с тем же эпитопом в С-концевой области мутированных и/или агрегированных видов НТТ или их фрагментов, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.35C1 и/или NI-302.72F10. Согласно дополнительному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, которое(ый, ые) связывает(ют)ся с тем же эпитопом в N-концевой области мутированных и/или агрегированных видов НТТ или их фрагментов, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.15E8. Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, которое(ый, ые) связывает(ют)ся с тем же эпитопом НТТ, что и референсное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-302.6N9, NI-320.12H2, NI-302.8M1 и/или NI-302.4A6. Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или биотехнологическому производному, которое(ый) связывается с тем же эпитопом НТТ, что и референсное антитело NI-302.7D8.

Конкуренцию между антителами определяют посредством анализа, в ходе которого тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание референсного антитела с общим антигеном, таким как НТТ. Известны многочисленные виды анализа на конкурентное связывание, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), конкурентный сэндвич-анализ; см. *Stahli et al., Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; твердофазный прямой ИФА с биотином и авидином; см. *Kirkland et al., J. Immunol.* 137 (1986), 3614-3619 и *Cheung et al., Virology* 176 (1990), 546-552; прямой твердофазный анализ с мечением, прямой твердофазный сэндвич-анализ с мечением; см. *Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); прямой твердофазный РИА с мечением I^{125} ; 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 включает применение очищенного НТТ или мутированного и/или агрегированного НТТ, например, его олигомеров и/или фибрилл, связавшихся с твердой поверхностью или клетками, несущими что-либо из указанного, немеченого экспериментального иммуноглобулина и меченого референсного иммуноглобулина, т.е. моноклонального антитела человека согласно настоящему изобретению. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связавшейся с твердой поверхностью или клетками в присутствии экспериментального иммуноглобулина. Как правило, экспериментальный иммуноглобулин присутствует в избытке. Предпочтительно, анализ конкурентного связывания осуществляют в условиях, соответствующих описанию для ИФА (ELISA) в приведенных примерах. Антитела, идентифицированные посредством конкурентного анализа (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и референсное антитело, и антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, расположенным достаточно близко к эпитопу, связываемому референсным антителом, чтобы обуславливать возникновение стерического препятствия. Как правило, если конкурирующие антитело присутствует в избытке, оно ингибирует специфическое связывание референсного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50 или 75%. Таким образом, настоящее изобретение относится также к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производному, от-

личающемуся тем, что указанное антитело конкурентно ингибирует связывание с НТТ референсного антитела, выбранного из группы, состоящей из NI-302.33C11, NI-302.63F3, NI-302.35C1, NI-302.31F11, NI-302.2A2, NI-302.6N9, NI-302.74C11, NI-302.15F9, NI-302.39G12, NI-302.11A4, NI-302.22H9, NI-302.44D7, NI-302.37C12, NI-302.55D8, NI-302.7A8, NI-302.78H12, NI-302.71F6, NI-302.11H6, NI-302.3D8, NI-302.18A1, NI-302.8F1, NI-302.52C9, NI-302.46C9, NI-302.15E8, NI-302.64E5, NI-302.7D8, NI-302.72F10, NI-302.12H2, NI-302.8M1 и/или NI-302.4A6.

Настоящее изобретение относится также к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производному, отличающемуся тем, что указанное антитело конкурентно ингибирует связывание с мутированными и/или агрегированными видами НТТ или их фрагментами референсного антитела, выбранного из группы, состоящей из NI-302.74C11, NI-302.15F9, NI-302.39G12, NI-302.11A4, NI-302.22H9, NI-302.37C12, NI-302.55D8, NI-302.78H12, NI-302.71F6, NI-302.33C11, NI-302.44D7, NI-302.7A8, NI-302.3D8, NI-302.46C9, NI-302.11H6, NI-302.18A1, NI-302.52C9, NI-302.8F1, NI-302.63F3, NI-302.31F11, NI-302.2A2, NI-302.15D3, NI-302.35C1, NI-302.6N9, NI-302.7D8 и/или NI-302.72F10.

Согласно предпочтительному варианту реализации указанного антитела связывание антитела, его связывающего фрагмента, синтетического или биотехнологического варианта с НТТ, предпочтительно с НТТ, удлиненного за счет полиглутаминового тракта, состоящего из 49 (HD49) повторов, может быть измерено с применением анализа методом дот-блоттинга и/или задержки на фильтре согласно описанию в разделе "Примеры", в частности, 7, 13, 18, 31 и/или 33.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из вариательной области тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), причем по меньшей мере одна из областей V_H -CDR указанной вариательной области тяжелой цепи или по меньшей мере две области V_H -CDR указанной вариательной области тяжелой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентична(ы) последовательностям аминокислот референсной тяжелой цепи V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3 из антител согласно описанию в настоящем документе. Как вариант, области V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 указанной V_H по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны последовательностям аминокислот референсной тяжелой цепи V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 из антител согласно описанию в настоящем документе. Соответственно, в соответствии с указанным вариантом реализации вариательная область тяжелой цепи согласно настоящему изобретению содержит последовательности полипептидов V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, родственные группам, приведенным на фиг. 1, соответственно. На фиг. 1 представлены области V_H -CDR, определенные по системе Kabat, однако другие определения CDR, например, области V_H -CDR, определенные по системе Chothia, также включены в настоящее изобретение, и могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области техники с использованием данных, приведенных на фиг. 1.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из вариательной области тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), где области V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 содержат последовательности полипептидов, идентичные группам V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, приведенным на фиг. 1 соответственно. Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из вариательной области тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), где области V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 содержат последовательности полипептидов, идентичные группам V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, приведенным на фиг. 1, соответственно, за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти или шести замен аминокислот в любой V_H -CDR. Согласно определенным вариантам реализации указанные замены аминокислот являются консервативными.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из вариательной области легкой цепи иммуноглобулина (V_L), причем по меньшей мере одна из областей V_L -CDR указанной вариательной области легкой цепи или по меньшей мере две области V_L -CDR указанной вариательной области легкой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны последовательностям аминокислот референсной легкой цепи V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3 из антител согласно описанию в настоящем документе. Как вариант, области V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 указанной V_L по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны последовательностям аминокислот референсной легкой цепи V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 из антител согласно описанию в настоящем документе. Соответственно, в соответствии с указанным вариантом реализации вариательная область легкой цепи согласно настоящему изобретению содержит последовательности полипептидов V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, родственные полипептидам, приведенным на фиг. 1 соответственно. На фиг. 1 представлены области V_L -CDR, определенные согласно системе Kabat, однако другие определения CDR, например, области V_L -CDR, определенные согласно системе Chothia, также включены в настоящее изобретение.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из вариательной области легкой цепи иммуноглобулина (V_L), где области V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 областей содержат последовательности полипептидов, идентичные группам V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, приведенным на фиг. 1, соответственно. Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный поли-

пептид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина (V_L), где области V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 содержат последовательности полипептидов, идентичные группам V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, приведенным на фиг. 1, соответственно, за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти или шести замен аминокислот в любой V_L -CDR. Согласно определенным вариантам реализации указанные замены аминокислот являются консервативными.

Иммуноглобулин или кодирующая его кДНК может быть дополнительно модифицирован(а). Соответственно, согласно дополнительному варианту реализации способ согласно настоящему изобретению включает любой(ые) из этапов получения гибридного антитела, содержащего элементы антител мыши антитела, одноцепочечного антитела, Fab-фрагмента, биспецифического антитела, гибридного антитела, меченого антитела или аналога чего-либо из перечисленного. Соответствующие способы известны специалисту в данной области техники и описаны, например, в источнике: Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). Если производные указанных антител получают с применением техники фагового дисплея, может, как в системе BIAcore, применяться поверхностный плазмонный резонанс для повышения эффективности фаговых антител, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из антител, описанных в настоящем документе (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). Получение гибридных антител описано, например, в международной заявке WO 89/09622. Способы получения гуманизированных антител описаны, например, в заявке на европейский патент EP-A1 0239400 и в международной заявке WO 90/07861. Дополнительные источники антител для применения в соответствии с настоящим изобретением представлены так называемыми ксеногенными антителами. Общий принцип получения ксеногенных антител, таких как подобные антителам человека антитела у мышей, описан, например, в международных заявках WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 и WO 96/33735. Согласно описанию выше антитело согласно настоящему изобретению может существовать в различных формах, помимо полных антител; в том числе, например, в виде Fv, Fab и F(ab)₂, а также одиночных цепей; см. например, международную заявку WO 88/09344. Согласно одному варианту реализации, соответственно, предложено 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 соответствующая(ие) им цепь(цепи) иммуноглобулина могут быть дополнительно модифицированы с применением стандартных известных в данной области техник, например, путем удаления, вставки, замены, добавления и/или рекомбинации аминокислот(ы), и/или любой(ых) другой(их) модификации(й), известной(ых) в данной области техники, по отдельности или в комбинации. Способы введения таких модификаций в последовательность ДНК, соответствующей последовательности аминокислот цепи иммуноглобулина, хорошо известны специалисту 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 настоящему изобретению включают химическую и/или ферментативную дериватизацию одной или большего числа составляющих его аминокислот, в том числе модификации боковых цепей, модификации остова, и N- и C-концевые модификации, в том числе ацетилирование, гидроксилирование, метилирование, амидирование и присоединение фрагментов углеводов или липидов, кофакторов и т.п. Аналогичным образом, настоящим изобретением охвачено получение гибридных белков, которые содержат описанное антитело или какой-либо его фрагмент на аминоконце, соединенный с гетерологичной молекулой, такой как иммуностимулирующий лиганд, на карбоксильном конце; соответствующая техническая информация может быть найдена, например, в международной заявке WO 00/30680.

Антитела согласно настоящему изобретению могут также включать дополнительные модификации, оптимизирующие их терапевтический потенциал. Указанные модификации включают, не ограничиваясь перечисленными, модификации последовательности аминокислот антитела (например, вариабельных областей) и посттрансляционные модификации. Посттрансляционные модификации (ПТМ) представляют собой химические модификации, которые играют ключевую роль в функциональной протеомике, поскольку регулируют активность, локализацию и взаимодействие с другими клеточными молекулами, такими как белки, нуклеиновые кислоты, липиды и кофакторы. Соответственно, оптимизация антител может обеспечивать ряд преимуществ, таких как повышенная стабильность при хранении, а также фармакокинетический и/или фармакодинамический профиль, например, *in vivo* или *in vitro* время циркуляции антитела, улучшенная растворимость, стабильность, повышенная афинность к мишени, пониженная скорость диссоциации, улучшенная эффекторная функция константной области (Fc область) и профиль безопасности антитела, например, пониженная иммуногенность или пониженная восприимчивость к посттрансляционным модификациям, как показано, например, в источнике: Igawa et al., MAbs 3 (2011), 243-52. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к НТТ, его НТТ-связывающий фрагмент, синтетический или биотехнологический вариант может быть оптимизирован(о), при этом по меньшей мере одну аминокислоту в области CDR или вариабельной области, подверженную модификациям, которые включают, не ограничиваясь перечисленными, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, деамидирование, ковалентное присоединение

фламина, ковалентное присоединение фрагмента гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрестное связывание, циклизацию, образование дисульфидных связей, изомеризацию, деметилирование, образование ковалентных перекрестных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, γ -карбоксихлирование, гликозилирование, образование ГФИ-якоря, гидроксиглирование, гидролиз, иодирование, метилирование, миристиолирование, окисление, пегилирование, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное тРНК добавление аминокислот в белки, например, аргинилирование и убиквитинирование (см., например, Creighton, "Proteins: Structures and Molecular Properties," 2nd eds., Freeman and Co., N.Y., 1992; "Postranslational Covalent Modification of Proteins," Johnson, eds., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182 (1990), 626-646; Rattan et al., *Ann. NY. Acad. Sci.* 663 (1992) 48-62), заменяют мутированной аминокислотой, которой несвойственно такое изменение; либо из указанного антитела удаляют или в указанное антитело добавляют химическим или ферментативным путем по меньшей мере один фрагмент углевода. Согласно предпочтительному варианту реализации указанные модификации выбраны из группы, состоящей из гликозилирования, окисления, дезаминирования, расщепления пептидных связей, образования изоаспартата и/или неспаренного цистеина. Дополнительные модификации для оптимизации полезности антител к НТТ или НТТ-связывающих молекул в качестве терапевтических агентов хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в источнике: Igawa et al., *MAbs* 3 (2011), 243-52, содержание которого включено в настоящий документ. Добавление или удаление углеводных фрагментов может достигаться химическим или ферментативным путем, и подробно описано, например, в источниках: Berg et al. "Biochemistry" 5th eds W H Freeman, New York 2002; WO 87/05330; Aplin et al., *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22 (1981), 259-306; Hakimuddin et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259 (1987), 10-52; Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118 (1981), 131; Thotakura et al., *Meth. Enzymol.* 138. (1987), 350.

Кроме того, настоящим изобретением охвачены в том числе пептиды, содержащие связывающую молекулу согласно описанию выше, например, содержащие область CDR3 варибельной области любого из упомянутых антител, в частности, CDR3 тяжелой цепи, поскольку, как часто наблюдалось, тяжелая цепь CDR3 (HCDR3) представляет собой область, отличающуюся большей степенью варибельности и преимущественным участием во взаимодействии антигена с антителом. Такие пептиды могут легко быть синтезированы или продуцированы рекомбинантным способом для получения связывающего агента, подходящего для применения согласно настоящему изобретению. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области техники. Пептиды могут быть синтезированы, например, с применением автоматических коммерчески доступных синтезаторов пептидов. Указанные пептиды могут также быть получены с применением рекомбинантных техник, путем включения ДНК для экспрессии указанного пептида в экспрессионный вектор и трансформации указанным экспрессионным вектором клеток для продуцирования указанного пептида.

Таким образом, настоящее изобретение относится к любой связывающей молекуле, например, антителу или его связывающему фрагменту, направленному на антитела к НТТ и/или антитела, способные к связыванию мутированных и/или агрегированных видов НТТ, и/или их фрагментов согласно настоящему изобретению, и демонстрирующие упомянутые качества, т.е. в частности, распознающие НТТ и/или мутированные и/или агрегированные виды НТТ, и/или их фрагменты. Такие антитела и связывающие молекулы могут быть протестированы на специфичность связывания и аффинность с применением ИФА (ELISA) и иммуногистохимии согласно описанию в настоящем документе, см., например, примеры. Тестирование указанных характеристик антител и связывающих молекул может проводиться также с применением вестерн-блоттинга.

Во варианте получения иммуноглобулинов, альтернативном получению непосредственно из культуры В-клеток или В-клеток памяти, клетки могут применяться в качестве источника реаранжированных локусов тяжелых цепей и легких цепей для последующей экспрессии и/или генетических манипуляций. Реаранжированные гены антител могут быть подвергнуты обратной транскрипции с подходящих мРНК для получения кДНК. При необходимости, константная область тяжелой цепи может быть заменена на область другого изотипа или полностью удалена. Варибельные области могут быть соединены для кодирования одноцепочечных Fv-областей. Несколько Fv-областей могут быть соединены для обеспечения способности к связыванию более чем с одной мишенью; либо могут использоваться комбинации гибридных тяжелых и легких цепей. При наличии доступного генетического материала дизайн аналогов согласно описанию выше, сохраняющих способность связывать требуемую мишень, представляет собой несложную задачу. Способы клонирования варибельных областей антител и получения рекомбинантных антител известны специалисту в данной области техники и описаны, например, в источнике: Gilliland et al., *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20; Doenecke et al., *Leukemia* 11 (1997), 1787-1792.

После получения подходящего генетического материала и, при необходимости, его модификации для кодирования аналога, кодирующие последовательности, в том числе кодирующие, как минимум, варибельные области тяжелой и легкой цепей, могут быть встроены в экспрессионные системы, содержащиеся в векторах, которыми могут быть трансфицированы стандартные рекомбинантные клетки-хозяева.

Могут применяться различные подобные клетки-хозяева; однако клетки млекопитающих предпочтительны для эффективного процессинга. Типичные линии клеток млекопитающих, подходящие для указанной цели, включают, не ограничиваясь перечисленными, клетки CHO, клетки НЕК 293 или клетки NSO.

Затем получают антитело или его аналог путем культивирования модифицированного рекомбинантного хозяина в условиях культивирования, подходящих для роста указанных клеток-хозяев и экспрессии кодирующих последовательностей. Затем антитела извлекают путем выделения из культуры. Экспрессионные системы предпочтительно конструируют таким образом, что они включают сигнальные пептиды, чтобы полученные антитела секретировались в среду; однако также возможно и внутриклеточное получение.

В соответствии с описанием выше настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему антитело или эквивалентную связывающую молекулу согласно настоящему изобретению, в случае антитела, предпочтительно, по меньшей мере вариабельную область иммуноглобулиновой цепи антитела согласно описанию выше. Как правило, указанная вариабельная область, кодируемая полинуклеотидом, содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) вариабельной области VH и/или VL указанного антитела.

Для специалиста в данной области техники будет очевидным, что вариабельный домен антитела, содержащего вышеописанный вариабельный домен, может использоваться для конструирования других полипептидов или антител, обладающих требуемой специфичностью и биологической функцией. Соответственно, настоящим изобретением также охвачены полипептиды и антитела, содержащие по меньшей мере одну область CDR вышеописанного вариабельного домена и обеспечивающие преимущество, состоящее в связывающих характеристиках, по существу идентичных или аналогичных характеристикам антитела, описанного в прилагаемых примерах. Специалисту в данной области техники известно, что аффинность связывания может быть повышена посредством осуществления замен аминокислот в составе CDR или гипервариабельных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917), которые частично перекрываются с областями CDR по определению Kabat; см., например, Riechmann, et al., *Nature* 332 (1988), 323-327. Соответственно, настоящее изобретение также относится к антителам, в которых одна или большее число упомянутых областей CDR содержат одну или большее число замен, предпочтительно не более двух замен аминокислот. Предпочтительно одна или обе иммуноглобулиновые цепи антитела согласно настоящему изобретению содержат две или все три области CDR вариабельных областей согласно фиг. 1.

Связывающие молекулы, например антитела или антигенсвязывающие фрагменты, синтетические или биотехнологические варианты или их производные согласно настоящему изобретению, как известно специалистам в данной области техники, могут содержать константную область, которая опосредует одну или большее число эффекторных функций. Например, связывание компонента C1 комплемента с константной областью антитела может активировать систему комплемента. Активация комплемента важна для опсонизации и лизиса клеточных патогенов. Активация комплемента также стимулирует воспалительный ответ и может также быть задействована в аутоиммунной гиперчувствительности. Кроме того, антитела связываются с рецепторами на различных клетках посредством области Fc, при этом связывающий Fc-рецептор сайт в области Fc антитела связывается с Fc-рецептором (FcR) на клетке. Существует ряд Fc-рецепторов, специфических для разных классов антител, в том числе IgG (гамма-рецепторы), IgE (эпсилон-рецепторы), IgA (альфа-рецепторы) и IgM (мю-рецепторы). Связывание антитела с Fc-рецепторами на клеточных поверхностях запускает ряд разнообразных важных биологических реакций, в том числе поглощение и уничтожение покрытых антителами частиц, выведение иммунных комплексов, лизис покрытых антителами целевых клеток киллерными клетками (так называемая антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность, или АЗКЦ), высвобождение воспалительных медиаторов, плацентарный перенос и контроль синтеза иммуноглобулинов.

Соответственно, определенные 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 была удалена или иным образом изменена для обеспечения требуемых биохимических характеристик, например, сниженных эффекторных функций, способности к нековалентной димеризации, повышенной способности к локализации на участке агрегации и отложения НТТ, уменьшенного времени полужизни в сыворотке или увеличенного времени полужизни в сыворотке по сравнению с целым неизмененным антителом, обладающим приблизительно такой же иммуногенностью. Например, некоторые антитела для применения в способах диагностики и лечения, описанных в настоящем документе, представлены антителами с удаленными доменами, которые содержат полипептидную цепь, аналогичную тяжелой цепи иммуноглобулина, однако в указанной цепи отсутствует по меньшей мере часть одного или большего числа доменов тяжелой цепи. Так, в определенных антителах полностью удаляют один домен константной области модифицированного антитела, например, полностью или частично удаляют домен CH2. Согласно другим вариантам реализации определенных антител для применения в способах диагностики и лечения, описанных в настоящем документе, содержат константную область, например, константную область тяжелой цепи IgG, которая изменена

для элиминации гликозилирования; такие антитела называются в тексте настоящего документа агликозилированными или Agly-антителами. Такие Agly-антитела могут быть получены ферментативным путем, а также путем конструирования консенсусного(ых) сайта(ов) гликозилирования в константной области. Без привязки к теории считается, что Agly-антитела могут отличаться улучшенным профилем безопасности и стабильности *in vivo*. Способы получения агликозилированных антител, обладающих требуемой эффекторной функцией, приведены, например, в международной заявке WO 2005/018572, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки.

В определенных антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных, описанных в настоящем документе, Fc-часть может быть мутирована для понижения эффекторной функции с применением известных в данной области техник. Например, удаление или инактивация (за счет точечных мутаций или с применением других способов) домена константной области может уменьшать связывание с Fc-рецептором циркулирующего модифицированного антитела, способствуя локализации в областях присутствия НТТ. В других случаях модификации константной области в соответствии с настоящим изобретением могут ограничивать связывание комплемента и, соответственно, уменьшать время полужизни в сыворотке и неспецифическое связывание конъюгированного цитотоксина. Могут применяться и другие модификации константной области для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных фрагментов, обеспечивающие улучшенную локализацию благодаря повышенной специфичности в отношении антигена или гибкости антитела. Итоговый физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты указанных модификаций, такие как локализация в области НТТ, биораспределение и время полужизни в сыворотке, могут легко быть измерены и количественно определены с применением хорошо известных иммунологических техник без излишнего экспериментирования.

В определенных антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных, описанных в настоящем документе, Fc-часть может быть мутирована или заменена альтернативными белковыми последовательностями для усиления поглощения клетками антител путем, например, усиления опосредованного рецепторами эндоцитоза антител через Fcγ-рецепторы, LRP или рецепторы Thyl, или с помощью "технологии суперантител", которая, как сообщается, позволяет вводить антитела в живые клетки без их повреждения (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241). Например, гибридные белки связывающей области антитела и когнатные белковые лиганды рецепторов клеточной поверхности или би- или мультиспецифические антитела со специфическими последовательностями, связывающимися с НТТ, а также рецепторами клеточной поверхности, могут быть сконструированы с применением техник, известных в данной области техники.

В определенных антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных, описанных в настоящем документе, Fc-часть может быть мутирована или заменена альтернативными белковыми последовательностями, или указанное антитело может быть химически модифицировано для увеличения способности к проникновению через гематоэнцефалический барьер.

Модифицированные формы антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных согласно настоящему изобретению могут быть получены из полноразмерных антител-предшественников или исходных антител с применением техник, известных в данной области техники. Примеры техник подробно описаны в настоящем документе. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть получены или произведены с применением техник, известных в данной области техники. Согласно определенным вариантам реализации молекулы антител или их фрагментов "получают рекомбинантным способом", т.е. с применением технологии рекомбинантной ДНК. Примеры техник для получения молекул антител или их фрагментов подробно описаны в различных разделах настоящего документа.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению также включают производные, модифицированные, например, посредством ковалентного присоединения к антителу молекулы любого типа, не предотвращающего специфическое связывание указанного антитела с когнатным эпитопом. Например, но без ограничения, производные антител включают антитела, которые были модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.п. Любая из многочисленных химических модификаций может осуществляться путем применения известных техник, в том числе, не ограничиваясь указанными, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.п. Кроме того, указанное производное может содержать одну или большее число неклассических аминокислот.

Согласно конкретным предпочтительным вариантам реализации антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных согласно настоящему изобретению они не вызывают повреждающего иммунного ответа у подлежащего лечению животного, например, у человека. Согласно определенным вариантам реализации связывающие молекулы, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению, происходят от пациента, например, пациента-человека, и впоследствии применяются у того же вида, от которого получены, например, у человека, что

смягчает или минимизирует возникновение повреждающих иммунных реакций.

Для снижения иммуногенности антитела может дополнительно быть использована деиммунизация. В настоящем документе термин "деиммунизация" включает изменение антитела с модификацией Т-клеточных эпитопов; см., например, международные заявки WO 98/52976 и WO 00/34317. Например, анализируют последовательности V_H и V_L исходного антитела и "картируют" Т-клеточный эпитоп человека из каждой V-области, выявляя локализацию эпитопов относительно определяющих комплементарность областей (CDR) и других ключевых остатков в составе указанной последовательности. Индивидуальные Т-клеточные эпитопы из карты Т-клеточных эпитопов анализируют, чтобы идентифицировать варианты замен аминокислот с незначительным риском изменения активности получаемого в итоге антитела. Конструируют ряд альтернативных последовательностей V_H и V_L , содержащих комбинации замен аминокислот; затем указанные последовательности встраивают в ряд связывающих полипептидов, например, НТТ-специфических антител или их иммуноспецифических фрагментов для применения в способах диагностики и лечения согласно описанию в настоящем документе, и затем тестируют их на функциональность. Как правило, получают и тестируют от 12 до 24 вариантов антител. Затем гены полных тяжелых и легких цепей, содержащих модифицированные V-области и C-области человека, клонируют в экспрессионные векторы, и полученные плазмиды вводят в линии клеток для получения полного антитела. Затем указанные антитела сравнивают в соответствующих биохимических и биологических анализах, и идентифицируют оптимальный вариант.

Моноклональные антитела могут быть получены с применением широкого ряда техник, известных в данной области техники, включающего применение гибридом, рекомбинантной технологии и технологии фагового дисплея, или их комбинации. Например, моноклональные антитела могут быть получены с применением гибридомных техник, включающих известные в данной области техники и описанные, например, в источнике: Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988); Hammerling et al., в источнике: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y., 563-681 (1981), указанные источники полностью включены в настоящий документ посредством ссылок. Термин "моноклональное антитело" в настоящем документе не ограничен антителами, получаемыми с применением гибридомной технологии. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, происходящему из единственного клона, в том числе любого эукариотического, прокариотического или фагового клона, а не к способу его получения. Соответственно, термин "моноклональное антитело" не ограничен антителами, получаемыми с применением гибридомной технологии. Согласно определенным вариантам реализации антител согласно настоящему изобретению происходят из В-клеток человека, которые были immortalized путем трансформации вирусом Эпштейна-Барра согласно описанию в настоящем документе.

В хорошо известном способе получения гибридом (Kohler et al., *Nature* 256 (1975), 495) относительно короткоживущие, или мортальные лимфоциты млекопитающего, например В-клетки, происходящие от субъекта-человека согласно описанию в настоящем документе, соединяют с immortalized линией опухолевых клеток (например, линией клеток миеломы), соответственно, с получением гибридных клеток или "гибридом", immortalized и способных продуцировать генетически кодируемое В-клеточное антитело. Полученные гибриды разделяют на генетические моноштаммы путем селекции, разведения и многократного культивирования каждого из индивидуальных штаммов, содержащих конкретные гены, для получения одного антитела. Они продуцируют однотипные антитела к нужному антигену, которые, ввиду их гомогенного генетического происхождения, называют "моноклональными".

Гибридомные клетки, полученные соответствующим образом, высевает и культивируют в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или большее количество веществ, ингибирующих рост или выживание негибридных исходных клеток миеломы. Специалистам в данной области техники будет понятно, что реагенты, линии клеток и среды для получения, отбора и культивирования гибридом коммерчески доступны из ряда источников; хорошо известны стандартизированные протоколы. Как правило, культуральную среду, где происходит культивирование гибридомных клеток, анализируют на наличие синтезированных моноклональных антител к требуемому антигену. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцированных гибридомными клетками, определяют с применением анализов *in vitro*, таких как иммунопреципитация, радиоиммунологический анализ (РИА) или иммуносорбентный ферментный анализ (ELISA) согласно описанию в настоящем документе. После идентификации гибридомных клеток, которые продуцируют антитела, обладающие требуемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, указанные клоны могут быть субклонированы с применением процедур серийного разведения и культивирования с использованием стандартных методов; см., например, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), 59-103. Следует также иметь в виду, что моноклональные антитела, секретируемые субклонами, могут быть выделены из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки посредством стандартных процедур очищения, таких как, например, хроматография с белком А, хроматография с гидроксипатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Согласно другому варианту реализации путем микро манипулирования могут быть отобраны лимфоциты и выделены гены вариабельных областей. Например, могут быть получены моноклеарные

клетки периферической крови от иммунизированного или обладающего природным иммунитетом млекопитающего, например, человека, и культивированы на протяжении приблизительно 7 дней *in vitro*. Может проводиться скрининг указанных культур на специфические IgG, которые отвечают критериям скрининга. Могут быть выделены клетки из лунок, показавших положительные результаты. Индивидуальные Ig-продуцирующие В-клетки могут быть выделены с применением FACS-сортирования или посредством идентификации в комплемент-опосредованном анализе методом пробы на гемолитические бляшки, Ig-продуцирующие В-клетки могут быть перемещены в пробирку с помощью микроманипулирования, и гены V_H и V_L амплифицированы с применением, например, ОТ-ПЦР. Гены V_H и V_L могут быть клонированы в несущий антитело экспрессионный вектор и трансфицированы в клетки (например, эукариотические или прокариотические клетки) для экспрессии.

Как вариант, продуцирующие антитело линии клеток могут быть выбраны и культивированы с применением техник, хорошо известных специалисту в данной области техники. Такие техники описаны в различных лабораторных руководствах и основных публикациях. Кроме того, техники, подходящие для применения в настоящем изобретении согласно приведенному ниже описанию описаны в источнике: *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки, включая приложения.

Фрагменты антител, которые распознают специфические эпитопы, могут быть получены путем применения известных техник. Например, фрагменты Fab и $F(ab')_2$ могут быть получены рекомбинантным способом или путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с применением ферментов, таких 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 домен CH1 тяжелой цепи. Такие фрагменты достаточны для применения, например, в иммунодиагностических процедурах, включающих связывание иммуноспецифических частей иммуноглобулинов с реагентами для детекции, такими как радиоизотопы.

Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере одну область CDR молекулы антитела. Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере две области CDR из одной или большего числа молекул антитела. Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере три области CDR из одной или большего числа молекул антитела. Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере четыре области CDR из одной или большего числа молекул антитела. Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере пять областей CDR из одной или большего числа молекул антитела. Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере шесть областей CDR из одной или большего числа молекул антитела. Примеры молекул антитела, содержащих по меньшей мере одну область CDR, которые могут быть включены в рассматриваемые антитела, описаны в настоящем документе.

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

Согласно одному варианту реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное согласно настоящему изобретению включает синтетическую константную область, в которой один или большее число доменов частично или полностью удалены ("антитела с удаленными доменами"). Согласно определенным вариантам реализации подходящие модифицированные антитела содержат конструкции с удаленными доменами или варианты, где был полностью удален домен CH2 (конструкции Δ CH2). Согласно другим вариантам реализации удаленный домен может быть заменен на короткий соединительный пептид для обеспечения гибкости и свободы движений вариабельной области. Специалисты в данной области техники будут понятно, что такие конструкции, в частности, являются предпочтительными ввиду регуляторного действия домена CH2 на скорость катаболизма указанного антитела. Конструкции с удаленными доменами могут быть получены с применением вектора, кодирующего константный домен IgG₁ человека, см., например, международные заявки WO 02/060955 и WO 02/096948A2. Указанный вектор конструируют для удаления домена CH2 и получения синтетического вектора, экспрессирующего константную область IgG₁ с удаленными доменами.

Согласно определенным вариантам реализации антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению представляют собой миниантитела. Миниантитела могут быть получены с применением способов, известных в данной области техники, см., например, патент США 5837821 или международную заявку WO 94/09817.

Согласно одному варианту реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное согласно настоящему изобретению включает тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую удаление или замену незначительного числа аминокислот или даже одной аминокислоты, если это обеспечивает связывание мономерных субъединиц. Например, мутации одной аминокислоты в выбранных участках домена CH2 может быть достаточно для существенного уменьшения связывания Fc, с

улучшением таким образом локализации в области НТТ. Аналогичным образом, целесообразным может быть простое удаление той части одного или нескольких доменов константной области, которая контролирует эффекторную функцию (например, связывание комплемента), которую требуется модулировать. Такие частичные удаления константных областей могут улучшать выбранные характеристики антитела (время полужизни в сыворотке) при сохранении других нужных функций, связанных с интактным рассматриваемым доменом константной области. Кроме того, как упоминалось выше, константные области описанных антител могут быть синтетическими, включающими мутацию или замену одной или большего числа аминокислот, улучшающую профиль итоговых конструкций. При этом может быть возможным нарушение активности, обеспечиваемой консервативным связывающим сайтом (например, связывание Fc) при сохранении по существу конфигурации и профиля иммуногенности модифицированного антитела. Другие варианты реализации предусматривают добавление одной или большего числа аминокислот в константную область для усиления нужных свойств, например, эффекторной функции, или для обеспечения более эффективного присоединения цитотоксинов или углеводов. Согласно таким вариантам реализации может быть целесообразным встраивание или репликация конкретных последовательностей, происходящих из выбранных доменов константных областей.

В настоящем изобретении также предложены антитела, которые содержат, по существу состоят или состоят из вариантов (в том числе производных) молекул антител (например, областей V_H и/или областей V_L), описанных в настоящем документе, причем указанные антитела или их фрагменты иммуноспецифически связываются с НТТ. Для введения мутаций в последовательность нуклеотидов, кодирующую антитело, могут применяться стандартные техники, известные специалистам в данной области техники, в том числе, однако не ограничиваясь указанными, сайт-специфический мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, которые приводят к заменам аминокислот. Предпочтительно, указанные варианты (в том числе производные) кодируют менее чем 50 замен аминокислот, менее чем 40 замен аминокислот, менее чем 30 замен аминокислот, менее чем 25 замен аминокислот, менее чем 20 замен аминокислот, менее чем 15 замен аминокислот, менее чем 10 замен аминокислот, менее чем 5 замен аминокислот, менее чем 4 замены аминокислот, менее чем 3 замены аминокислот или менее чем 2 замены аминокислот относительно референсной области V_H , V_H -CDR1, V_H -CDR2, V_H -CDR3, области V_L , V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3. "Консервативная замена аминокислоты" представляет собой замену, при которой остаток аминокислоты заменяется остатком аминокислоты, имеющим боковую цепь с аналогичным зарядом. В данной области техники были определены семейства остатков аминокислот с боковыми цепями, имеющими аналогичные заряды. Указанные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), 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). Как вариант, мутации могут быть введены случайным образом на протяжении всей кодирующей последовательности или части кодирующей последовательности, например, посредством насыщающего мутагенеза, и может быть проведен скрининг биологической активности полученных мутантов для идентификации мутантов, сохранивших активность (например, способность связывать НТТ, и/или мутированные и/или агрегированные виды НТТ, и/или их фрагменты).

Например, возможно введение мутаций только в каркасные области или только в области CDR молекулы антитела. Введенные мутации могут представлять собой молчащие или нейтральные миссенс-мутации, например, не оказывать эффекта или оказывать незначительный эффект на способность антитела связывать антиген; фактически, некоторые такие мутации вообще не изменяют последовательность аминокислот. Указанные типы мутаций могут подходить для оптимизации частоты использования кодонов, или усовершенствования получения гибридных антител. Кодон-оптимизированные кодирующие области, кодирующие антитела согласно настоящему изобретению, описаны в различных разделах настоящего документа. Как вариант, не являющиеся нейтральными миссенс-мутации могут изменять способность антитела к связыванию антигена. Большинство молчащих и нейтральных миссенс-мутаций предположительно локализованы в каркасных областях, тогда как большинство не являющихся нейтральными миссенс-мутаций предположительно локализованы в CDR, хотя это не является абсолютным требованием. Специалист в данной области техники сможет сконструировать и протестировать мутантные молекулы, обладающие нужными свойствами, например, обеспечивающие отсутствие изменений антигенсвязывающей активности или изменение связывающей активности (например, усилением антигенсвязывающей активности или изменением специфичности антитела). После мутагенеза кодируемый белок может быть экспрессирован обычным способом, и функциональная и/или биологическая активность кодируемого белка, (например, способность иммуноспецифически связывать по меньшей мере один эпитоп НТТ и/или мутированные и/или агрегированные виды НТТ, и/или их фрагменты) может быть определена с применением техник, описанных в настоящем документе, или обычных модификаций техник, известных в данной области техники.

III. Кодирование антитела полинуклеотидами

Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное может состоять из любого полирибонуклеотида или полидезоксирибонуклеотида, который может быть представлен немодифицированной РНК или ДНК, или модифицированной РНК или ДНК. Например, полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное может состоять из одноцепочечной и двуцепочечной ДНК; ДНК, которая представляет собой смесь одноцепочечных и двуцепочечных областей; одноцепочечной и двуцепочечной РНК; и РНК, которая представляет собой смесь одноцепочечных и двуцепочечных областей; гибридных молекул, содержащих ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, чаще, двуцепочечными, или представляют собой смесь одноцепочечных и двуцепочечных областей. Кроме того, полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, может состоять из трехцепочечных областей, содержащих РНК или ДНК, либо и РНК, и ДНК. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное может также содержать одно или большее число модифицированных оснований, или ДНК- или РНК-остовов, модифицированных для обеспечения стабильности или для других целей. "Модифицированные" основания включают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. Могут осуществляться различные модификации ДНК и РНК; соответственно, "полинуклеотид" включает формы, модифицированные химическим, ферментативным или метаболическим путем.

Выделенный полинуклеотид, кодирующий не встречающийся в природе вариант полипептида, происходящего из иммуноглобулина (например, часть тяжелой цепи или часть легкой цепи иммуноглобулина) может быть получен путем введения одной или большего числа замен, добавлений или удалений нуклеотидов в последовательность нуклеотидов иммуноглобулина, таким образом, что в кодируемый белок вводит(ят)ся одна или большее число замен, добавлений или удалений аминокислот. Мутации могут быть введены с применением стандартных техник, таких как сайт-специфический мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Предпочтительно, при консервативных заменах аминокислот заменяют один или большее число остатков аминокислот, не относящихся к незаменимым.

Как хорошо известно, РНК может быть выделен из исходных В-клеток, гибридомных клеток или других трансформированных клеток с помощью стандартных техник, таких как экстракция изотиоцианатом гуанидина и осаждение с последующим проведением центрифугирования или хроматографии. При необходимости, мРНК может быть выделена из тотальной РНК с применением стандартных техник, таких как хроматография с олиго(dT)-целлюлозой. Подходящие техники известны в данной области техники. Согласно одному варианту реализации кДНК, которые кодируют легкие и тяжелые цепи антитела, могут быть получены, одновременно или по отдельности, с применением обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы в соответствии с хорошо известными способами. ПЦР может быть инициирована консенсусными праймерами, соответствующими константной области, или специфическими праймерами на основе описанных в опубликованных источниках последовательностей ДНК и аминокислот тяжелых и легких цепей. Согласно описанию выше, для выделения клонов ДНК, кодирующих легкие и тяжелые цепи антитела, также может применяться ПЦР. В указанном случае может проводиться скрининг библиотек с применением консенсусных праймеров или гомологичных зондов большего размера, таких как зонды, соответствующие константной области человека. ДНК, как правило плазмидная ДНК, может быть выделена из клеток с применением техник, известных в данной области техники, и после проведения рестрикционного картирования секвенирована в соответствии со стандартными хорошо известными техниками, подробно описанными, например, в упомянутых выше источниках, относящихся к техникам рекомбинантной ДНК. Разумеется, ДНК может быть представлена синтетической ДНК в соответствии с настоящим изобретением в любой момент во время процесса выделения или последующего анализа.

В указанном контексте настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему по меньшей мере связывающий домен или варируемую область цепи иммуноглобулина антитела согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей варируемую область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), причем по меньшей мере одна область CDR варируемой области тяжелой цепи или по меньшей мере две области V_H -CDR варируемой области тяжелой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90, или 95% идентичны последовательностям аминокислот референсной тяжелой цепи V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3 из антител согласно описанию в настоящем документе. Как вариант, области V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3 из указанной V_H по меньшей мере на 80, 85, 90, или 95% идентичны последовательностям аминокислот референсной тяжелой цепи V_H -CDR1, V_H -CDR2, и V_H -CDR3 из антител согласно описанию в настоящем документе. Соответственно, в соответствии с указанным вариантом реализации варируемая область тяжелой цепи согласно настоящему изобретению содержит последовательности полипептидов V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3, родственные последовательностям полипептидов, приведенных на фиг. 1.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей варируемую область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), причем по меньшей мере одна из областей

V_L-CDR указанной вариабельной области легкой цепи или по меньшей мере две области V_L-CDR указанной вариабельной области легкой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны последовательностям аминокислот референсной легкой цепи V_L-CDR1, V_L-CDR2 или V_L-CDR3 из антител согласно описанию в настоящем документе. Как вариант, области V_L-CDR1, V_L-CDR2 или V_L-CDR3 указанной V_L по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны последовательностям аминокислот референсной легкой цепи V_L-CDR1, V_L-CDR2, и V_L-CDR3 из антител согласно описанию в настоящем документе. Соответственно, в соответствии с указанным вариантом реализации вариабельная область легкой цепи согласно настоящему изобретению содержит последовательности полипептидов V_L-CDR1, V_L-CDR2 или V_L-CDR3, родственные последовательностям полипептидов, приведенным на фиг. 1.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), где области V_H-CDR1, V_H-CDR2, и V_H-CDR3 содержат последовательности полипептидов, идентичные группам V_H-CDR1, V_H-CDR2, и V_H-CDR3, приведенным на фиг. 1.

Как известно в данной области техники, "идентичность последовательностей" двух полипептидов или двух полинуклеотидов определяют путем сравнения последовательности аминокислот или последовательности нуклеиновых кислот одного полипептида или полинуклеотида с последовательностью второго полипептида или полинуклеотида. Согласно описанию в настоящем документе, идентичность любого конкретного полипептида другому полипептиду, составляющая по меньшей мере приблизительно на 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%, может быть определена с применением способов и компьютерных программ/программного обеспечения, известных в данной области техники, например, но не ограничиваясь указанным, с применением программы BESTFIT (пакет ПО для анализа последовательностей Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). В программе BESTFIT используется алгоритм локальной гомологии Смита и Уотермана (Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489) для обнаружения максимально гомологичного сегмента двух последовательностей. При использовании BESTFIT или любой другой программы для выравнивания последовательностей для определения, например, 95% идентичности конкретной последовательности референсной последовательности в соответствии с настоящим изобретением, параметры задают, разумеется, таким образом, чтобы рассчитать процент идентичности на всем протяжении полноразмерной референсной последовательности полипептида, и что допускаются пропуски в гомологии, составляющие до 5% от общего числа аминокислот в референсной последовательности.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанный полинуклеотид содержит, состоит по существу или состоит из нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность полинуклеотидов области V_H или V_L антитела к НТТ и/или антитела, распознающего полипролиновую область НТТ, и/или мутированные и/или агрегированные виды НТТ, и/или их фрагменты согласно данным, приведенным в табл. II. Кроме того, согласно одному варианту реализации указанный полинуклеотид содержит, состоит по существу или состоит из нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность полинуклеотидов области V_H или V_L антитела к НТТ и/или антитела, распознающего богатую пролином область НТТ, и/или мутированные и/или агрегированные виды НТТ, и/или их фрагменты согласно данным, приведенным в табл. III; и/или также распознающее С-концевую область НТТ, и/или мутированные и/или агрегированные виды НТТ, и/или их фрагменты согласно данным, приведенным в табл. IV; и/или также распознающее богатую Q/P область НТТ, и/или мутированные и/или агрегированные виды НТТ, и/или их фрагменты согласно данным, приведенным в табл. VII. Кроме того, согласно одному варианту реализации указанный полинуклеотид содержит, состоит по существу или состоит из нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность полинуклеотидов области V_H или V_L антитела к НТТ и/или антитела, распознающего НТТ, и/или мутированные и/или агрегированные виды НТТ, и/или их фрагменты согласно данным, приведенным в табл. V. Кроме того, согласно одному варианту реализации указанный полинуклеотид содержит, состоит по существу или состоит из нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность полинуклеотидов области V_H или V_L антитела к НТТ и/или антитела, распознающего N-концевую область НТТ, и/или мутированные и/или агрегированные виды НТТ, и/или их фрагменты согласно данным, приведенным в табл. VI. Кроме того, согласно одному варианту реализации указанный полинуклеотид содержит, состоит по существу или состоит из нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность полинуклеотидов области V_H или V_L антитела к НТТ и/или антитела, распознающего НТТ, и/или мутированные и/или агрегированные виды НТТ, и/или их фрагменты согласно данным, приведенным в табл. V. Согласно дополнительному или альтернативному варианту реализации указанный полинуклеотид содержит, состоит по существу или состоит из нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность полинуклеотидов области V_H или V_L антитела к НТТ и/или антитела, соответствующего приведенным в табл. VIII.

При этом для специалиста в данной области техники будет очевидно, что полинуклеотиды, кодирующие по меньшей мере вариабельный домен легкой и/или тяжелой цепи могут кодировать вариабельный домен обеих цепей иммуноглобулина или только одной цепи. Согласно одному варианту реализа-

ции, соответственно, указанный полинуклеотид содержит, состоит по существу или состоит из нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность полинуклеотидов области V_H и V_L антитела к НТТ и/или его фрагментам согласно данным, приведенным в табл. II, III, IV, V, VI, VII или VIII.

Таблица II. Последовательности нуклеотидов области V_H и V_L антител, распознающих эпитоп полипролиновой области НТТ, т.е. агрегированной формы белка, кодированного экзоном 1

Антитело	Последовательности нуклеотидов варибельной области тяжелой (V _H) и варибельной области легкой (V _L) цепей
NI-302.33C11- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTTGTCCAGCCTGG GAACTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCAAGGTTCAAGT GACTTTGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGAAGT GAGTGGCTGGCACTTATATGGTATGATGGAGGGTATAAGTACTATG CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAATACGATGTTTCTACAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCTGTTTATTACTGTGCGACCCACCTAGAAATATTGCAGTAGAACCAC CTGCTATCTCGGCCACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTC CTCG SEQ ID NO: 1
NI-302.33C11- V _K	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCGTCCTTCTATCTGCGTCTGTGG GAGACACAGTCACCTTCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCG ATTATTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGATTGCCCTAAGCT CCTGATCTATGCTGCGTCCACTTTGCAAACCGGGGTCCCATCAAGG TTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCCGCA GCCTGCAGTCTGAAGATTTTGGAACTTATTACTGTACGACAGCTTAAA ACTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAATCAAA SEQ ID NO: 3
NI-302.74C11- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGACTGAGGTGCAGAAGCCTGGG GCCTCAGTAAAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACAGTTTCACCG GCTACTTTTGGCACTGGGTACGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGA GTGGATGGGGTGGATCAACCCTAACAGTGGTGACACAACTATGCA GAGAAGTTTCGGGGCAGAATCATCATGACCAGGGACACGTCTGTCA GCACAGCCACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGATTTGACGACACGG CCCTATATTACTGTACGAGAGAGGCCCTGACCCGGGCGCTGAGA CGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 25
NI-302.74C11- V _L	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAAGTGTCCCCAGGA CAGACGGCCAGGATCACCTGCTCTGGAGATGCAGTGCCAAAGCAG TATATTTATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTATTCTGG TGATATATAAAGACACTCAGAGGCTTCAGGGATCCCTGAGCGATT CTCTGGCTCCAACCTCAGGGACAACAGTCACGTTGACCATAACTGGC

	GTCCAGGCAGACGACGAGGGTGA CTATTACTGTCAATCAGCAGACA GTAGTGCTACTTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAATTGACCGTCCT A SEQ ID NO: 27
NI-302.15F9- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCACGCCGGG GGGGTCCCTGAGACTCTCGTGTGAGGCCTCTGGATTCTCTTCAAG AATTCTAGCATGAAC TGGGTCCGTCAGACTCCGGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTCTCGTCCATTGACACTTCTGCTACAAATTATAAGTATTA TGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTTACCATCTCCAGGGATGACGCC ACCAACTCTCTCTATCTGCAAATGAATAGCCTGCGAGCCGACGACA CGGCTACTTATTACTGTGCGCGAGGTTATTATACCCCCGGGACTT TGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 29
NI-302.15F9- V _K	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACAGACCCTGTCCGTCAGCCTTG GACAGGCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTGAGTCAAAGCCTCTTTGTA TCGTGATAACAACACATACTTGAATTGGTTTACCAGAGGCCAGGC CAATCTCCAAGGCGCCTCATTTATAGGGCTTCTGACCGGGACTCTG GGGTCCCAGACAGATTGAGCGGCGGTGGGTGAGGCACTGATTTC CATTGAAAATCAGTGGAGTGGAGGCTGAAGATGTTGGCACTTATTA CTGCATGCAAGGAACACACTGGCCTCGGACGTTCCGCCAAGGGAC CAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 31
NI-302.39G12- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCACCCTTGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGAGCGTCTCTA ATTACGCCATAACTTGGGTCCGCCGGGCTCCAGGGAAGGGGCTGC AATATATTTTCAGTAATTTATCGTGATGGCAGGACATACTACGGAGG TCCGTGAGGGGCGCCTTACCATCTCTAGGGACGATTCCAAGAACA CTCTCTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGATTTGAGGACACGGCTGT GTATTACTGTGCGAGAGCGCACGGCCAATATTACTATGGTGTGGAC GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 33
NI-302.39G12- V _K	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGTCCGTCAGCCCTG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCTCTACA TAGTAATGGATACAAC TATTTGATTGGTACCGGCAGAAACAGGG CAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGAGTTCTAATCGGCCCTCCG GGGTCCCTGATAGGTTCA GTGCCAGTGGATCAGGCACAGAGTTCA CACTGCAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTA CTGCATGCAATCTCTGCAAACGTTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAA GTGGATATCAAA SEQ ID NO: 35
NI-302.11A4- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCGGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGTTCCCCGTCAG TAGCAGTTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAGAGGGGCT GGAGTGGGTCTCAGTTCTTTATAGAGACGGTGACACATACTACGCA GACTCCGTGCAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTTCCAGA ACACGTTCTATCTTCAAATGAACAGCCTGAAAGCCGAGGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGGGTGATAGAAGGTCGTACACTACTATTAC GGTATGGACGCTCTGGGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 37
NI-302.11A4- V _K	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAG GAGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCA GCAGCTACTTCGCCTGGTACCAACAAAAACCTGGCCAGGCTCCCAG GCTCCTCATCTATGGTACGTCCCGCAGGGCCACTGCCATCCCAGAC AGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCA GCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCA GTGTATTACTGTCAACAGTAT GGTAGCTCGTGGACGTTCCGGCCAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

	SEQ ID NO: 39
NI-302.22H9- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCACCCCTTGG GGGTCCCTGAGAGTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACGCGTCTCTA ATTACGCCATAACTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AATATATTTTCAGTGATTTATCGTGATGGCAGGACATACTACGGAGAC TCCGTGAGGGGGCCGCTTCACCATCTCTAGGGACGATTCCAAGAACA CTATCTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGATTTGAGGACACGGCTGT GTATTACTGTGCGAGAGCGCACGGCCAATATTATTATGGTGTGGAC GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG
	SEQ ID NO 41:
NI-302.22H9- V _K	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGTCCGTGAGCCCTG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTACA TAGTAATGGATACAACATATTTGGATTGGTACCGGCAGAAACCAGGG CAGTCTCCACAACCTCCTGATCTATTTGAATTCTAATCGGGCCTCCGG GGTCCCTGATAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGAGTTCACA CTGACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACT GCATGCAATCTCTGCAAACGTTCACTTTGCGCGGAGGGACCAAGGT GGAGATCAAA
	SEQ ID NO: 43
NI-302.44D7- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGC AGCTATGCCATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTCTCAGGTATTGGTTATAGTGATACTAGCACATATTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGCTTACCGTCTCCAGAGACATTTCCAAG AACACGCTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACG GCCGTATATTACTGCGCGAAAGGTACCAGGGACTATTACGGTATGG ACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG
	SEQ ID NO: 45
NI-302.44D7- V _K	CAGACTGTGGTGACTCAGGAGCCATCGTTCTCAGTGTCCCTGGAG GGACAGTCACACTCACTTGTGGCTTGAGTTCTGGCTCAGTTTCTACT AGTTACTACCCAGCTGGTACCAGCAGACCCAGGCCGGGCTCCA CGCACGCTCATCTACAGCACAAACACTCGCTCTTCTGGGGTCCCTG ATCGCTTCTCTGGCTCCATCCTTGGGAACAAGGCTGCCCTCACCAT CACGGGGGGCCAGGCAGATGATGAATCTGATTATTACTGTGTGCTG TTTATGGGTAGTGGCATTGGGGGTGTTGCGCGGAGGGACCAGGCTG ACCGTCCTA
	SEQ ID NO: 47
NI-302.37C12- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCTTGTGTTGCCTCTGCACTCACCGTCACTA ACAGCCAAATGACCTGGGTCCGCCGGGCTCCAGGGAGGGGGTTG GAGTGGGTCTCAGTTATTTACACCAGTGGTAGTGCATACTACGCAG ACTCCGTGAAGGGCAGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAA CACAGTGTCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAAGACACGGCT GTGTATTACTGTGCGAAAGGCCCATCAGCCTATTATTACGGTTTGGA CCTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG
	SEQ ID NO: 49
NI-302.37C12- V _K	GATATTGTGATGACTCAATCACCCTCTCCCTGCCCGTCACCCCTG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGC ATAGTAATGGATACAACATATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCGGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTACTCGGGCCTCC GGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTA CACTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTA CTGCATGCAAGGTCTACAGACGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAG CTGGAGATCAAA
	SEQ ID NO: 51

NI-302.55D8- V _H	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGTCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG GCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCG ACTACTATATACACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGA GTGGATGGGACGGATCAACCCTAACAATGGTGGCACAACTATGCA CAGAACTTTCAGGGCTGGGTACCATGACCAGGGACACGTCCATCA GCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGACTGAGATCTGACGACACGG CCGTCTATTACTGTGCGAGAGTGGGGGGCGAGCTGCTACGAGAAG GCGGCTATCACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 53
NI-302.55D8- V _L	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGG CAGAGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGAACAGCTCCAACATCGGG GCAGGTTATGATGTACACTGGTACCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCC CCAACTCCTCATCTTTGATAATACCAATCGGCCCTCAGGGGTCCC TGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCC ATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTAATTATCACTGCCAGT CCTATGACAACAGCCTGAGTGGTTCTTGGGTGTTGCGCGGAGGGA CCAAGCTGACCGTCCTA SEQ ID NO: 55
NI-302.7A8- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTCCAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCAATTTAGA AACAGTTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGATCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCCAACATAAAGGAAGATGGAAGTCGGACATACTATG TGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAA GAACTCACTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCTGTATATTACTGTGCGAGAGGAGATTATAATTGCGGCATCTATT ACTTTCCCGGGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCT CCTCG SEQ ID NO: 57
NI-302.7A8- V _K	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTACCCCTTG GACAGCCGGCCTCCATCTCCTGTAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATA CAGTGATGGAACACCTACTTGAATTGGTTTCAGCAGAGGCCAGGC CAGTCTCCAAGGCGCCTCATTTATAAGGTTTCTAACCGGGACTCTG GGGTCCCAGACAGATTACAGCGGCAGTGGGTCAAGCACTGATTTCA CACTGAGAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGCATTATTA CTGCATGCAAGGTACACACTGGCCTGGGACGTTGCGCCAAGGGAC CAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 59
NI-302.78H12- V _H	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACTGTCTTGTCTCTAGTTACTCCATCAGCAA TGTTACTACTGGGGCTGGATTGCGCAGCCCCAGGGAAGGGGCT GGAGTGGATTGGGAGTATCTATCATAATGGGAACACCTATTACAAC CCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCATCATTTAGTAGACACGTCCAAGA ACCAGTTCTCCCTGAAGTTGAGGTCTGTGACCGCCGACAGACCGG CCGTGTACTACTGTGCGATGCCAAGTGCCACCTATTATTATGGTTT GGGGACTCAATTCCATGCGTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACCAC GGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 61
NI-302.78H12- V _L	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTCCTGGA CAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGAGATGTTGGTA ATTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCGAAGTCCC CAAACCTATAATTTATGATGTCACTGAGCGGCCCTCAGGGGTCCCT GATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCGCTGACCA TCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGCTGCTC ATATGCTGGCAGTTACACCTTCGAGGTATTTGGCGGAGGGACCAAG CTGACCGTCCTA

	SEQ ID NO: 63
NI-302.71F6- V _H	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTATTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCCTCACGTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTCAGT GGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGATAGGGGAAGTCAATCATAGTGGAGGCCACCAACCTCAATT CGTCCCTCAAGAGTCGAGTCATCATTTTCAGTAGACAAGTCCAAGAA GCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGC TATGTACTTCTGTGCGAGAGGATACAGCTATGACCCAAAATACTACT TTGACTCCTGGAGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 65
NI-302.71F6- V _L	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGAC AGGCATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGTAGTGATATTGGGAG TTATGATTTTGTCTCCTGGTACCAGCAGGACCCAGGCAAAGCCCC AAAGTCATTATTTATGGGGTCAATAAGCGGCCCTCAGGGGTTTCTAA TCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACAATC TCTGGACTCCAGGCTGACGACGAGGCTGATTATTACTGTCTCAT ATGCTGGTAGTACCACCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAACCTGA CCGTCTA SEQ ID NO: 67
NI-302.11H6- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGTGATGAAGAAGCCTGGA GACTCAGTGAGGGTCTCCTGCAGGGCTTCTACTTACAGCTTTTCCA CCTATAGTTTCACCTGGGTGCGACAGGTCCCTGGACAAGGCCTTGA GTGGATGGGATGGATCAGCGCTTATAATGGTCACACAAACTATGTA GACAGCTTCCAGGGCAGACTCAGCTTGACACAGACACATCCGCG AGTACAGCGTACATGGAACGAGGAGCCTCAGATCTGACGACACG GCCATCTATTATTGTGCGGCTGTAGACACCACTTACTACTATTACGG CATGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 69
NI-302.11H6- V _L	CAGACTGTGGTGACTCAGGAGCCAACGTTCTCAGTGTCCCTGGA GGGACAGTCACACTCACTTGTGCCTTGAGGTTTGGCTCAGTCTCTA GTAGCTACTATCCAGCTGGTTCAGCAGACCCAGGCCAGGCTC CACGCACGCTCATCTACAGCACAAACACCCGCTCTTCGGGGGTCC CTGCTCGATTCTCTGGCTCCATTCTTGGGAACAAAGCTGCCCTCAC CATCGCGGGGGCCAGGCAAATGATGAGGCTGACTATTACTGTGT GCTGTATATGGGTAGTGGAATCGGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAA GTTGACCGTCCTA SEQ ID NO: 71
NI-302.3D8- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCTTGTAAGCCTCCGGATTCTTTTAAA ACCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGCTTCCCGGGAGGGGGCTG GAATGGGTCTCAGCTATAAGTGCCACTGGTGGGAAGCACCTTCTACG CAGAGTCCGTGAAGGGCCGGCTCACCATTTCAGAGACACTGCCA AGAATACAGTGTATCTGCAATGAACAACCTGAGAGCCGAAGACAC GGCCATGTATTACTGTGCGAAAGGGTCGACTGCGGTATATCTCTT GACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 73
NI-302.3D8- V _K	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCGTCTCACTGTCTGCATCTGTAG GGGACAGAGTCACCCTCACTTGTGCGGGCAGTCAGGACATCAGAA ATTTCTTGGCCTGGATTACAGCAGAAGCCAGGGAACCCCTAAGTC CCTGATCTATGCTGCGTCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAGCA TTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCA GCCTGCACCCGAAGATTTTGCTACTTATTACTGCCAGCAGTTTTAT AATTACCCTCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 75
NI-302.18A1- V _H	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTAGTGAAGCCTTCG GAGGCCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCACTA

	CTGATTATTACTATTGGGGCTGGATCCGCCAGTCCCCAGGCAAGGG ACTAGAGTGGGTGGGACAATATACTTTGGTGGGGCCACCTACTAC AATCCGTCCCTCAGGAACCGGGTCTCGATATCTGTGGACACGTCCA ACACTCGCCTCTCCCTGAGACTTATCTCTTGAGCGCCGCTGACAC GGCCGTCTATTATTGTGCGAGAGTGGGCTACTTGGATAGGAGTGGT CTTCTTGTGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 77
NI-302.18A1- V _K	GAAATTGTGCTGACGCAGTCTCCACTCTCCGTGCCCCGTACCCCCG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGC ATAATAATGGATACAACCTATTGGATTGGTACCTGAAGAAGCCTGGG CAGTCTCCACAACCTCCTGATCTATTGGGCTCTACTCGGGCCTCCG GGGTCCCTGACAGGTTCAAGTCCAGTGGATCAGGCACAGACTTTAC ACTGGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGTTGGCGTTTACTAC TGCATGCAAGCTCTGCAGACTCCTCCGACTTTCGGCAGAGGGACCA AGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 79
NI-302.52C9- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAACCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGGCTCTGGATTACCCGTCAAGT ACACCTACATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGGTATTGATGCCGGTGGTGAACATATTACGCAGA CTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACCTCCAAGAAC ACGCTGTATCTTCAAATGAATAGGCTGACACCTGAGGACACGGCTG TCTTTTATTGTGCGAGACACTACTACGTAATGACGACGACACTGAT TATTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 85
NI-302.52C9- V _K	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGC ATAGTAATGGATACAACCTATTGGATTGGTACGTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTATTGGGTTCTACTCGGGCCTCC GGGGTCCCTGACAGATTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTA CACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTA CTGCTTACAAGCTCAACAAATTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACC AAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 87
NI-302.46C9- V _H	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTAAAGCCTTCA CAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTTTCTGGTGCCTCCGTAGCA GTGGTGCCTACTACTGGAGTTGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGC GACTGGAGTGGATTGGGCGTGTCTATCCCACTTGGAGCACCAACTA CAACCCCTCCCTCGAGAGTCCAGTCAACCATATCGTTAGACACGTCC AACAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGACCTCTTTGACTGCCGAGACA CGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGAGGCTCCTGGTGAACGATGC TGCGCCCTTAGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTC CTCG SEQ ID NO: 89
NI-302.46C9- V _K	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTG GAGACAGAGTCAACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTACATTAGCCA CTATTTAAATTGGTATCGGCAGAAACCAGGGAAGCCCTCAGCTC GTAATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGAGGTCCCATCAAGGTT CAGTGGGAGTGGATCTGGGCCAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGT CTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGAGTTACAC TACCCCTCGAACTTTTGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 91

Таблица III. Последовательности нуклеотидов области V_H и V_L антител, распознающих эпитоп богатой пролином области НТТ, т.е. агрегированной формы белка, кодированного экзоном 1

Антитело	Последовательности нуклеотидов варибельной области тяжелой (V _H) и варибельной области легкой (V _L) цепей
NI-302.63F3- V _H	CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGCGTTCAAGAAGCCTGGG ACCTCAGTGAAAGTTTCCTGCAAGGCCCTCTGGATACACCTTCGAGA CCCGTTCTATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG AATACATGGGATGGATCAACACCAACACTGGCAACCGCACGTATGT CCAGGCCCTTCAGAGGACGATTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTC AGCACGGGCATATCTGCAGATCAGCAACTTAAAGACTGAGGACACTG CCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGCAGGTGGGGGATATTGGTTCCG ACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 5
NI-302.63F3- V _K	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTCTCTGG GCGAGAGGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAATCAGAGTCTTTTCTA CAGTTCCAACAATAACAATACTTAGCTTGGTACCAGCACAAATCCG GACAGCCTCCTAAGCTGCTCGTTTACTGGGGATCTACCCGGGAATC CGGGGTCCCTGACCGCTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACTGACTT CACTCTCACCATCAGTAGCCTGCAGGCTGAGGATGTTGCAATTTATT ACTGTCAACCAATATTATCATAATCCGTACACTTTTGCCAGGGGACC AAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 7
NI-302.31F11- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGAGTCCGGAGGAGGCTTGATCCAGCCGGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGTTCACCGTCAG CAGCACCTACATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT TGAGTGCCTCTCAGTTATTTTAGTGGCGCTGACACATATTACGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAATTCGAAGAA CACACTGTTTCTTCAGATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCC ACATATTACTGTGTGAGACATTATTATGGTTTCAGACCTTCCATCTGA CTTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 13
NI-302.31F11- V _K	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCGCCCCCTG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTATA CAGTAATGGATACAACATTTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGG AAGCCTCCACAGCTCCTGGTCTATTTGGGTCTGATCGGGCCTCCG GGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCAAGATTTTAC ACTGAACATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTAC TGCATGCAAGGTCTACAAAGTCCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACC AAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 15
NI-302.2A2- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGT ACCTATTGGATGAAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCCAACATAAAACAGATGGAAGTGACAAATACTATG TGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAA GAACTCACTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACG GCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGACGGCAGTGGCTGGAACGTC TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 17
NI-302.2A2- V _K	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGG GCGAGAGGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTCTTTTATA CACCTCCAAAAATAAGGACAGTAAGAACTACTTAGGTTGGTACCAG CAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTA CCCGGGAATCCGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTG GGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAGGATGT

	GGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATTATACTACTCCTCAGTTCCGGCG GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 19
NI-302.15D3- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTTACGCTGGG GGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTA GCTACTGGATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGTCTGG TGTGGGTCTCACGTATTAGTAATGATGGCAGTAGCAAAACCTACGC GGAATCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAA AAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACAG GCTGTGTATTACTGTGCAATACTTGGCGGATATTGTAGTAGTACCAG TTGTCGTCCCTTTGACAACCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTC TCCTCG SEQ ID NO: 135
NI-302.15D3- V _L	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGAC AGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACAGCAGTGACGTTGGTGT TTATACTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCC AAACTCATGATTTTTGTATGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGATTCTAA TCGTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACAGGCCCTCCCTGACCATC TCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCACTCAT ATACAAGCAGCGACACTTGGGTGTTCTGGCGGAGGGACCAAGCTGA CCATCCTA SEQ ID NO: 137
NI-302.64E5- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGG GGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCGAC CAGGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGGAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCCGGATTAAACGAAAAGTGAAGGTTGAAGCAAC AGACTACGCAGCGCCCGTGAGAGGCAGATTACCATCTCAAGAGAT GATTCAGAAGACACGGTGTCTGCAAAATGAACAGCCTGAAAACCG AGGACACAGCCCTGTATTACTGTACGTCAACGGGAGTCTTAGCAGC AGCTGTGATGTCTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTC CTCG SEQ ID NO: 164
NI-302.64E5- V _K	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGG GCGAGAGGGCCACCATGACCTGCAAGTCCAGCCAGAGCTTTTCTA CAGTTACAACAATGAGAACTACTTAGCCTGGTATCAGCAGAGACCA GGACAGCCTCCTAAGTTGCTCAATTACTGGGCATCTACCCGGGAAT CCGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATT TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTA TTACTGTACGAATATTATAGTACTCCTCAGACGTTCCGGCCAGGGA CCAAAGTGGATATCAAA SEQ ID NO: 168

Таблица IV. Последовательности нуклеотидов области V_H и V_L антител, распознающих эпитоп С-концевой области НТТ, т.е. агрегированной формы белка, кодированного экзоном 1

Антитело	Последовательности нуклеотидов варибельной области тяжелой (V _H) и варибельной области легкой (V _L) цепей
NI-302.35C1-V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAACTTGGTACAGCCGGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACTGCCTCTGGATTACCTTTAGT ATAACGGGCCCTGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGAAAAGGGGCCG CAGTGGGTCTCAGCAATCACTGGAAATGCTTATGGGACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATTTCCAGAGACAACGCCAA GAACACACTGTACTTGCAAAATGAACGGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCATCTATTACTGTGTGAAAGGAATTGCCTCCGATAGTAGTGGT TATTCTGCCTTCTGGGGCCCGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 9
NI-302.35C1-V _K	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAAGGGCCAGTCAAAGTGTGACA ACCAGTTTGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT CCTCATTATGATGCATCCAGGAGGGGCCCTGGCATCCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTAGCA GCCTAGAGCCTGAAGATTTGCAATTTATTACTGTACGATCGTTAC ACCTGGCTCTACACTTTTGGCCAGGGGACAGACTGGAGATTA SEQ ID NO: 11
NI-302.72F10- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCTTCGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACTTCGGC AGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTG GAGTGGGTGTGAGATATCAGTGGTATTGGTAGTAACACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTACCATTTCCAGAGACAATTCCGA CAATACGTTGTACCTGGACATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCAGATATTACTGTGCGAAGGATCGAAAGCGCAGTGGCTGGTA CGAACAGTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 176
NI-302.72F10- V _K	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTCGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACTTCGGC AGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTG GAGTGGGTGTGAGATATCAGTGGTATTGGTAGTAACACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTACCATTTCCAGAGACAATTCCGA CAATACGTTGTACCTGGACATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCAGATATTACTGTGCGAAGGATCGAAAGCGCAGTGGCTGGTA CGAACAGTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 178

Таблица V. Последовательности нуклеотидов области V_H и V_L антител, распознающих виды НТТ, и/или их фрагменты

Антитело	Последовательности нуклеотидов вариабельной области тяжелой (V _H) и вариабельной области легкой (V _L) цепей
NI-302.6N9- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTGGTGCAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGTCTCTGGATTACCTTTAGT AGTTATGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GCCTGGGTCTCAACAATTAGTGTACTGGTGGTAGTACATTCTACA CAGACTCCGTGAGGGGCCGGTTCACCATCTCCGAGACAATTCCAA GAACACACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAACCGACGACACG GCCATATATTATTGTGTGAAAGATCTATTTGGAGTGGACACCTCCTA CTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC CTCG SEQ ID NO: 21
NI-302.6N9- V _K	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGCCAGTCAGAGTGTGAGCG GCAGGTATGTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCTTCTATGCTGCATCCAACAGGGCCATTGGCATCCCAGA CAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATC AGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACT ATGGTGCCTCATCGTACACTTTTGGCCCGGGGACCAAAGTGGATAT CAAA SEQ ID NO: 23
NI-302.8F1- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCGGG GGGGTCCCTTACAATCTCCTGTGCAGCCTCTGGTTTCACCTTCAGT AATGCCTGGATGAACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGTAAGGGGCTG GAGTGGGTCCGCCATATTAGAACGCAAGCTGAAGGAGGGACATCA

	GACTATGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGATG ACTCAAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAAACCGA GGACACAGCCGTATATTATTGTATCCCCCCCCCTACTACTACTATT ACGGTCTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCCT CG SEQ ID NO: 81
NI-302.8F1- V _L	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGAC AGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAGCCAGCAGTGATGTTGGGAC TTATGACCTTGTCTCCTGGTACCAACAACATCCAGGCAAAGCCCCC AAACTCATTATTTATGAGGTCAATAAGCGGCCCTCAGGGTTTTCTTA TCGCTTCTCTGCCTCCAAGTCTGCCAACACGGCCTCCCTGACAATA TCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGAATATTACTGCTGCTCAT ATGCAGGTTATAGCACGGTATTCTGGCGGAGGGACCAAGCTGACCG TCCTA SEQ ID NO: 83
NI-302.4A6- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGC GCTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTG GAGTGGGTCTCAACTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGTACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCTCCATCTCCAGAGACAACCTCAA AAACACCCGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGCACG GCCGTATATTTCTGTGCGAAAGTTACCACGGAACCTCTACGGTGCTA ACTCCTACTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGT CACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 184
NI-302.4A6- V _K	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAAGGGCCAGTCAGAGTGTTGTCA GCAGGTATTTAGCCTGGTACCAGCAAAACCTGGCCAGGCTCCCGAG GCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCGACAG AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCA GCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAGCTGTAT GGTAACTCACAGACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGAGATCAAA SEQ ID NO: 186
NI-302.12H2- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTTTCTGTGAAGCCTCTGGATTACCTTTAGC AACTATGCCATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTG GAGTGGGTCTCAGTAATTAGTGGTACTGGTGGTAGCACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAT GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCCGAGAGCCGACGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATCTGAGGAAGATTAGCGGTCTCT TTATACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA CCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 188
NI-302.12H2- V _K	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTTTCTGTGAAGCCTCTGGATTACCTTTAGC AACTATGCCATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTCTCAGTAATTAGTGGTACTGGTGGTAGCACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAT GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCCGAGAGCCGACGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATCTGAGGAAGATTAGCGGTCTCT TTATACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA CCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 192
NI-302.8M1- V _H	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG GCCTCAGTGAAAGTTTCTGCAAGGCATCCGGATACACCTTCACCA TCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGA SEQ ID NO: 194
	GTGGATGGGAGGAATCAGCCCGAGTGGTGCCACACAATGTACGC ACAGAATTTCCAGGGCAGAGTCACCGTGACCAGGGACACGTCCAC GAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACAC GGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGAGCACGGTGACTAACTATCG ACCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC G SEQ ID NO: 194
NI-302.8M1- V _K	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACTATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAGCAA TTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGTTCTAAACTCC TGATCTTTGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCGTCTCGGTT CGGTGGCAGTGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC CTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAACTATAACAG TGCCCTCCGCCCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGATATCAAA SEQ ID NO: 198

Таблица VI. Последовательности нуклеотидов области V_H и V_L антител, распознающих эпитоп N-концевой области НТТ, т.е. агрегированной формы белка, кодированного экзоном 1

Антитело	Последовательности нуклеотидов вариательной области тяжелой (V _H) и вариательной области легкой (V _L) цепей
NI-302.15E8- V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGATACAGCCGGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTACCGTCAGT AGTTATAGCATGAACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTCTCATACACTAGTAGTAGCAGAAGTAATACCAAAAAGT ACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCTAGAGACAATGC CAGGAACCTACTCTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCAGGGGACTTCGGGGAGTTA CTCACTGGTGAGGGGTATTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 131
NI-302.15E8- V _L	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCTGTCCCCAGGAC AGACAGCCACCATCACCTGCTCGGGAGATGAATTGGGGGATAAATA TGTTGGTTGGTATCAACAGAAGCCAGGCCAGTCCCTCTGCTGGTC ATCTATCAAGATGCGAAGCGGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCT CTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGGGGGA CCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTACTACTGTCAGGCGTGGGACA GCGGCACGATGGTTTCGGCGGAGGGACCAGGCTGACCGTCTCTA SEQ ID NO: 133

Таблица VII. Последовательности нуклеотидов области V_H и V_L антител, распознающих эпитоп богатой Q/P области НТТ, т.е. агрегированной формы белка, кодированного экзоном 1

Антитело	Последовательности нуклеотидов вариательной области тяжелой (V _H) и вариательной области легкой (V _L) цепей
NI-302.7D8- V _H	CAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGATCTGAGTTGAAGAAGCCTGGG GCCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCTTCTGGATACAACCTCAATAA CTATGCCATCAATTGGTTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAG TGGATGGGATGGATCAACACCATCACTGGGCACCCAACGATGCCC AGGGCTTCAAAGGACGATTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAG SEQ ID NO: 172
NI-302.7D8- V _L	CACGGCATATCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGCCTGAGGACACTGCC GTCTATTACTGTGCGAGAACTTACAGTAACTACGGCGAATTTGACTA CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 174

Ввиду используемой стратегии клонирования последовательность аминокислот на N-конце и C-конце тяжелых и легких цепей может потенциально включать индуцированные праймерами изменения в областях FR1 и FR4, по существу не влияющие, однако, на биологическую активность антитела. Для получения консенсусного антитела человека последовательности нуклеотидов и аминокислот исходного клона могут быть выравнены и перестроены в соответствии с соответствующими последовательностями вариательных областей зародышевой линии человека из базы данных; см., например, Vbase2, согласно описанию выше. Последовательности аминокислот антител человека выделены жирным шрифтом в тех случаях, когда считается, что N- и C-конец аминокислот могут потенциально отличаться от консенсусной последовательности зародышевой линии в результате действия ПЦР-праймера и, соответственно, заменены с применением коррекции праймер-индуцированных мутаций (PIMC), см. табл. VI. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанный полинуклеотид содержит, состоит по существу или состоит из нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность полинуклеотидов области V_H и V_L антитела к НТТ и/или его фрагментам, согласно данным, приведенным в табл. VI.

Таблица VIII. Последовательности нуклеотидов области V_H и V_L антител распознающее виды НТТ, и/или их фрагменты; выделены (жирным шрифтом) замены, полученные с применением PIMC

Альтернативные варианты областей антител, полученные с применением PIMC	Последовательности нуклеотидов вариательной области тяжелой (V _H) и вариательной области легкой (V _L) цепей
NI-302.33C11-PIMC V _H	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTTGTCCAGCCTGG GAACTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTGAGGTTGAGT GACTTTGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGACTG GAGTGGCTGGCACTTATATGGTATGATGGAGGGTATAAGTACTATG CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAATACGATGTTTCTACAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCTGTTTATTACTGTGCGACCCACCTAGAATATTGCAGTAGAACCCAC
	CTGCTATCTCGGCCACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTC CTCG SEQ ID NO: 97
NI-302.33C11-PIMC V _K	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCGTCCTTCCTATCTGCGTCTGTGG GAGACACAGTCACCTTCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCG ATTATTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGATTGCCCTAAGCT CCTGATCTATGCTGCGTCCACTTTGCAAACCGGGTCCCATCAAGG TTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTCACAATCCGCA GCCTGCAGTCTGAAGATTTTGGAACTTATTACTGTCAGCAGCTTAA ACTTACCCGTACACTTTTGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 99
NI-302.63F3-PIMC V _K	GATATTGTGATGACTCAATCACCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGG GCGAGAGGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAATCAGAGTCTTTTCTA CAGTTCCAACAATAACAACACTACTTAGCTTGGTACCAGCACAAATCCG GACAGCCTCCTAAGCTGCTCGTTTACTGGGGATCTACCCGGGAATC CGGGGTCCCTGACCGCTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACTGACTT CACTCTCACCATCAGTAGCCTGCAGGCTGAGGATGTTGCAATTTATT ACTGTCACCAATATTATCATAATCCGTACACTTTTGCCAGGGGACC AAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 101
NI-302.63F3-PIMC-NS V _K	GATATTGTGATGACTCAATCACCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGG GCGAGAGGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCCTCAGAGTCTTTTCTA CAGTTCCAACAATAACAACACTACTTAGCTTGGTACCAGCACAAATCCG GACAGCCTCCTAAGCTGCTCGTTTACTGGGGATCTACCCGGGAATC CGGGGTCCCTGACCGCTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACTGACTT CACTCTCACCATCAGTAGCCTGCAGGCTGAGGATGTTGCAATTTATT ACTGTCACCAATATTATCATAATCCGTACACTTTTGCCAGGGGACC AAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 103
NI-302.63F3-PIMC-SG V _K	GATATTGTGATGACTCAATCACCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGG GCGAGAGGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAATCAGGGCCTTTTCTA CAGTTCCAACAATAACAACACTACTTAGCTTGGTACCAGCACAAATCCG GACAGCCTCCTAAGCTGCTCGTTTACTGGGGATCTACCCGGGAATC CGGGGTCCCTGACCGCTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACTGACTT CACTCTCACCATCAGTAGCCTGCAGGCTGAGGATGTTGCAATTTATT ACTGTCACCAATATTATCATAATCCGTACACTTTTGCCAGGGGACC AAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 105
NI-302.63F3-PIMC-NQ V _K	GATATTGTGATGACTCAATCACCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGG GCGAGAGGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCCAACAGAGTCTTTTCTA CAGTTCCAACAATAACAACACTACTTAGCTTGGTACCAGCACAAATCCG GACAGCCTCCTAAGCTGCTCGTTTACTGGGGATCTACCCGGGAATC CGGGGTCCCTGACCGCTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACTGACTT CACTCTCACCATCAGTAGCCTGCAGGCTGAGGATGTTGCAATTTATT ACTGTCACCAATATTATCATAATCCGTACACTTTTGCCAGGGGACC AAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 107
NI-302.35C1-PIMC V _K	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAAGTGTGACA ACCAGTTTGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT CCTCATTTATGATGCATCCAGGAGGGCCCTGGCATCCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTAGCA GCCTAGAGCCTGAAGATTTGCAATTTATTACTGTCAGCATCGTTAC ACCTGGCTCTACACTTTTGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 109

NI-302.31F11- PIMC V _K	GATATTGTGATGACTCAATCACC ACTCTCCCTGCCCCGTGCCCCCTG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTATA CAGTAATGGATACAACATATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGG AAGCCTCCACAGCTCCTGGTCTATTTGGGTTCTGATCGGGCCTCCG GGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCAAGATTTTAC ACTGAACATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTAC TGCATGCAAGGTCTACAAAGTCCGTGGACGTTTCGGCCAA GGGACC AAGGTGGAATCAAA SEQ ID NO: 111
NI-302.2A2-PIMC V _K	GATATTGTGATGACTCAATCACC AGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGG GCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTCTTTTATA CACCTCCAAAAATAAGGACAGTAAGAACTACTTAGGTTGGTACCAG CAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGTCTATTTACTGGGCATCTA CCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAGGATGT GGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATTATACTACTCCTCAGTTCGGCG GAGGG ACCAAGGTGGAATCAAA SEQ ID NO: 113
NI-302.74C11- PIMC V _H	CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGG ACTGAGGTGCAGAAGCCTGG GGCCTCAGTAAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACAGTTTCACC GGCTACTTTTTGCACTGGGTACGACAGGCCCTTGACAAGGGCTT GAGTGGATGGGGTGGATCAACCCTAACAGTGGTGACACAAACTATG CAGAGAAGTTTCGGGGCAGAATCATCATGACCAGGGACACGTCTGT CAGCACAGCCCACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGATTTGACGACAC GGCCTTATATTACTGTACGAGAGAGGCCCTGACCCGGGCGCTGA GACGGACGTCTGGGGCCA AGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 115
NI-302.74C11- PIMC V _L	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACC CTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGA CAGACGGCCAGGATCACCTGCTCTGGAGATGCAGTGCCAAAGCAG TATATTTATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTATTCTGG TGATATATAAAGACACTCAGAGGCCCTTCAGGGATCCCTGAGCGATT CTCTGGCTCCAACCTCAGGGACAACAGTCACGTTGACCATAACTGGC GTCCAGGCAGACGACGAGGGTGACTATTACTGTCAATCAGCAGACA GTAGTGCTACTTGGGTGTTCCGGCGAGGGACCAATTGACCGTCTCT A SEQ ID NO: 117
NI-302.39G12- PIMC V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG GGAGGCTTGGTCCACCCTTG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTTCAGCGTCTCT AATTACGCCATAACTTGGGTCCGCCGGGCTCCAGGGAAGGGGCTG CAATATATTTTCAGTAATTTATCGTGATGGCAGGACATACTACGGAGA CTCCGTGAGGGGGCCGCTTCACCATCTCTAGGGACGATTCCAAGAAC ACTCTCTATCTTCAATGAACAGCCTGAGATTTGAGGACACGGCTGT GTATTACTGTGCGAGAGCGCACGGCCAATATTACTATGGGTGGAC GTCTGGGGCCA AGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 119
NI-302.39G12- PIMC V _K	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCA CTCTCCCTGTCCGTGAGCCCT GGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTA CATAGTAATGGATACAACATATTTGGATTGGTACCGGCAGAAACCAG GGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGAGTTCTAATCGGCCCTC CGGGGTCCCTGATAGGTTTCAGTGCCAGTGGATCAGGCACAGAGTT CACACTGCAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTAT TACTGCATGCAATCTCTGCAAACGTTCACTTTCCGGCGGAG GGGACCA AGGTGGAATCAAA SEQ ID NO: 121
NI-302.11A4-PIMC V _K	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCA GGCACCCTGTCTTTGTCTCCAG GAGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCA

	GCAGCTACTTCGCCTGGTACCAACAAAAACCTGGCCAGGCTCCAG GCTCCTCATCTATGGTACGTCCCGCAGGGCCACTGCCATCCCAGAC AGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCA GCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTAT GGTAGCTCGTGGACGTTTCGGCCCAGGGACCAAGGTGGAATCAA A SEQ ID NO: 123
NI-302.22H9-PIMC V _k	GATATTGTGATGACTCAATCACCAGCTCTCCCTGTCCGTACGCCCTG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCCTACA TAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGGTACCGGCAGAAACCAGGG CAGTCTCCCAACTCCTGATCTATTGAATTCTAATCGGGCCTCCGG GGTCCCTGATAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGAGTTTACA CTGACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACT GCATGCAATCTCTGCAAACGTTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGG TGGAATCAAA SEQ ID NO: 125
NI-302.44D7-PIMC V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGC AGCTATGCCATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTCTCAGGTATTGGTTATAGTGATACTAGCATATTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGCTTACCGTCTCCAGAGACATTTCCAAG AACACGCTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACG GCCGTATATTACTGCGCGAAAGGTACCAGGGACTATTACGGTATGG ACGTCTGGGGCCAAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 127
NI-302.78H12- PIMC V _H	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTC GGAGACCCTGTCCCTCACCTGTCTTGTCTCTAGTTACTCCATCAGC AATGGTTACTACTGGGGCTGGATTCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGG CTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATCATAATGGGAACACCTATTACAA CCCGTCCCTCAAGAGTTCGAGTCATCATTTTCAGTAGACACGTCCAAG AACCAGTTCTCCCTGAAGTTGAGGTCTGTGACCGCCGCAGACACG GCCGTGTACTACTGTGCGATGCCAAGTGCCACCTATTATTATGGTT CGGGGACTCAATTCCATGCGTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAA TGGTCACCGTCTCTTCG SEQ ID NO: 129
NI-302.64E5-PIMC V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGG GGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCGAC CAGGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGGAAGGGGCT GGAGTGGGTTGGCCGGATTAAAACGAAAACCTGAGGGTGAAGCAAC AGACTACGCAGCGCCCGTGAGAGGCAGATTACCATCTCAAGAGAT GATTCAGAAGACACGGTGTCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCG AGGACACAGCCCTGTATTACTGTACGTCAACGGGAGTCTTAGCAGC AGCTGTGATGTCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAACCGTCTC CTCG SEQ ID NO: 166
NI-302.64E5-PIMC V _k	GATATTGTGATGACTCAATCACCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGG GCGAGAGGGCCACCATGACCTGCAAGTCCAGCCAGAGTCTTTTCTA CAGTTACAACATGAGAACTACTTAGCCTGGTATCAGCAGAGACCA GGACAGCCTCCTAAGTTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAAT CCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATT TCACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTA TTACTGTCAGCAATATTATAGTACTCCTCAGACGTTTCGGCCAAGGG ACCAAGGTGGAATCAAA SEQ ID NO: 170

NI-302.72F 10- PIMC V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTCGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACTTCGGC AGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTG GAGTGGGTGTCAGATATCAGTGGTATTGGTAGTAACACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTCACCATTTCCAGAGACAATTCCGA CAATACGTTGTACCTGGACATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCAGATATTACTGTGCGAAGGATCGAAAGCGCAGTGGCTGGTA CGAACAGTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 178
NI-302.72F 10- PIMC V _K	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGACTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCG CCTACTTAGGCTGGTATCAACAAAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT CCTCATCTATGATGCATCCATTAGGGCCACTGGCATTCCAGACAGG TTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCA GCCTAGAGCCTGAAGATTCTGCAGTTTATTACTGTCACCAGCGTAG CAAGTGGCCTCTTACTTTGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAA A SEQ ID NO: 182
NI-302.12H2-PIMC V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTTTCTGTGAAGCCTCTGGATTACCTTTAGC AACTATGCCATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTCTCAGTAATTAGTGGTACTGGTGGTAGCACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAT GAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCCGAGAGCCGACGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATCTGAGGAAGATTAGCGGCTCT TTATACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAAGGACCAAGGTC ACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 190
NI-302.8M1-PIMC V _H	CAGGTGCAGCTGGTGC AATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG GGCCTCAGTGAAAGTTTCTGCAAGGCATCCGGATACACCTTACC ATCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG AGTGGATGGGAGGAATCAGCCCCAGTGGTGCCACACAATGTACG CACAGAATTTCCAGGGCAGAGTCAACCGTGACCAAGGACACGTCCA CGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGAGCACGGTGACTAATATC GACCCCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCT CG SEQ ID NO: 196

Настоящее изобретение также включает фрагменты полинуклеотидов согласно настоящему изобретению, описанные в различных разделах настоящего документа. Кроме того, также включены в настоящее изобретение полинуклеотиды, которые кодируют гибридные полинуклеотиды, Fab-фрагменты и другие производные согласно описанию в настоящем документе. Указанные полинуклеотиды могут быть получены или произведены любым способом, известным в данной области техники. Например, если известна последовательность нуклеотидов антитела, полинуклеотид, кодирующий указанное антитело, может быть собран из химически синтезированных олигонуклеотидов, например, согласно описанию в источнике: Kutmeier et al., BioTechniques 17 (1994), 242; указанный способ, вкратце, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование указанных олигонуклеотидов с последующей амплификацией лигированных олигонуклеотидов посредством ПЦР.

Как вариант, полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное может быть получен из нуклеиновой кислоты, происходящей из подходящего источника. В том случае, если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, не доступен, однако известна последовательность молекулы антитела, нуклеиновая кислота, кодирующая указанное антитело, может быть химически синтезирована или получена из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антител или библиотеки полученных из антител кДНК, или нуклеиновой кислоты, предпочтительно поли-A⁺ РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих НТТ-специфическое антитело, например, гибридомных клеток, выбранных для экспрессии антитела) посредством ПЦР-амплификации с применением синтетических праймеров, гибридизуемых с 3'- и 5'-концами последовательности, или посредством клонирования с применением олигонуклеотидного зонда, специфического в отношении конкретной генной последовательности для идентификации, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, который кодирует указанное антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные посредством ПЦР, могут затем быть клонированы в реплицируемые клонирующие векторы с применением любого способа, хорошо известного в данной области техники.

После определения последовательности нуклеотидов и соответствующей последовательности аминокислот антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, указанная последовательность нуклеотидов может быть обработана с применением хорошо известных в данной области техники способов манипуляции последовательностями нуклеотидов, например, с применением техник рекомбинантной ДНК, сайт-специфического мутагенеза, ПЦР и т.п. (см., например, описание техник в источниках: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) и Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology,

John Wiley & Sons, NY (1998), полностью включенных посредством ссылки в настоящий документ), для получения антител, имеющих другую последовательность аминокислот, например, для введения замен, удалений и/или вставок аминокислот.

IV. Экспрессия полипептидов антитела

После обработки выделенного генетического материала для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных согласно настоящему изобретению кодирующие указанные антитела полинуклеотиды, как правило, встраивают в экспрессионный вектор для введения в клетки-хозяева, которые могут применяться для получения требуемого количества антитела. В настоящем документе описана рекомбинантная экспрессия антитела или его фрагмента, производного или аналога, например, тяжелой или легкой цепи антитела, которая связывается с целевой молекулой. После получения полинуклеотида, кодирующего молекулу антитела, или тяжелую или легкую цепь антитела, или ее часть (предпочтительно содержащую вариабельный домен тяжелой или легкой цепи) согласно настоящему изобретению, может быть получен вектор для получения молекулы антитела с помощью технологии рекомбинантной ДНК, с применением техник, хорошо известных в данной области техники. Соответственно, в настоящем документе описаны способы получения белка путем экспрессирования полинуклеотида, содержащего кодирующую антитело последовательность нуклеотидов. Для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующие антитело последовательности и подходящие сигналы контроля транскрипции и трансляции, могут применяться хорошо известные специалистам в данной области техники способы. Указанные способы включают, например, *in vitro* техники рекомбинантной ДНК, синтетические техники и генетическую рекомбинацию *in vivo*. В настоящем изобретении, соответственно, предложены реплицируемые векторы, содержащие последовательность нуклеотидов, кодирующую молекулу антитела согласно настоящему изобретению, или его тяжелую или легкую цепь, или вариабельный домен тяжелой или легкой цепи, функционально связанную с промотором. Такие векторы могут включать последовательность нуклеотидов, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, международные заявки WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США № 5122464) и вариабельный домен антитела могут быть клонированы в такой вектор для экспрессии полной тяжелой или легкой цепи.

Термин "вектор", или "экспрессионный вектор" в настоящем документе означает векторы, применяемые в соответствии с настоящим изобретением в качестве носителя для введения требуемого гена в клетку-хозяина и его экспрессии. Как известно специалистам в данной области техники, такие векторы могут легко быть выбраны из группы, состоящей из плазмид, фагов, вирусов и ретровирусов. В целом, векторы, подходящие для применения в настоящем изобретении, содержат селективный маркер, подходящие сайты рестрикции для облегчения клонирования требуемого гена и способны проникать в эукариотические или прокариотические клетки и/или реплицироваться в них. Для целей настоящего изобретения могут применяться многочисленные экспрессионные векторные системы. Например, в одном классе векторов используются ДНК-элементы, которые происходят из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус осповакцины, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV) или вирус SV40. Другие включают применение полицистронных систем с внутренними участками связывания рибосомы. Кроме того, отбор клеток, в хромосомы которых была интегрирована ДНК, может осуществляться путем введения одного или большего числа маркеров, которые позволяют осуществлять отбор трансфицированных клеток-хозяев. Указанный маркер может обеспечивать прототрофность у ауксотрофного хозяина, устойчивость к биоцидам (например, антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Селектируемый маркерный ген может либо непосредственно соединен с последовательностями ДНК для экспрессии, либо введены в ту же самую клетку путем котрансформации. Для оптимального синтеза мРНК могут также быть необходимы дополнительные элементы. Указанные элементы могут включать сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, а также транскрипционные промоторы, энхансеры и сигналы терминации.

Согласно конкретным предпочтительным вариантам реализации клонированные гены вариабельной области встраивают в экспрессионный вектор наряду с генами константных областей тяжелых и легких цепей (предпочтительно, принадлежащих человеку) согласно описанию выше. Согласно одному варианту реализации это осуществляют с применением фирменного экспрессионного вектора от Biogen IDEC, Inc., называемого NEOSPLA, согласно описанию в патенте США № 6159730. Указанный вектор содержит цитомегаловирусный промотор/энхансер, основной промотор бета-глобина мыши, точку начала репликации SV40, последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста, экзон 1 и экзон 2 неомидинфосфотрансферазы, ген дигидрофолатредуктазы и лидерную последовательность. Указанный вектор, как было обнаружено, обеспечивает очень высокий уровень экспрессии антител при включении генов вариабельных и константных областей, трансфекции клеток CHO с последующим отбором на содержащей G418 среде и амплификации с применением метотрексата. Разумеется, в настоящем изобретении может применяться любой экспрессионный вектор, способный обеспечивать экспрессию в эукариотических клетках. Примеры подходящих векторов включают, не ограничиваясь перечисленными, плазмиды pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 и pZeoSV2 (поставляемые Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния) и плазмиду pCI (по-

ставляемую Promega, Мэдисон, Висконсин). В целом, скрининг значительных количеств трансформированных клеток для поиска клеток, которые экспрессируют приемлемо высокие уровни тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, представляет собой рутинную экспериментальную работу, которая может осуществляться, например, в роботизированных системах. Векторные системы также описаны в патентах США № 5736137 и № 5658570, каждый из которых полностью включен посредством ссылки в настоящий документ. Указанная система обеспечивает высокие уровни экспрессии, например > 30 пг/клетку/сутки. Другие примеры векторных систем описаны, например, в патенте США № 6413777.

Согласно другим предпочтительным вариантам реализации антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть экспрессированы с применением полицистронных конструкций, таких как описанные в опубликованной заявке на патент США № 2003-0157641 A1, полностью включенной в настоящий документ. В указанных экспрессионных системах несколько представляющих интерес генных продуктов, например, тяжелые и легкие цепи антител, могут быть получены из одной полицистронной конструкции. Указанные системы обеспечивают преимущество, состоящее в применении участка внутренней посадки рибосомы (IRES), что обеспечивает получение относительно высоких уровней антител. Совместимые последовательности IRES описаны в патенте США № 6193980, который также включен в настоящий документ. Специалистам в данной области техники будет понятно, что такие экспрессионные системы могут применяться для эффективного получения полного спектра антител, описанных в настоящем изобретении. Соответственно, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий, по меньшей мере, связывающий домен или вариабельную область иммуноглобулиновой цепи антитела, необязательно в комбинации с полинуклеотидом, который кодирует вариабельную область другой иммуноглобулиновой цепи указанной связывающей молекулы.

В общем случае, после получения вектора или последовательности ДНК, кодирующей мономерную субъединицу антитела, указанный экспрессионный вектор может быть введен в подходящую клетку-хозяина. Введение плазмиды в клетку-хозяина может осуществляться с применением различных техник, хорошо известных специалистам в данной области техники. Указанные техники включают, не ограничиваясь перечисленными, трансфекцию, в том числе липотрансфекцию с применением, например, реагента Eugene® или липофектамина, слияние протопластов, осаждение с фосфатом кальция, слияние клеток с покрытой оболочкой ДНК, микроинъекцию и инфекцию интактным вирусом. Как правило, введение плазмиды хозяину осуществляют с применением стандартного способа соосаждения с фосфатом кальция. Клетки-хозяева, несущие указанные экспрессионные конструкции, культивируют в условиях, подходящих для получения легких цепей и тяжелых цепей, и анализируют на предмет синтеза белков тяжелых и/или легких цепей. Примеры техник анализа включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (РИА) или сортировку клеток с активацией флуоресценции (FACS), иммуногистохимические исследования и т.п.

Экспрессионный вектор переносят в клетку-хозяина с применением стандартных техник, а затем трансфицированные клетки культивируют с использованием стандартных техник для получения антитела для применения в способах, описанных в настоящем документе. Соответственно, настоящее изобретение включает клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело согласно настоящему изобретению, или его тяжелую или легкую цепь, или, по меньшей мере, связывающий домен или вариабельную область соответствующего иммуноглобулина, которые предпочтительно функционально связаны с гетерологичным промотором. Согласно альтернативному или дополнительному варианту настоящее изобретение также включает клетки-хозяева, содержащие вектор согласно определению выше в настоящем документе, содержащий полинуклеотид, кодирующий, по меньшей мере, связывающий домен или вариабельную область иммуноглобулиновой цепи антитела, необязательно в комбинации с полинуклеотидом, который кодирует вариабельную область другой иммуноглобулиновой цепи указанной связывающей молекулы. Согласно предпочтительным вариантам реализации для экспрессии двуцепочечных антител в клетке-хозяине может экспрессироваться один вектор или могут коэкспрессироваться векторы, кодирующий(ие) как тяжелые, так и легкие цепи, для экспрессии полной молекулы иммуноглобулина, согласно подробному описанию ниже.

Клетка-хозяин может быть котрансфицирована двумя экспрессионными векторами согласно настоящему изобретению, при этом первый вектор кодирует полипептид, происходящий из тяжелой цепи, и второй вектор кодирует полипептид, происходящий из легкой цепи. Указанные два вектора могут содержать идентичные селективируемые маркеры, чтобы обеспечить одинаковый уровень экспрессии полипептидов тяжелых и легких цепей. Как вариант, может применяться один вектор, кодирующий полипептиды и тяжелой, и легкой цепи. В таких ситуациях легкая цепь предпочтительно располагается перед тяжелой цепью, чтобы избежать получения избытка токсической свободной тяжелой цепи; см. Proudfoot, Nature 322 (1986), 52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 2197. Кодирующие последовательности тяжелых и легких цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК.

В настоящем документе термин "клетки-хозяева" относится к клеткам, несущим векторы, сконструированные с применением техник рекомбинантной ДНК и кодирующие по меньшей мере один гетеро-

логичный ген. В описаниях способов выделения антител из рекомбинантных хозяев термины "клетка" и "культура клеток" используются взаимозаменяемо, обозначая источник антитела, если явным образом не указано иное. Другими словами, выделение полипептида из "клеток" может означать выделение либо из осажденных целых клеток, либо из культуры клеток, содержащей и среду, и суспендированные клетки.

Для экспрессии молекул антитела для применения в способах, описанных в настоящем документе могут использоваться различные системы хозяев/экспрессионных векторов. Такие системы хозяев/экспрессионных векторов представлены носителями, с помощью которых представляющие интерес кодирующие последовательности могут быть получены и затем очищены, однако также представлены клетками, которые могут, после трансформации или трансфекции подходящими нуклеотидными кодирующими последовательностями, экспрессировать молекулу антитела согласно настоящему изобретению *in situ*. Указанные системы включают, не ограничиваясь перечисленными, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) трансформированные рекомбинантными экспрессионными ДНК-векторами на основе бактериофагов, плазмидными или космидными экспрессионными ДНК-векторами, содержащими кодирующие последовательности антитела; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессионными векторами, содержащими кодирующие последовательности антитела; системы на основе клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, бакуловирусными), содержащими кодирующие последовательности антитела; системы на основе растительных клеток, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, на основе вируса мозаики цветной капусты, CaMV; вируса табачной мозаики, TMV) или трансформированных рекомбинантными плазмидными экспрессионными векторами (например, на основе Ti-плазмиды), содержащими кодирующие последовательности антитела; или системы на основе клеток млекопитающих (например, клеток COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3), несущих рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, происходящие из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотioneина) или вирусов млекопитающих (например, поздний аденовирусный промотор; промотор вируса осповакцины 7.5K). Для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела предпочтительно используют бактериальные клетки, такие как *E. coli*, и, более предпочтительно, эукариотические клетки, в частности, для экспрессии целой рекомбинантной молекулы антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как основной промоторный элемент промежуточно-ранних генов цитомегаловируса человека, представляет собой эффективную систему экспрессии антител; см., например, Foecking et al., *Gene* 45 (1986), 101; Cockett et al., *Bio/Technology* 8 (1990), 2.

Часто используются линии клеток-хозяев, происходящие от млекопитающих; специалисты в данной области техники смогут определить конкретные предпочтительные линии клеток-хозяев, которые наилучшим образом подходят для экспрессирования требуемого генного продукта. Примеры линий клеток-хозяев включают, не ограничиваясь перечисленными, CHO (клетки яичника китайского хомячка), DG44 и DUXB11 (линии клеток яичника китайского хомячка, DHFR-), HELA (карцинома шейки матки человека), CV1 (линия почек обезьяны), COS (производная от CV1 линия с T-антигеном SV40), VERY, BHK (почка новорожденного хомяка), MDCK, WI38, R1610 (фибробласты китайского хомячка) BALBC/3T3 (фибробласты мыши), HAK (линия клеток почек хомяка), SP2/O (миелома мыши), P3x63-Ag3.653 (миелома мыши), BFA-1c1BPT (бычья эпителиальная клетка), RAJI (лимфоциты человека) и 293 (почка человека). В частности, предпочтительными являются клетки CHO и 293. Линии клеток-хозяев, как правило, доступны из коммерческих источников, представлены в Американской коллекции тканевых культур или в опубликованных источниках.

Кроме того, может быть выбран штамм клеток-хозяев, модулирующий экспрессию встроенных последовательностей, или обеспечивающий модуляцию и процессинг генного продукта конкретным требуемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важны для функционирования указанного белка. Другие клетки-хозяева обладают свойствами и специфическими механизмами для посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Могут быть выбраны подходящие линии клеток или системы хозяев для обеспечения корректной модификации и процессинга экспрессированного чужеродного белка. С этой целью могут применяться эукариотические клетки-хозяева, обеспечивающие клеточные механизмы для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта.

Для долгосрочного синтеза рекомбинантных белков с высоким выходом предпочтительна стабильная экспрессия. Например, могут быть сконструированы линии клеток, которые стабильно экспрессируют молекулу антитела. Вместо применения экспрессионных векторов, содержащих точки начала репликации вируса, клетки-хозяева могут быть трансформированы ДНК, контролируемой подходящими элементами контроля экспрессии (например, промоторными, энхансерными последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.п.) и селективируемым маркером. После введения чужеродной ДНК сконструированные клетки могут в течение 1-2 дней культивироваться на обогащенной среде, а затем быть перенесены на селективную среду. Селективируемый маркер в рекомбинантной

плазмиде придает клеткам устойчивость к селекции, позволяет стабильно интегрировать указанную плазмиду в хромосомы и обеспечивает рост с формированием очагов, которые, в свою очередь, могут быть клонированы и размножены с получением линий клеток. Указанный способ может обеспечивать преимущество, состоящее в применении для конструирования линий клеток, стабильно экспрессирующих молекулу антитела.

Может применяться ряд систем селекции, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, могут применяться гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., Cell 11 (1977), 223), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska and Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1992), 202) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy et al., Cell 22 (1980), 817) в клетках tk-, hgpRT-или aprT-, соответственно. Также селекция может быть основана на устойчивости к антиметаболитам при использовании 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 and 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 hygR, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre et al., Gene 30 (1984), 147). Подходящие для применения технологии рекомбинантной ДНК, общеизвестные в данной области техники, описаны у 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); и в главах 12 и 13 источника: 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 посредством ссылки в настоящий документ.

Уровни экспрессии молекулы антитела могут быть увеличены за счет амплификации вектора; см. общую информацию в источниках: 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 используемый в векторной системе для экспрессии антитела маркер является амплифицируемым, при увеличении уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, возрастает число копий маркерного гена. Поскольку амплифицированная область связана с геном антитела, увеличивается и уровень синтеза антитела; см. Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257.

Синтез *in vitro* позволяет осуществлять масштабирование с получением значительных количеств требуемых полипептидов. Техники культивирования клеток млекопитающих в условиях тканевой культуры известны в данной области техники и включают гомогенную суспензионную культуру, например, в аэролитном реакторе или реакторе непрерывного действия с перемешиванием, или иммобилизованные или захваченные культуры клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микрогранулах или в керамических картриджах. При необходимости и/или при желании растворы полипептидов могут быть очищены с применением индивидуализированных хроматографических способов, например, гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе или (иммунно)аффинной хроматографии, например, после избирательного биосинтеза синтетического полипептида шарнирной области, или до/после этапа хроматографии гидрофобных взаимодействий согласно описанию в настоящем документе.

Гены, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут также экспрессироваться в клетках, не являющихся клетками млекопитающих, например, в клетках бактерий или насекомых, или в дрожжевых или растительных клетках. Бактерии, легко принимающие нуклеиновые кислоты, включают представителей Enterobacteriaceae, таких как штаммы E. coli или Salmonella; Bacillaceae, такие как B. subtilis; Pneumococcus; Streptococcus; и Haemophilus influenzae. Следует также иметь в виду, что при экспрессии у бактерий гетерологичные полипептиды, как правило, входят в состав телец включения. Гетерологичные полипептиды должны быть выделены, очищены и затем собраны в функциональные молекулы. Если требуются тетравалентные формы антител, субъединицы затем собираются в тетравалентные антитела; см., например, международную заявку WO 02/096948.

При использовании бактериальных систем ряд предпочтительных экспрессионных векторов может быть выбран на основании предполагаемого применения экспрессируемой молекулы антитела. Например, если необходим синтез значительных количеств такого белка для получения фармацевтических композиций с молекулой указанного антитела, целесообразным может быть применение векторов, обеспечивающих высокие уровни экспрессии гибридных белковых продуктов, которые могут быть легко очищены. Такие векторы включают, не ограничиваясь перечисленными, экспрессионный вектор E. coli pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2 (1983), 1791), при использовании которого кодирующая антитело последовательность может быть индивидуальным образом лигирована внутрь рамки с кодирующей lacZ областью для продуцирования гибридного белка; векторы pIN (Inouye and Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke and Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509) и т.п. Могут также применяться векторы pGEX для экспрессии чужеродных полипептидов в виде гибридных белков, содержащих

глутатион-S-трансферазу (GST). В общем случае такие гибридные белки являются растворимыми и могут легко быть очищены из лизированных клеток путем адсорбции и связывания на подложке с глутатион-агарозными гранулами и последующего элюирования в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX сконструированы таким образом, что они содержат сайты расщепления протеазами тромбина или фактора Ха, с обеспечением таким образом возможности отделения продукта клонированного целевого гена от фрагмента GST.

Помимо прокариот могут также применяться эукариотические микроорганизмы. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, представляют собой наиболее часто используемый эукариотический микроорганизм, хотя общедоступны и некоторые другие штаммы, например, *Pichia pastoris*. 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). Указанная плазида уже содержит ген TRP1, представляющий собой селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, неспособного расти в отсутствие триптофана, например, ATCC No. 44076 или PEP4-1 (Jones, Genetics 85 (1977), 12). Наличие поврежденного *trp1* в геноме дрожжевой клетки-хозяина в этом случае обеспечивает эффективные условия для детекции трансформации путем культивирования в отсутствие триптофана.

В системе на основе клеток насекомых *Autographa californica* в качестве вектора для экспрессирования чужеродных генов, как правило, используется вирус ядерного полиэдроза (AcNPV). Указанный вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодированная последовательность антитела может быть клонирована индивидуальным образом во второстепенные области (например, в ген полиэдрина вируса) и помещена под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина).

После того как молекула антитела согласно настоящему изобретению экспрессирована рекомбинантным способом, полные антитела, их димеры, индивидуальные легкие и тяжелые цепи или другие формы иммуноглобулинов согласно настоящему изобретению могут быть очищены в соответствии со стандартными для данной области техники процедурами, в том числе, например, с применением хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в частности, на основании аффинности к специфическому антигену после проведения хроматографии с белком А, и эксклюзионной колоночной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости, например, осаждения сульфатом аммония, или с применением любой другой стандартной техники очищения белков; см., например, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). Вариант предпочтительного способа увеличения аффинности антител согласно настоящему изобретению раскрыт в патентной публикации США 2002-0123057 A1. Согласно одному варианту реализации, соответственно, в настоящем изобретении также предложен способ получения антитела к НТТ или антитела, распознающего мутированные и/или агрегированные виды НТТ, и/или их фрагменты, или соответствующая(ие) ему цепь(цепи) иммуноглобулина, при этом указанный способ включает:

(а) культивирование клетки-хозяина согласно определению выше в настоящем документе, содержащей полинуклеотид или вектор согласно определению выше в настоящем документе; и

(b) выделение указанного антитела или соответствующей(его) ему цепи(цепей) иммуноглобулина из культуры.

Кроме того, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение также относится к антителу или соответствующей(им) ему цепи(цепям) иммуноглобулинов, кодируемому(ым) полинуклеотидом согласно определению выше в настоящем документе или получаемому(им) с применением указанного способа получения антитела к НТТ, или антителу, распознающему мутированные и/или агрегированные виды НТТ, и/или их фрагменты, или соответствующей(им) ему цепи(цепям) иммуноглобулинов.

V. Гибридные белки и конъюгаты

Согласно определенным вариантам реализации полипептид антитела содержит последовательность аминокислот, или один или большее число фрагментов, обычно не связанных с антителом. Примеры модификаций подробнее описаны ниже. Например, одноцепочечный фрагмент Fv антитела согласно настоящему изобретению может содержать последовательность гибкого линкера, или может быть модифицирован путем добавления функционального фрагмента (например, ПЭГ, лекарственного средства, токсина или метки, такой как флуоресцентная, радиоактивная, ферментная, ядерно-магнитная метка, тяжелый металл и т.п.)

Полипептид антитела согласно настоящему изобретению может содержать, по существу состоять или состоять из гибридного белка. Гибридные белки представляют собой гибридные молекулы, которые содержат, например, НТТ-связывающий домен иммуноглобулина, содержащий по меньшей мере один связывающий мишень сайт и по меньшей мере одну гетерологичную часть, т.е. часть, с которой он естественным образом не связан в природе. Указанные последовательности аминокислот, как правило, могут существовать в форме отдельных белков, которые соединяют в гибридном полипептиде; они также могут, как правило, присутствовать в одном белке, однако размещаться иным образом в гибридном полипептиде. Гибридные белки могут быть получены, например, посредством химического синтеза, или путем получения и трансляции полинуклеотида, кодирующего области пептида в нужном взаимном расположении.

Термин "гетерологичный" в отношении полинуклеотида или полипептида означает, что указанный

полинуклеотид или полипептид происходит из другого объекта, а не из остальной части сопоставляемого объекта. Например, в настоящем документе "гетерологичный полипептид" для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, вариантом или аналогом происходит из не являющегося иммуноглобулином полипептида того же вида, или являющегося иммуноглобулином или не являющегося иммуноглобулином полипептида другого вида.

Согласно подробному описанию в различных разделах настоящего документа антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут также быть рекомбинантным способом соединены с гетерологичным полипептидом на N- или C-конце, или химически конъюгированы (в том числе ковалентно и нековалентно) с полипептидами или другими составами. Например, антитела могут быть рекомбинантным способом соединены или конъюгированы с молекулами, подходящими для применения в качестве меток в детекционных анализах и в качестве эффекторных молекул, например, с гетерологичными полипептидами, лекарственными средствами, радионуклидами или токсинами; см., например, международные заявки WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; патент США № 5314995 и заявку на европейский патент EP 0396387.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут состоять из аминокислот, соединенных между собой пептидными связями или модифицированными пептидными связями, т.е. пептидными изостерами, и может содержать аминокислоты, отличные от 20 генетически кодируемых аминокислот. Антитела могут быть модифицированы в результате естественных процессов, таких как посттрансляционный процессинг, или в результате применения техник химической модификации, хорошо известных в данной области техники. Такие модификации подробно описаны в основных текстах и в более полных монографиях, а также в обширной научной литературе. Модификации могут происходить в любой области антитела, в том числе в пептидном остове, боковых аминокислотных цепях, на аминоконце или на карбоксильном конце, или на фрагментах, например, на углеводных фрагментах. Следует понимать, что одна и та же модификация может в равной или в разной степени быть представлена в нескольких участках определенного антитела. Определенное антитело может также содержать модификации многих типов. Антитела могут быть разветвленными, например, в результате убиквитинирования; циклическими; разветвленными или не разветвленными. Циклические, разветвленные и разветвленные циклические антитела могут возникать в результате естественных посттрансляционных процессов или могут быть получены с применением синтетических способов. Модификации включают ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение фрагмента гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрестное связывание, циклизацию, образование дисульфидных связей, деметилирование, образование ковалентных перекрестных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование ГФИ-якоря, гидроксилирование, иодирование, метилирование, миристилолирование, окисление, пегилирование, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное tРНК добавление аминокислот в белки, 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, (1983) 1-12; Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182 (1990), 626-646; Rattan et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 663 (1992), 48-62).

В настоящем изобретении также предложены гибридные белки, содержащие антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, и гетерологичный полипептид. Согласно одному варианту реализации гибридный белок согласно настоящему изобретению включает, состоит по существу или состоит из полипептида, имеющего последовательность аминокислот, соответствующую любой одной или большему числу областей V_H антитела согласно настоящему изобретению, или последовательность аминокислот, соответствующую любой одной или большему числу областей V_L антитела согласно настоящему изобретению, или его фрагментов или вариантов, и последовательность гетерологичного полипептида. Согласно другому варианту реализации гибридный белок для применения в способах диагностики и лечения согласно описанию в настоящем документе содержит, состоит по существу или состоит из полипептида, имеющего последовательность аминокислот, соответствующую любой одной, двум, трем из областей V_H -CDR антитела, или ее фрагментам, вариантам или производным, или последовательность аминокислот, соответствующую любой одной, двум, трем из областей V_L -CDR антитела, или ее фрагментам, вариантам или производным, и последовательность гетерологичного полипептида. Согласно одному варианту реализации указанный гибридный белок содержит полипептид, имеющий последовательность аминокислот V_H -CDR3 антитела согласно настоящему изобретению, или его фрагмент, производное или вариант, и последовательность гетерологичного полипептида, при этом указанный гибридный белок специфически связывается с НТТ. Согласно другому варианту реализации гибридный белок содержит полипептид, имеющий последовательность аминокислот, соответствующую по меньшей мере одной области V_H антитела согласно настоящему изобретению, и последовательность аминокислот, соответствующую по меньшей мере одной области V_L антитела согласно настоящему изобретению.

бретению, или их фрагменты, производные или варианты, и последовательность гетерологичного полипептида. Предпочтительно, области V_H и V_L указанного гибридного белка соответствуют одному исходному антителу (или scFv, или Fab-фрагменту), которое специфически связывает НТТ. Согласно еще одному варианту реализации гибридный белок для применения в способах диагностики и лечения согласно описанию в настоящем документе содержит полипептид, имеющий последовательность аминокислот, соответствующую любой одной, двум, трем или более из областей V_H CDR антитела, и последовательность аминокислот, соответствующую любой одной, двум, трем или более из областей V_L CDR антитела, или их фрагментам или вариантам, и последовательность гетерологичного полипептида. Предпочтительно две, три, четыре, пять, шесть или более областей V_H -CDR или V_L -CDR соответствуют одному исходному антителу (или scFv, или Fab-фрагменту) согласно настоящему изобретению. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие указанные гибридные белки, также охвачены настоящим изобретением.

Примеры гибридных белков, описанные в опубликованных источниках, включают гибридный Т-клеточный рецептор (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-селектин (хоминг-рецептор) (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); рецептор 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 рецептор IgE (Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. 115 (1991), Abstract No. 1448).

Как обсуждалось в различных разделах настоящего документа, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть соединены с гетерологичными полипептидами для увеличения времени полужизни полипептидов *in vivo* или для применения в иммунологических анализах, действующих способы, известные в данной области техники. Например, согласно одному варианту реализации ПЭГ может быть конъюгирован с антителами согласно настоящему изобретению 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 настоящему изобретению могут быть соединены с маркерными последовательностями, например, маркерным пептидом, для облегчения их очищения или детекции. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанная маркерная последовательность аминокислот представляет собой гексагистидиновый пептид (HIS), например, метку в векторе pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), а также другие маркерные последовательности, многие из которых коммерчески доступны. Согласно описанию в Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824, например, гексагистидин позволяет проводить удобное очищение указанного гибридного белка. Другие пептидные метки, подходящие для очищения, включают, не ограничиваясь перечисленными, метку "НА", которая соответствует эпитопу, происходящему из белка гемагглютинина гриппа (Wilson et al., Cell 37 (1984), 767), глутатион-S-трансферазу (GST), с-мус и FLAG-маркер; см., например, обзор техник мечения эпитопов в источнике: Bill Brizzard, BioTechniques 44 (2008) 693-695, содержание которого прямо включено в настоящий документ посредством ссылки; в табл. 1 на стр. 694 приведены наиболее распространенные эпитопные метки, подходящие для применения в настоящем изобретении.

Гибридные белки могут быть получены с применением способов, хорошо известных в данной области техники; см. например, патенты США № 5116964 и № 5225538. Конкретный участок соединения может быть выбран эмпирически для оптимизации секреции или связывающих характеристик указанного гибридного белка. Затем ДНК, кодирующей гибридный белок, трансфицируют клетку-хозяина для экспрессии, которую осуществляют согласно приведенному выше в настоящем документе описанию.

Антитела согласно настоящему изобретению могут применяться в неконъюгированной форме или могут быть конъюгированы по меньшей мере с одной из ряда молекул, например, для улучшения терапевтических характеристик молекулы, для облегчения детекции мишени, или для визуализации или терапии у пациента. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть помечены или конъюгированы либо до, либо после очищения, если осуществляется очищение. В частности, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть конъюгированы с терапевтическими агентами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического отклика, фармацевтическими агентами или ПЭГ.

Конъюгаты, представляющие собой иммунотоксины, включающие стандартные антитела, широко описаны в данной области техники. Указанные токсины могут быть конъюгированы с антителами с помощью стандартных техник конъюгации; либо иммунотоксины, содержащие токсические белковые части, могут быть синтезированы в виде гибридных белков. Антитела согласно настоящему изобретению могут применяться соответствующим образом для получения таких иммунотоксинов.

Иллюстративные примеры таких иммунотоксина описаны в источниках: Byers, *Seminars Cell. Biol.* 2 (1991), 59-70 и Fanger, *Immunol. Today* 12 (1991), 51-54.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что конъюгаты могут также быть получены с применением различных техник в зависимости от выбранного агента для конъюгации. Например, конъюгаты с биотином получают путем проведения реакции, например, связывающего НТТ полипептида с активированным сложным эфиром биотина, таким как биотин-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир. Аналогичным образом, конъюгаты с флуоресцентным маркером могут быть получены в присутствии связывающего агента, например, из перечисленных в настоящем документе, или путем проведения реакции с изотиоцианатом, предпочтительно флуоресцеин-изотиоцианатом. Конъюгаты указанных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных согласно настоящему изобретению получают аналогичным способом.

Настоящее изобретение также охватывает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению, конъюгированные с диагностическим или терапевтическим агентом. Указанные антитела могут применяться диагностически, например, для демонстрации наличия НТТ-амилоидоза, для определения риска появления заболевания или расстройства, связанного с мутированным и/или агрегированным НТТ, для мониторинга развития или прогрессирования такого заболевания, т.е. заболевания, при котором наблюдается возникновение агрегированного НТТ или связанного с агрегированным НТТ, или в качестве части процедуры клинического исследования, например, для определения эффективности определенной схемы лечения и/или профилактики. Согласно одному варианту реализации, соответственно, настоящее изобретение относится к меченому антителу с возможностью детекции. Кроме того, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу, которое присоединено к лекарственному средству. Детекции может способствовать соединение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного с детектируемым веществом. Вещества или метка с возможностью детекции могут в целом быть представлены ферментом; тяжелым металлом, предпочтительно золотом; красителем, предпочтительно флуоресцентным или люминесцентным красителем; или радиоактивной меткой. Примеры веществ с возможностью детекции включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные материалы, позитронно-активные металлы для применения различных вариантов позитронно-эмиссионной томографии, и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов; см., например, в патенте США № 4741900 описание ионов металлов, которые могут быть конъюгированы с антителами для диагностического применения в соответствии с настоящим изобретением. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин-изотиоцианат, родамин, ди-хлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; примеры люминесцентного материала включают люминол; примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин и экворин; и примеры подходящих радиоактивных материалов включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In или ^{99}Tc . Соответственно, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложено детектируемо меченое антитело, отличающееся тем, что метка с возможностью детекции выбрана из группы, состоящей из фермента, радиоизотопа, флуорофора и тяжелого металла.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное также может быть детектируемо помечено путем соединения с хемилюминесцентным соединением. Затем определяют присутствие хемилюминесцентно-меченого антитела путем детекции люминесценции, возникающей в ходе химической реакции. Примеры соединений, подходящих для применения в качестве хемилюминесцентных меток включают, в частности, люминол, изолуминол, ароматический сложный эфир акридина, имидазол, соль акридина и сложный эфир щавелевой кислоты.

Один из способов детектируемого мечения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного заключается в связывании его с ферментом и использовании связанного продукта для иммуноферментного анализа (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, (ed.), *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, et al., (eds.), *Enzyme Immunoassay*, Kaku Shoin, Tokyo (1981). Фермент, связанный с антителом, вступает в реакцию с подходящим субстратом, предпочтительно, хромогенным субстратом, таким образом, что образуется химический фрагмент, который может быть детектирован, например, с применением спектрофотометрических, флуориметрических или визуальных способов. Ферменты, которые могут применяться для детектируемого мечения антител, включают, не ограничиваясь перечисленными, малатдегидрогеназу, стафилококковую нуклеазу, дельта-5-стероид-изомеразу, дрожжевую алкогольдегидрогеназу, альфа-глицерофосфат, дегидрогеназу, триозофосфатизомеразу, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, аспарагиназу, глюкозооксидазу, бета-галактозидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназу, глюкоамилазу и ацетилхолинэстеразу. Кроме того, детекция может осуществляться при помощи колориметриче-

ских способов, предусматривающих использование хромогенного субстрата фермента. Детекция может также осуществляться путем визуального сравнения глубины ферментативной реакции субстрата со сравнением с аналогичным образом полученными стандартами.

Детекция может также проводиться с применением любого из множества других иммунологических анализов. Например, при радиоактивном мечении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного возможна детекция антитела с применением радиоиммунологического анализа (РИА) (см., например, источник: Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (March, 1986)), включенный в настоящий документ посредством ссылки). Радиоактивный изотоп может быть детектирован с применением, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, счетчика гамма-излучения, сцинтилляционного счетчика или ауторадиографии.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное могут также быть детектируемо помечены с применением флуоресцирующих металлов, таких как ^{152}Eu , или других лантанидов. Указанные металлы могут быть присоединены к антителу посредством таких металлохелатирующих групп, как диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА) или этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК).

Техники конъюгации различных фрагментов с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, вариантом или производным хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в публикации: Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", в публикации: Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1987) 623-53; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в публикации: Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), (1985) 475-506; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в публикации: Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press (1985) 303-16; и Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62 (1982), 119-158.

Как упоминалось, согласно определенным вариантам реализации фрагмент, который повышает стабильность или эффективность связывающей молекулы, например, связывающий полипептид, например, антитело или его иммуноспецифический фрагмент, может быть конъюгирован. Например, согласно одному варианту реализации со связывающими молекулами согласно настоящему изобретению может быть конъюгирован 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 композиции, содержащей вышеупомянутую НТТ-связывающую молекулу, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, или его производное или вариант, или полинуклеотид, вектор или клетку, предложенный(ую) в настоящем изобретении, согласно определению выше в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации композиция согласно настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию и дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать дополнительные агенты, такие как интерлейкины или интерфероны, в зависимости от предполагаемого применения фармацевтической композиции. Для применения при лечении заболевания или расстройства, при котором наблюдается возникновение мутированного и/или агрегированного НТТ, или связанное с мутированным и/или агрегированным НТТ, такого как НТТ-амилоидоз, указанный дополнительный агент может быть выбран из группы, состоящей из малых органических молекул, антител к НТТ; и их комбинаций. Таким образом, согласно конкретному предпочтительному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению НТТ-связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, или связывающей молекулы, отличающейся по существу идентичной чему-либо из перечисленного специфичностью связывания, полинуклеотида, вектора или клетки согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической или диагностической композиции для профилактического и терапевтического лечения болезни Гентингтона (БГ), и/или заболевания или расстройства, связанного с НТТ и/или НТТ-амилоидозом, мониторинга прогрессирования БГ и/или заболевания или расстройства, связанного с НТТ и/или НТТ-амилоидозом, или отклика на лечение НТТ-амилоидоза у субъекта, или для определения риска развития у субъекта заболевания или расстройства, связанного с НТТ.

Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или расстройства, характеризующегося аномальным накоплением и/или отложением НТТ, и/или агрегированного и/или мутированного НТТ в пораженных системах и органах, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества любого из описанных выше НТТ-связывающих молекул, антител, полинуклеотидов, векторов или клеток согласно настоящему изобретению.

Особое преимущество терапевтического подхода, предложенного в настоящем изобретении, заключается в том факте, что рекомбинантные антитела согласно настоящему изобретению происходят из В-клеток или В-клеток памяти здоровых субъектов-людей без признаков или симптомов заболевания, например, носителей бессимптомной мутации и/или мутаций, при которой(ых) наблюдается возникновение агрегированного НТТ, или связанной(ых) с агрегированным НТТ и, соответственно, с определенной вероятностью способны предотвращать клинические проявления заболевания, связанного с мутированным и/или агрегированным НТТ, или уменьшать риск возникновения клинического проявления заболевания или расстройства, или задерживать начало или прогрессирование клинического проявления заболевания или расстройства. Как правило, антитела согласно настоящему изобретению также успешно прошли соматическое созревание, т.е. оптимизацию селективности и эффективности за счет высокой аффинности связывания целевой молекулы НТТ путем соматических мутаций переменных областей антитела.

То, что *in vivo*, например, у человека, такие клетки не были активированы родственными или другими физиологическими белками или клеточными структурами с возникновением аутоиммунной или аллергической реакции, также имеет большое медицинское значение, поскольку указывает на значимое повышение вероятности успешного прохождения через фазы клинических испытаний. Можно сказать, что эффективность, приемлемость и переносимость уже были продемонстрированы до доклинических и клинических разработок профилактического или терапевтического антитела по меньшей мере у одного субъекта-человека. Таким образом, можно ожидать, что и специфическая эффективность в отношении целевых структур при использовании в качестве терапевтического агента, наряду с уменьшением вероятности побочных эффектов, значимо повышают клиническую вероятность успешного применения происходящих от человека антител к НТТ согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предложен фармацевтический и диагностический, соответственно, комплект или набор, содержащий один или большее число контейнеров, заполненных одним или большим числом вышеописанных ингредиентов, например, антителом к НТТ, его связывающим фрагментом, производным или вариантом, полинуклеотидом, вектором или клеткой согласно настоящему изобретению. Такой(ие) контейнер(ы) может сопровождать информационное сообщение в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических или биологических продуктов, подтверждающее одобрение указанным органом производства, использования или продажи для введения человеку. Согласно альтернативному или дополнительному варианту указанный набор содержит реагенты и/или инструкции для применения в соответствующих диагностических анализах. Композиция, например, набор согласно настоящему изобретению, безусловно, подходит, в частности, для оценки риска, диагностики, предотвращения и лечения болезни Гентингтона и/или заболевания или расстройства, которое отличается наличием мутированного и/или агрегированного НТТ, и, в частности, применим(а) для лечения расстройств, обычно характеризующихся НТТ-амилоидозом.

Составы с фармацевтическими композициями согласно настоящему изобретению могут быть получены в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники; см. например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) (University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472). Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают буферные фосфатные солевые растворы, воду, эмульсии, такие как масляные/водные эмульсии, смачивающие агенты различных типов, стерильные растворы и т.п. Композиции, содержащие такие носители, могут быть введены в состав с применением хорошо известных стандартных способов. Указанные фармацевтические композиции могут вводиться субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций может быть реализовано различными способами, например, внутривенно, внутривенно, подкожно, внутримышечно, интраназально, местно или внутрикожно, или путем доставки через спинной или головной мозг. Аэрозольные составы, такие как назальные спреи, включают очищенные водные или другие растворы активного агента с консервирующими и изотоническими агентами. Такие составы предпочтительно доводят до изотоничности и значений pH, совместимых со слизистыми оболочками полости носа. Составы для ректального или вагинального введения могут быть представлены суппозиториями в подходящем носителе.

Схему дозирования определяет лечащий врач на основании клинических факторов. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого конкретного пациента зависят от многих факторов, в том числе размеров пациента, площади поверхности тела, возраста, конкретного соединения, которое предполагается вводить, пола, времени и способа введения, общего состояния здоровья и одновременно введения других лекарственных средств. Типичная доза может, например, составлять от 0,001 до 1000 мкг (или соответствовать количеству нуклеиновой кислоты для экспрессии или ингибирования экспрессии в указанном диапазоне); однако включены и дозы, выходящие за пределы указанных иллюстративных диапазонов, в частности, с учетом вышеупомянутых факторов. Как правило, дозы могут варьировать, например, от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг, чаще от 0,01 до 5 мг/кг (например, 0,02 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг и т.п.) массы тела хозяина. Например, дозировка может составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела, или находиться в пределах диапазона 1-10 мг/кг, предпочтительно по меньшей мере 1 мг/кг. Промежуточные дозы в пределах указанных диапазонов также входят в объем настоящего изобретения. Такие дозы могут вводиться субъектам ежедневно, через

день, еженедельно или в соответствии с любой другой схемой, определяемой путем эмпирического анализа. Примеры лечения включают введение нескольких доз на протяжении длительного периода времени, например, на протяжении по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные примеры схем лечения включают однократное введение каждые две недели или один раз в месяц, или однократное введение каждые 3-6 месяцев. Примеры схем дозирования включают 1-10 или 15 мг/кг на протяжении нескольких дней подряд, 30 мг/кг через день или 60 мг/кг еженедельно. Согласно некоторым способам одновременно вводят два или большее число моноклональных антител с разной специфичностью связывания, в этом случае дозировка каждого вводимого антитела находится в пределах указанных диапазонов. Прогресс может отслеживаться путем осуществления периодической оценки. Составы для парентерального введения включают стерильный водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные сложные органические эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе солевой раствор и забуференные среды. Основы для парентерального применения включают раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом, или нелетучие масла. Основы для внутривенного введения включают восполняющие жидкость и питательные вещества средства, восполняющие электролиты средства (например, на основе раствора Рингера с декстрозой), и т.п. Могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы, и т.п. Кроме того, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать дополнительные агенты, такие как допамин или психофармакологические лекарственные средства, в зависимости от предполагаемого применения фармацевтической композиции.

Кроме того, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная фармацевтическая композиция может быть введена в состав вакцины, например, в том случае, если фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит антитело к НТТ или НТТ-связывающий фрагмент, его производное или синтетический или биотехнологический вариант, для пассивной иммунизации. Как упоминалось в разделе "Уровень техники", мутированные и/или агрегированные виды НТТ, и/или их фрагменты или производные представляют собой основной провоцирующий фактор НТТ-амилоидоза. Соответственно, разумно ожидать, что пассивная иммунизация антителами человека к НТТ и эквивалентными НТТ-связывающими молекулами согласно настоящему изобретению поможет обойти ряд нежелательных явлений при использовании вариантов терапии с применением активной иммунизации, и обеспечит снижение агрегации НТТ. Соответственно, предложенные антитела к НТТ и их эквиваленты согласно настоящему изобретению подходят, в частности, для применения в качестве вакцины для предотвращения или облегчения заболеваний или расстройств, при которых наблюдается присутствие агрегированного НТТ, или вызываемых агрегированным НТТ, например, БГ.

Согласно одному варианту реализации может быть целесообразным применение рекомбинантных Fab-фрагментов (rFab) и одноцепочечных фрагментов (scFv) антитела согласно настоящему изобретению, которые могут с большей легкостью проникать через клеточную мембрану. Например, в источнике Robert et al., Protein Eng. Des. Sel. (2008); S1741-0134, опубликованном в сети Интернет ранее, описано применение гибридных рекомбинантных Fab-фрагментов (rFab) и одноцепочечных фрагментов (scFv) моноклонального антитела WO-2, распознающего эпитоп в N-концевой области Абета. Сконструированные фрагменты были способны: (i) предотвращать образование фибрилл амилоида, (ii) дезагрегировать уже сформированные фибриллы Абета1-42 и (iii) ингибировать опосредованную олигомерами Абета1-42 нейротоксичность *in vitro*, столь же эффективно, как и полноразмерная молекула IgG. Очевидные преимущества применения сконструированных малых Fab- и scFv-антител с отсутствующей эффекторной функцией включают более эффективное проникновение через гематоэнцефалический барьер и минимизацию риска стимуляции воспалительных побочных реакций. Кроме того, наряду с сохранением специфичности связывания полноразмерных антител, scFv и однодоменные антитела могут быть экспрессированы в виде отдельных генов и внутриклеточно в клетках млекопитающих в виде интрател, открывая возможности для изменения укладки, взаимодействий, модификации или субклеточной локализации их мишеней; обзорная информация приведена, например, в источнике: Miller and Messer, Molecular Therapy 12 (2005), 394-401.

Согласно другому подходу, описанному в источнике: Muller et al., Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241, используется технологическая платформа, так называемая "технология суперантител", которая, как сообщается, позволяет вводить антитела в живые клетки без их повреждения. Такие проникающие в клетки антитела открывают новые диагностические и терапевтические возможности. Для указанных антител был принят термин "моноклональные транстела".

Согласно дополнительному варианту реализации может быть целесообразным совместное введение или последовательное введение других антител, подходящих для лечения заболевания, расстройства или симптомов связанные с возникновением мутированного и/или агрегированного НТТ. Согласно одному варианту реализации указанное дополнительное антитело входит в состав фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры антител, которые могут применяться для лечения

субъекта, включают, не ограничиваясь перечисленными, антитела, нацеленные на CD33, SGLT2, ИЛ-6 и ИЛ-1.

Согласно дополнительному варианту реализации может быть целесообразным совместное введение или последовательное введение других агентов, подходящих для лечения заболевания, расстройства или симптомов, связанных с мутированным и/или агрегированным НТТ. Согласно одному варианту реализации указанный дополнительный агент входит в состав фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры агентов, которые могут применяться для лечения субъекта, включают, не ограничиваясь перечисленными: ингибиторы VMAT2, направленные на произвольные мышечные движения, такие как ксеназин (Xenazine™), противовоспалительные агенты, такие как дифлунизал, кортикостероиды, 2-(2,6-дихлоранилино)фенилуксусная кислота (диклофенак), изобутилфенилпропановая кислота (ибупрофен); диуретики, галлат эпигаллокатехина, гидрохлорид мелфалана, дексаметазон, бортезомиб, бортезомиб-мелфалан, бортезомиб-дексаметазон, мелфалан-дексаметазон, бортезомиб-мелфалан-дексаметазон; антидепрессанты, антипсихотические лекарственные средства, нейролептики, противодementные средства (например, антагонист NMDA-рецепторов мемантин), ингибиторы ацетилхолинэстеразы (например, донепезила гидрохлорид, ривастигмин, галантамин), антагонисты глутаматных рецепторов и другие ноотропные средства, препараты для коррекции кровяного давления (например, дигидралазин, метилдопа), цитостатики, глюкокортикоиды, ингибиторы ангиотензинконвертирующего фермента (АПФ); противовоспалительные агенты или любая их комбинация.

Терапевтически эффективная доза или количество относится к количеству активного ингредиента, достаточному для облегчения симптомов или состояния. Терапевтическая эффективность и токсичность таких соединений может быть определена путем проведения стандартных фармацевтических процедур в клеточных культурах или на экспериментальных животных, например, путем определения ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная для 50% популяции) и LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции). Соотношение доз, оказывающих терапевтический и токсический эффект, представляет собой терапевтический индекс, и может быть представлен как отношение LD₅₀/ED₅₀.

Из сказанного выше очевидно, что настоящим изобретением охвачено любое применение НТТ-связывающей молекулы и/или ее фрагментов, содержащие по меньшей мере одну область CDR вышеописанного антитела, в частности, для диагностики и/или лечения заболевания или расстройства, связанного с мутированными и/или агрегированными видами НТТ, и/или их фрагментами согласно описанию выше, например, БГ и/или НТТ-амилоидоза. Предпочтительно указанная связывающая молекула представляет собой антитело согласно настоящему изобретению или соответствующую ему цепь иммуноглобулина. Кроме того, настоящее изобретение относится к антиидиотипическим антителам к любым из антител, упомянутых выше в настоящем документе. Это антитела или другие связывающие молекулы, которые связываются с уникальной антигенной пептидной последовательностью, расположенной в вариабельной области антитела возле антигенсвязывающего сайта и подходят, например, для детекции антител к НТТ в образце, полученном от субъекта. Согласно одному варианту реализации, соответственно, в настоящем изобретении предложено антитело согласно вышеприведенным и представленным ниже в настоящем документе определениям, или НТТ-связывающая молекула, обладающая по существу такой же специфичностью связывания, что и что-либо из перечисленного, полинуклеотид, вектор или клетка согласно определению в настоящем документе, или фармацевтическая или диагностическая композиция, содержащая что-либо из указанного, для применения в профилактическом лечении, терапевтическом лечении и/или при мониторинге прогрессирования или отклика на лечение заболевания или расстройства, связанного с НТТ, при этом указанное расстройство предпочтительно связано с НТТ-амилоидозом, например, болезнью Гентингтона (БГ).

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к диагностической композиции, содержащей что-либо из вышеописанных НТТ-связывающих молекул, антител, антигенсвязывающих фрагментов, полинуклеотидов, векторов или клеток согласно настоящему изобретению и, необязательно, подходящих средств детекции, таких как реагенты, стандартно применяемые в иммунодиагностике или в способах диагностики на основе нуклеиновых кислот. Антитела согласно настоящему изобретению подходят, например, для применения в иммунологических анализах, где могут использоваться в жидкой фазе или в связанном с твердофазным носителем виде. Примеры иммунологических анализов, в которых может применяться антитело согласно настоящему изобретению, представлены конкурентными и неконкурентными иммунологическими анализами прямого или опосредованного формата. Примеры таких иммунологических анализов представлены радиоиммунологическим анализом (РИА), сэндвич-анализом (иммунометрическим анализом), проточной цитометрией и вестерн-блоттингом. Антитела и антитела согласно настоящему изобретению могут быть связаны с множеством разных носителей и могут применяться для выделения специфически связанных с ними клеток. Примеры хорошо известных носителей включают стекло, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозы, природные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, агарозы и магнетит. Для целей настоящего изобретения носитель может быть растворимым или нерастворимым по природе. Существует множество разных меток и способов мечения, известных специалистам в данной области техники. Примеры типов меток, подходящих для применения в настоящем изобретении

бретении, включают ферменты, радиоизотопы, коллоидные металлы, флуоресцентные соединения, хемилюминесцентные соединения и биолюминесцентные соединения; см. также рассмотренные выше варианты реализации.

Согласно дополнительному варианту реализации НТТ-связывающие молекулы, в частности, антитела согласно настоящему изобретению могут также применяться в способе диагностики заболевания или расстройства у индивидуума, путем получения образца жидкости организма тестируемого индивидуума, который может представлять собой образец крови, образец плазмы, образец сыворотки, образец лимфы или любой другой образец жидкости организма, например, образец слюны или мочи, и приведение указанного образца жидкости организма в контакт с антителом согласно настоящему изобретению в условиях, обеспечивающих образование комплексов антитела с антигеном. Затем определяют уровень содержания таких комплексов с применением способов, известных в данной области техники; при этом уровень, значительно превышающий уровень формирования в контрольном образце, указывает на наличие заболевания или расстройства у тестируемого индивидуума. Таким же образом может применяться и специфический антиген, связываемый антителами согласно настоящему изобретению. Соответственно, настоящее изобретение относится к иммунологическому анализу *in vitro*, задействующему связывающую молекулу, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения НТТ-связывающие молекулы, в частности, антитела согласно настоящему изобретению могут также применяться в способе диагностики у индивидуума заболевания или расстройства путем получения биоптата от тестируемого индивидуума.

В указанном контексте настоящее изобретение также относится к способу, специально разработанному с указанной целью. Например, может использоваться чип на основе антител, который, например, нагружают антителами или эквивалентными антигенсвязывающими молекулами согласно настоящему изобретению, которые специфически распознают НТТ. Обзор дизайна иммунологических анализов с микрочипами приведен в источнике: Kusnezow et al., *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Соответственно, настоящее изобретение также относится к микрочипам, нагруженным НТТ-связывающими молекулами в соответствии с настоящим изобретением.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу диагностики заболевания или расстройства, связанного с мутированными и/или агрегированными видами НТТ, и/или их фрагментами у субъекта, при этом указанный способ включает определение присутствия НТТ, и/или мутированного и/или агрегированного НТТ в образце от субъекта, у которого проводится диагностика, с применением по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению, его связывающего НТТ фрагмента или НТТ-связывающей молекулы, отличающего(ей)ся по существу идентичной чему-либо из перечисленного специфичностью связывания, при этом присутствие патологически мутированного и/или агрегированного НТТ указывает на БГ и/или НТТ-амилоидоз, а повышение уровня содержания патологически мутированного и/или агрегированного НТТ относительно уровня содержания физиологического НТТ указывает на прогрессирование БГ и/или НТТ-амилоидоза у указанного субъекта.

У субъекта, у которого проводится диагностика, может наблюдаться бессимптомное заболевание или доклиническая форма заболевания. Предпочтительно, у контрольного субъекта имеется заболевание, связанное с мутированным и/или агрегированным НТТ, например, болезнь Гентингтона (БГ), при этом уровень патологически мутированного и/или агрегированного НТТ, аналогичный референсному стандарту, указывает на то, что у указанного субъекта будет диагностирован НТТ-амилоидоз или имеется риск развития НТТ-амилоидоза. Согласно альтернативному или дополнительному варианту в качестве второго контрольного субъекта выбирают контрольного субъекта, у которого отсутствует НТТ-амилоидоз, при этом уровень физиологического НТТ и/или мутированного и/или агрегированного НТТ, отличающийся от референсного стандарта, указывает на то, что у указанного субъекта будет диагностирован НТТ-амилоидоз или имеется риск развития НТТ-амилоидоза. Предпочтительно субъект, у которого проводится диагностика, и контрольный(ые) субъект(ы) относятся к одной возрастной группе. Образец для анализа может быть представлен любой жидкостью организма, которая предположительно может содержать патологически мутированный и/или агрегированный НТТ, например, кровью, плазмой крови, сывороткой крови, мочой, перитонеальной жидкостью, слюной или спинномозговой жидкостью (СМЖ). Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложенные в изобретении антитела могут применяться при детекции растворимого и агрегированного НТТ посредством, например, дуплексного иммунологического анализа на основе резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (TR-FRET) согласно описанию в источнике: Baldo et al., *Chem. Biol.* 19(2) (2012), 264-275, содержание которого, в частности, экспериментальные процедуры на стр. 273-274, включено в настоящий документ.

Кроме того, как было описано, например, в источнике Ren et al., *Nature Cell Biol.* 11 (2) (2009), 219-225, клетки млекопитающих способны интернализировать фибриллярные полиглутаминовые пептидные агрегаты в культуре, которые попадают в цитозольный компартмент и секвестрируются в агрегосомы совместно с компонентами убиквитин-протеасомной системы и цитоплазматическими шаперонами. Ука-

занные интернализированные фибриллярные агрегаты были способны селективно рекрутировать растворимые цитоплазматические белки и обуславливать наследуемый фенотип клеток, экспрессирующих гомологичный амилоидогенный белок из хромосомного локуса. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к НТТ способно уменьшать внеклеточное распространение или транснейронное распространение "токсических" видов НТТ, как показано Pecho-Vriesling et al. Nat. Neurosci. (2014) doi:10.1038/nn.3761 для гентингина или других белков, вовлеченных в нейродегенерацию, таких как α -синуклеин; см. например Guo et al., Nat Med. 20(2) (2014), 130-138.

Уровень физиологического НТТ, и/или патологически мутированного и/или агрегированного НТТ может оцениваться в применении любого подходящего известного в данной области техники способа, включая, например, анализ НТТ с применением одной или большего числа техник, выбранных из вестерн-блоттинга, иммунопреципитации, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммунологического анализа (РИА), сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), двумерного гель-электрофореза, масс-спектрометрии (МС), матричной лазерной десорбции/ионизации - времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF), усиленной поверхностью времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбционной ионизацией (SELDI-TOF), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC), многомерной жидкостной хроматографии (ЖХ) с последующей tandemной масс-спектрометрией (МС/МС) и лазерной денситометрией. Предпочтительно, указанная *in vivo* визуализация НТТ включает сцинтиграфию, позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭТ), оптическую визуализацию в ближней инфракрасной области спектра (NIR) или магнитно-резонансную визуализацию (МРТ).

Согласно одному варианту реализации, соответственно, предложено антитело согласно настоящему изобретению или НТТ-связывающая молекула, отличающаяся по существу идентичной чему-либо из перечисленного специфичностью связывания, полинуклеотид, вектор или клетка согласно определению выше в настоящем документе, или фармацевтическая или диагностическая композиция, содержащая что-либо из перечисленного для применения при профилактическом лечении, терапевтическом лечении и/или мониторинге прогрессирования или отклика на лечение заболевания или расстройства, связанного с НТТ. Соответственно, настоящее изобретение также относится в общем к способу диагностики или мониторинга прогрессирования заболевания или расстройства, связанного с НТТ (такого как НТТ-амилоидоз), у субъекта, при этом указанный способ включает определение присутствия НТТ в образце от субъекта у которого проводится диагностика с применением по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению или НТТ-связывающей молекулы, отличающейся по существу идентичной чему-либо из перечисленного специфичностью связывания, при этом присутствие мутированных, с неправильной укладкой и/или агрегированных видов НТТ или их фрагментов указывает на заболевание или расстройство. Согласно одному варианту реализации предложен способ диагностики или мониторинга прогрессирования НТТ-амилоидоза у субъекта, включающий определение присутствия мутированного и/или агрегированного НТТ, и/или его фрагментов в образце от субъекта, у которого проводится диагностика с применением по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению или НТТ-связывающей молекулы, отличающейся по существу идентичной чему-либо из перечисленного специфичностью связывания, при этом присутствие мутированного и/или агрегированного НТТ и/или его фрагмента указывает на предсимптоматический, продромальный или клинический НТТ-амилоидоз, повышение уровня агрегатов НТТ по сравнению с уровнем физиологического НТТ или по сравнению с референсным образцом, происходящим от здорового контрольного субъекта, или контрольным образцом от того же субъекта, указывает на прогрессирование предсимптоматического, продромального или развившегося НТТ-амилоидоза. Любому специалисту в данной области техники будет понятно, что согласно одному варианту реализации указанный способ также применяют для диагностики или мониторинга прогрессирования любого другого заболевания или расстройства из группы расстройств, связанных с НТТ, согласно определению выше в настоящем документе.

Как отмечалось выше, антитела согласно настоящему изобретению, их фрагменты и молекулы, отличающиеся такой же специфичностью связывания, что и указанные антитела и их фрагменты, могут применяться не только *in vitro*, но также и *in vivo*, причем помимо диагностического применения могут также осуществляться варианты терапевтического применения. Согласно одному варианту реализации, соответственно, настоящее изобретение также относится к НТТ-связывающей молекуле, содержащей по меньшей мере одну область CDR антитела согласно настоящему изобретению, для получения композиции для детекции *in vivo* или нацеливания терапевтического и/или диагностического агента на НТТ в организме человека или животного. Потенциальные терапевтические и/или диагностические агенты могут быть выбраны из неисчерпывающих перечней терапевтических агентов, подходящих для лечения НТТ-амилоидоза, и потенциальных меток согласно описанию выше. Что касается визуализации *in vivo*, согласно одному предпочтительному варианту реализации в настоящем изобретении предложена указанный НТТ-связывающая молекула, содержащая по меньшей мере одну область CDR антитела согласно настоящему изобретению, причем визуализация *in vivo* включает сцинтиграфию, позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭТ), оптическую ви-

зуализацию в ближней инфракрасной области спектра (NIR) или магнитно-резонансную визуализацию (МРТ). Согласно дополнительному варианту реализации в настоящем изобретении также предложена указанная НТТ-связывающая молекула, содержащая по меньшей мере одну область CDR антитела согласно настоящему изобретению, или указанная молекула для получения композиции для описанных выше способов визуализации *in vivo*, для применения в способе диагностики или мониторинга у субъекта прогрессирования заболевания или расстройства, связанного с НТТ, согласно определению выше в настоящем документе.

VII. Пептиды со специфическими для агрегатов НТТ эпитопами

Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к пептидам, содержащим эпитоп богатой полипролином области НТТ, специфически распознаваемый любым антителом согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, такой пептид содержит или состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID No.: 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 155, 156, 139, 151, 154, 158, 161, 157, 159, 160, в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом, или его модифицированной последовательности, в которой одна или большее число аминокислот заменены, удалены и/или добавлены, причем указанный пептид распознается любым антителом согласно настоящему изобретению, предпочтительно антителом NI-302.74C11, NI-302.15F9, NI-302.39G12, NI-302.11A4, NI-302.22H9, NI-302.37C12, NI-302.55D8, NI-302.78H12, NI-302.71F6, NI-302.33C11, NI-302.44D7, NI-302.7A8, NI-302.3D8, NI-302.46C9, NI-302.11H6, NI-302.18A1, NI-302.52C9 и/или NI-302.8F1.

Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к пептидам, содержащим эпитоп богатой пролином области НТТ, специфически распознаваемый любым антителом согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, такой пептид содержит или состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID No: 140, 141, 142, 143, 200, в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом, или его модифицированной последовательности, в которой одна или большее число аминокислот заменены, удалены и/или добавлены, причем указанный пептид распознается любым антителом согласно настоящему изобретению, предпочтительно антителом NI-302.63F3, NI-302.31F11, NI-302.2A2, NI-302.15D3 и/или NI-302.64E5.

Кроме того, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к пептидам, содержащим эпитоп С-концевой области НТТ, специфически распознаваемый любым антителом согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, такой пептид содержит или состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 145 или SEQ ID NO: 202, в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом, или его модифицированной последовательности, в которой одна или большее количество аминокислот заменены, удалены и/или добавлены, причем указанный пептид распознается любым антителом согласно настоящему изобретению, предпочтительно антителом NI-302.35C1 или NI-302.72F10.

Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к пептидам, содержащим эпитоп N-концевой области НТТ, специфически распознаваемый любым антителом согласно настоящему изобретению. Предпочтительно такой пептид содержит или состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 144, в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом, или его модифицированной последовательности, в которой одна или большее число аминокислот заменены, удалены и/или добавлены, причем указанный пептид распознается любым антителом согласно настоящему изобретению, предпочтительно антителом NI-302.15E8.

Кроме того, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к пептидам, содержащим эпитоп богатой Q/P области НТТ, специфически распознаваемый любым антителом согласно настоящему изобретению. Предпочтительно такой пептид содержит или состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 201, в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом, или его модифицированной последовательности, в которой одна или большее количество аминокислот заменены, удалены и/или добавлены, причем указанный пептид распознается любым антителом согласно настоящему изобретению, предпочтительно антителом NI-302.7D8.

Кроме того, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к пептидам, содержащим эпитоп НТТ, специфически распознаваемый любым антителом согласно настоящему изобретению, предпочтительно антителом NI-302.6N9, NI-302.12H2, NI-302.8M1 и/или NI-302.4A6, в котором одна или большее число аминокислот заменены, удалены и/или добавлены, причем указанный пептид распознается любым антителом согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения такой пептид может применяться для диагностики или мониторинга заболевания или расстройства, связанного с мутированными видами НТТ, видами НТТ с неправильной укладкой и/или агрегированными видами НТТ, и/или их фрагментами у субъекта, например БГ и/или НТТ-амилоидозом, в том числе для этапа определения присутствия антитела, которое связывается с пептидом в биологическом образце от указанного субъекта, и для применения при диагностике такого заболевания у указанного субъекта путем измерения уровней антител, распознающих вышеописанный пептид согласно настоящему изобретению и сравнения результатов указанных измерений с уровнями, обнаруживаемыми у здоровых субъектов соответствующего возраста и пола. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу диаг-

Лучшее понимание может быть достигнуто путем обращения к представленным ниже конкретным примерам, приведенным в настоящем описании исключительно с иллюстративной целью и не предназначенных для ограничения объема настоящего изобретения.

Пример 1. Выделение и идентификация антител к НТТ

Пример 2. Определение последовательности антител

Кратко, комбинацию праймеров, соответствующих последовательностям всех семейств иммуноглобулинов репертуара зародышевой линии человека, использовали амплификации лидерных пептидов, V-сегментов и J-сегментов. Первый раунд амплификации проводили с применением специфических в отношении лидерных пептидов праймеров на 5'-конце, и специфических в отношении константных областей праймеров на 3'-конце (Smith et al., Nat Protoc. 4 (2009), 372-384). Для тяжелых цепей и легких каппа-цепей второй раунд амплификации проводили с применением специфических в отношении V-сегмента праймеров на 5'-конце и специфических в отношении J-сегмента праймеров на 3'-конце. Для легких лямбда-цепей второй раунд амплификации проводили с применением специфических в отношении V-сегмента праймеров на 5'-конце и специфических в отношении C-области праймера на 3'-конце (Marks et al., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597; de Haard et al., J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230).

- 75 -

ния переменных последовательностей тяжелой и легкой цепей в экспрессионные векторы с антителом. Тяжелые цепи иммуноглобулинов экспрессировали путем встраивания продукта ОТ-ПЦР тяжелой цепи иммуноглобулина внутрь рамки в экспрессионный вектор тяжелой цепи, несущий сигнальный пептид и константные домены иммуноглобулина гамма 1 человека или мыши. Легкие каппа-цепи иммуноглобулинов экспрессировали путем встраивания продукта ОТ-ПЦР легкой каппа-цепи внутрь рамки в экспрессионный вектор легкой цепи, обеспечивающий сигнальный пептид и константный домен легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека. Легкие ламбда-цепи иммуноглобулинов экспрессировали путем встраивания продукта ОТ-ПЦР легкой ламбда-цепи внутрь рамки в экспрессионный вектор легкой ламбда-цепи, обеспечивающий сигнальный пептид и константный домен легкой ламбда-цепи иммуноглобулина человека или мыши.

Функциональные рекомбинантные моноклональные антитела получали при совместной трансфекции клеток НЕК 293 или СНО (или любой другой подходящей линии реципиентных клеток, происходящих от человека или мыши) экспрессионным вектором с тяжелой цепью Ig и экспрессионным вектором с легкой цепью Ig каппа или ламбда. Затем рекомбинантное моноклональное антитело человека выделяли из кондиционированной среды путем стандартного очищения на колонке с белком А. Рекомбинантное моноклональное антитело человека может быть получено в неограниченных количествах с использованием транзистентно или стабильно трансфицированных клеток. Устойчивые линии клеток, продуцирующие рекомбинантное моноклональное антитело человека, могут быть получены либо непосредственно с применением несущих Ig экспрессионных векторов, либо путем повторного клонирования переменных областей Ig в различные экспрессирующие векторы. Из указанных переменных областей Ig могут также быть получены производные, такие как F(ab), F(ab)₂ и scFv. Каркасные и определяющие комплементарность области определяли путем сравнения с последовательностями референсного антитела, доступными в базах данных, таких как Abysis (<http://www.bioinf.org.uk/abysis/>) и <http://www.imgt.org/>, и аннотировали с применением системы нумерации Kabat (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

Пример 3. Экспрессия белков НТТ, кодированных экзоном 1

Способы

Для экспрессии и очищения рекомбинантных белков гентингина, кодированных экзоном 1 GST-HttExon1Q21 (GST-HD21), GST-HttExon1-Q35 (GSTHD35) и GST-HttExon1-Q49 (GST-HD49) экспрессионный вектор pGEX-6P-1 (GE Healthcare), кодирующий экзон 1 гентингина человека с полиглутаминовыми трактами длиной 21, 35 или 49 CAG повторов, соответственно (ср. фиг. 2А), соединенный с применением сайта расщепления PreScission с N-концевой глутатион-S-трансферазой (GST) меткой, экспрессировали в клетках E.coli штамма BL21. Инкубированные в течение ночи бактериальные культуры (37°C, 220 об/мин) разводили 1:25 и индуцировали экспрессию при OD₆₀₀ 0,5-0,6 в течение 4 ч путем добавления 1 mM ИПТГ (Sigma I1284) и дополнительной инкубации при 36°C, 220 об/мин. Культуры росли на среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина при 37°C, для инкубированных в течение ночи культур с добавлением дополнительно 1% глюкозы. Рекомбинантные белки GST-HttExon1 очищали посредством связывания с глутатион-агарозой (Sigma G4510). Вкратце, бактериальный осадок ресуспендировали в 20-40 мл холодного буфера 1 (50 mM NaH₂PO₄, 5 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТК pH8, лизоцим до конечной концентрации 5 мг/мл, полный набор ингибиторов протеаз (Roche)), инкубировали в течение 60 мин на льду, обрабатывали ультразвуком, добавляли Triton-X100 (конечная концентрация 0,1%) и центрифугировали в течение 90 мин при 14 000 g после инкубации на льду в течение 5 мин. В супернатант добавляли глутатион-агарозу, инкубировали в течение 2 ч при 4°C, осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1000 g и 2-кратно промывали холодным ФСБ после удаления супернатанта. Элюирование проводили в течение 5 мин в 1 мл буфера 1 с 10 mM восстановленного глутатиона, pH 9. Указанный этап повторяли от 5 до 15 раз до тех пор, пока белок не переставал элюировать. Объединенные супернатанты диализовали в буфер (50 mM Tris, pH7,4, 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТК, 1% глицерин) в течение ночи (НОММ 10 кДа, Pierce); аликвоты помещали на хранение при -80°C.

ДСН-ПААГ-анализ

Очищенные рекомбинантные белки GST-HttEx1 выделяли путем проведения через градиент ДСН-ПААГ (NuPAGE Bis-Tris 4-12%; Invitrogen, Базель, Швейцария) с последующим окрашиванием кумасси бриллиантовым синим, или электроблоттингом на нитроцеллюлозных мембранах. Блоты инкубировали с первичными антителами Mab 5492 (Chemicon, N-концевой эпитоп AK1-82, богатый пролином домен) или NI-302.37C12, а затем с вторичным конъюгированным с HRP антителом козы против IgG мыши или вторичным конъюгированным с HRP антителом ослы против IgG человека. Блоты проявляли с применением ECL и системы детекции ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Швейцария).

Как показано на фиг. 2В, разные рекомбинантные белки GST-HttEx1 были успешно экспрессированы и очищены, как показывает окрашивание красителем кумасси после проведения ДСН-ПААГ-электрофореза.

Пример 4. Определение статуса агрегации с применением дот-блоттинга и метода задержки на фильтре

Для определения кинетики агрегации белков HD21, HD35 и HD49 осуществляли анализ с применением методов задержки на фильтре и дот-блоттинга.

Соответственно, сначала проводили реакцию агрегации следующим образом: Рекомбинантные белки GST-HttExon1 могут быть экспрессированы и очищены в виде гибридного белка. После отщепления GST-метки от гибридного белка протеазой PreScission (PP) немедленно начинается реакция агрегации белка гентингтина, кодированного экзоном 1. До начала реакций белки GST-HttExon1 центрифугировали при 100 000 g в течение 30 мин. Осветленный белковый раствор разводили до концентрации белка 2 мкМ в холодном буфере для агрегации (0,05 M Tris/HCL, pH7, 0,15 M NaCl, 1 mM ЭДТК) и добавляли 1 mM ДТТ и протеазы PreScission (GE Healthcare). Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре с вращением при 300 об/мин; реакции агрегации останавливали мгновенным замораживанием при -80°C через заданные временные интервалы. После инкубации в течение 1, 3, 5, 7 и 24 ч извлекали аликваты продуктов реакций агрегации HD21, HD35 и HD49, соответственно, мгновенно замораживали на сухом льду и хранили при -80°C.

Для анализа методом дот-блоттинга образцы размораживали на льду, разводили и переносили на нитроцеллюлозную блоттинг-мембрану при помощи фильтрующего устройства, задействующего вакуум в камере под мембраной. С указанной целью мембрану уравнивали ФСБ, устанавливали в камере и промывали 100 мкл ФСБ на лунку. Загружали образцы и полностью протягивали через мембрану с последующим 3-кратным промыванием ФСБ. Устройство разбирали, мембрану быстро просушивали на воздухе в течение 15 мин при комнатной температуре, блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре блокирующим буфером (3% БСА, 0,1% Tween 20 в ФСБ-буфере) и инкубировали с поликлональным антителом HD-1 (1:10 000, любезно предоставлено проф. Э. Уонкером (Prof. E. Wanker), MDC, Берлин). После промывания мембрану инкубировали в течение 1 ч при КТ с антителом против IgG кролика, конъюгированным с HRP, и блоты проявляли с применением ECL и системы детекции ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Швейцария).

Как показывают результаты дот-блоттинга, приведенные на фиг. 2С, слева, поликлональное антитело HD-1 детектировало белки HD21, HD35 и HD49 независимо от статуса агрегации.

Для проведения анализов методом задержки на фильтре образцы размораживали на льду, разводили в денатурирующем буфере (4% ДСН, 100 mM ДТТ) и переносили через ацетатцеллюлозную мембрану с размером пор 0,2 мкм с применением вакуум-камеры. С указанной целью мембрану уравнивали в 0,1% растворе ДСН в ФСБ, устанавливали на вакуум-камеру и промывали лунки 0,1% ДСН. Добавляли образцы, фильтровали через мембрану с применением вакуума и 3-кратно промывали 0,1% ДСН. Затем мембрану извлекали из камеры, быстро просушивали на воздухе, блокировали в течение 1 ч при КТ в блокирующем буфере (5% молока, 0,1% Tween 20 в ФСБ-буфере), инкубировали с поликлональным антителом HD-1 (1:5000, Scherzinger et al., Cell 90 (1997), 549-558) и дополнительно обрабатывали согласно описанию выше.

В анализе методом задержки на фильтре первые агрегаты, удерживаемые на мембране, были детектированы через 24 ч инкубации и представляли собой HD35. Белки HD49 с удлинением за счет полиглутаминового тракта образуют нерастворимые агрегаты уже через 3 ч после отщепления GST-метки, см. фиг. 2С справа (FRA).

Пример 5. Определение характеристик агрегатов гентингтина, кодированного экзоном 1

Для верификации и описания образования агрегатов HD35 и HD49, кодированных экзоном 1 использовали электронную микроскопию (ЭМ). Вкратце, продукты реакций агрегации HD49 через 1, 3 и 24 ч соответственно, или образцы HD35 через 24 ч анализировали с применением электронной микроскопии. Образцы адсорбировали на медных сетках с угольной пленкой в условиях тлеющего разряда. Избыток образцов удаляли фильтровальной бумагой. Сетки окрашивали 2% (мас./об.) уранилацетатом в течение 1 мин, избыток уранилацетата смывали дистиллированной деионизованной водой. Сетки высушивали на воздухе и визуализировали с применением просвечивающего электронного микроскопа Philips CM100 с ускоряющим напряжением 100 кВ.

ЭМ-анализ реакции агрегации HD35 выявил агрегаты большего размера, видимые при ЭМ, напоминающие протофибриллярные структуры, через 24 ч инкубации (фиг. 2D [E]). HD49 демонстрировал более быструю кинетику агрегации с появлением детектируемых фибрилл уже через 1 ч инкубации (фиг. 2D [F]), и увеличением размеров и числа фибрилл в ходе агрегации со временем (фиг. 2D [C, D, G, H]). Указанные наблюдения согласуются с результатами, полученными в ходе анализов методом задержки на фильтре, где агрегаты, имеющие размер более 0,2 мкм, задерживаются на ацетатцеллюлозной мембране, и подтверждают успешное образование агрегатов гентингтина, кодированного экзоном 1; см. также пример 4.

Пример 6. Аффинность антитела NI-302.33C11 по отношению к связыванию полипролинового домена с применением прямого ИФА (ELISA) и определение EC₅₀

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀) рекомбинантного происхождения от человека антитела к НТТ NI-302.33C11 для растворимых и агрегированных белков гентингтина, кодированных экзоном 1 с 21 или 49 полиглутаминовыми повторами проводили прямой анализ ИФА (ELISA). Вкратце, 96-луночные микропланшеты (Corning) покрывали GST-HD21, GST-HD49 или агрегированным HD21 или HD49 в концентрации 5 мкг/мл в покрывающем буфере (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH9,42). Неспецифические связывающие сайты блокировали в течение 1 часа при КТ раство-

ром ФСБ/0,1% Tween®-20, содержащим 2% БСА (Sigma-Aldrich, Букс, Швейцария). Первичные антитела разводили до заданных концентраций и инкубировали в течение 1 ч при КТ. Связывание определяли с применением либо конъюгированного с HRP Fcγ-специфического антитела осел против IgG человека, либо конъюгированного с HRP (H+L)-специфического антитела козы против IgG мыши, с последующим измерением активности HRP в стандартном колориметрическом анализе. Затем с применением нелинейной регрессии вычисляли значения EC₅₀, используя программное обеспечение GraphPad Prism (Сан-Диего, США).

Значения EC₅₀ происходящего от человека антитела к НТТ NI-302.33C11 для агрегированных и растворимых белков Htt, кодированных экзоном 1 с 21 или 49 полиглутаминовыми повторами определяли с применением прямого ИФА (ELISA) при покрытии различными составами в концентрации 5 мкг/мл. Как показано на фиг. 3А и В, антитело NI-302.33C11 связывалось с аналогичной высокой аффинностью со всеми четырьмя видами, включая патологические агрегированные Htt, кодированные экзоном 1 HD49, со значениями EC₅₀, составляющими приблизительно 100 пМ.

Пример 7. Оценка селективности связывания антител к НТТ с применением дот-блоттинга и анализа методом задержки на фильтре

Для описания связывания рекомбинантного происходящего от человека антитела к НТТ NI-302.33C11 с растворимыми и агрегированными белками гентингина, кодированными экзоном 1 с 21, 35 или 49 полиглутаминовыми повторами осуществляли анализ методом задержки на фильтре и анализ методом дот-блоттинга. С указанной целью аликвоты продуктов реакций агрегации HD21, HD35 и HD49 согласно описанию в примере 4 извлекали через 1, 3, 5, 7 и 24 ч инкубации, мгновенно замораживали на сухом льду и помещали на хранение при -80°C; дот-блоттинг выполняли согласно описанию в примере 4. Анализ методом задержки на фильтре также проводили согласно описанию в примере 4, за исключением того, что мембрану инкубировали с NI-302.33C11 (1 мкг/мл).

Можно отметить, что в анализе методом дот-блоттинга (фиг. 3С, слева) антитело NI-302.33C11 преимущественно детектирует белки гентингина, удлиненные за счет полиглутаминовых (поли-Q) трактов (HD49>>HD35>HD21). Кроме того, интенсивность сигнала возрастала при увеличении продолжительности инкубации продуктов реакций агрегации HD35 и HD49.

То же самое справедливо и для результатов, полученных в анализе методом задержки на фильтре (фиг. 3С, справа), показавшем, что NI-302.33C11 детектирует агрегаты HD35 и HD49, задерживавшиеся на мембране с размером пор 0,2 мкм. Эти результаты, основанные на спотах с белковыми составами, предполагают, что антитело NI-302.33C11 предпочтительно связывает агрегированные конформеры НТТ с патогенными полиглутаминовыми удлинениями.

Пример 8. Специфичность связывания и селективность антител к НТТ в отношении нерелевантных агрегирующих белковых мишеней с применением прямого ИФА (ELISA)

Для определения специфичности связывания рекомбинантного антитела NI-302.33C11, связывающегося с полипролиновой областью НТТ и не связывающегося с нерелевантными агрегирующими белковыми мишенями, проводили прямой ИФА (ELISA) в 96-луночных микропланшетах (Corning), покрытых разными целевыми белками в концентрации 1-10 мкг/мл в покрывающем буфере (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,42). Сайты неспецифического связывания блокировали в течение 1 ч при КТ раствором ФСБ/0,1% Tween®-20, содержащим 2% БСА (Sigma-Aldrich, Букс, Швейцария). Антитело NI-302.33C11 разбавляли до заданных концентраций и инкубировали в течение 1 ч при КТ. Связывание определяли с применением конъюгированного с HRP специфического антитела осла против Fcγ IgG человека с последующим измерением активности HRP в стандартном колориметрическом анализе. Сигналы для целевого белка рассчитывали в виде кратности увеличения относительно медианного сигнала.

Можно отметить, что происходящее от человека антитело NI-302.33C11 специфически связывает НТТ, а именно, агрегированный HD49, при отсутствии связывания других нерелевантных белковых мишеней, в том числе известных амилоидобразующих белков, см. фиг. 16А.

Пример 9. Определение связывающего эпитопа антитела к НТТ NI-302.33C11

Для картирования эпитопа гентингина (НТТ), распознаваемого происходящим от человека антителом NI-302.33C11, выполняли картирование эпитопов с применением анализа методом пептидного сканирования с синтетическими пептидами. Вкратце, для картирования эпитопов использовали пептидное сканирование перекрывающихся пептидов. Последовательность НТТ, кодированного экзоном 1 человека, синтезировали в виде 16 линейных 15-мерных пептидов с перекрывающимися в индивидуальных пептидах отрезками из 10 аминокислот (JPT Peptide Technologies, Берлин, Германия) и наносили на нитроцеллюлозные мембраны. Мембрану активировали в течение 5 минут в метаноле и затем промывали при КТ в TBS в течение 10 мин. Сайты неспецифического связывания блокировали в течение 2 ч при комнатной температуре в Roti®-Block (Carl Roth GmbH+Co. KG, Карлсруэ, Германия). Антитело человека NI-302.33C11 (1 мкг/мл) инкубировали в течение 3 ч при КТ в Roti®-Block. Связывание первичного антитела определяли с применением конъюгированного с HRP вторичного антитела осла против IgG человека. Блоты проявляли с применением ECL и системы детекции ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Швейцария).

Как показано на фиг. 4, наблюдалось ярко выраженное связывание NI-302.33C11 с пептидами № 7, № 8, № 9, № 13 и № 14, что указывает на локализацию эпитопа, распознаваемого указанным антителом, в домене гентингтина с полипролиновыми повторами. Связывающий эпитоп антитела NI-302.33C11, соответственно, согласно прогнозу локализован в пределах аминокислот НТТ 35-PPPPPPPP-42 (SEQ ID No: 139) и аминокислот 63-PPPPPPPPPP-72 (SEQ ID No: 162).

Пример 10. Картирование эпитопов посредством связывания антитела к НТТ NI-302.33C11 с разными пептидами, кодированными экзоном 1, с применением прямого ИФА (ELISA)

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) рекомбинантного происхождения от человека антитела к НТТ NI-302.33C11 для конъюгированных с БСА пептидных фрагментов гентингтина, кодированных экзоном 1 проводили прямой ИФА (ELISA) с конъюгированными с БСА пептидами доменов Htt, кодированного экзоном 1.

Вкратце, 96-луночные микропланшеты (Corning) покрывали конъюгированными с БСА синтетическими пептидами (Schafer-N, Дания), содержащими N-концевые аминокислоты 1-19 (MATLEKLMKAF-ESLKSFQQ, SEQ ID No: 93), последовательность богатого пролином домена (PPQLPQPPQAQPLLPQPP, SEQ ID No: 94), последовательность полипролиновых повторов (PPPPPPPPPP, SEQ ID No: 95) или 14 C-концевых аминокислот (PPGPAVAEEPLHRP, SEQ ID No: 96); либо полноразмерными белками GST-HD49Exon1 в концентрации 5 мкг/мл в покрывающем буфере (15 mM Na_2CO_3 , 35 mM $NaHCO_3$, pH 9,42). Сайты неспецифического связывания блокировали в течение 1 часа при КТ раствором ФСБ/0,1% Tween®-20, содержащим 2% БСА (Sigma-Aldrich, Букс, Швейцария). Первичные антитела разводили до заданных концентраций и инкубировали в течение 1 ч при КТ. Связывание определяли с применением Fcy-специфического антитела ослика против IgG человека, конъюгированного с HRP, с последующим измерением активности HRP в стандартном колориметрическом анализе; значения EC_{50} вычисляли с применением нелинейной регрессии, используя программное обеспечение GraphPad Prism (Сан-Диего, США).

Как показано на фиг. 5, NI-302.33C11 связывалось с высокой аффинностью с конъюгированным с БСА полипролиновым пептидам, а также с полноразмерным GST-HD49 при эквивалентных значениях EC_{50} , составляющих 30 пМ. Указанные результаты подтверждают результаты картирования эпитопов на полипролиновую последовательность согласно примеру 9.

Пример 11. Оценка чистоты и целостности рекомбинантного антитела человека NI-302.33C11 к полипролиновому домену

Для оценки чистоты и целостности рекомбинантного антитела человека NI-302.33C11 к полипролиновому домену экспрессировали первичное антитело человека NI-302.33C11 к полипролиновому домену путем транзientной трансфекции клеток CHO-S и проводили аффинное очищение с белком А в системе Акта. После обессоливания на колонке PD-10 антитело разводили в ФСБ. Затем выполняли ДСН-ПААГ-анализ, при этом получали 2 и 10 мкг очищенного рекомбинантного антитела человека NI-302.33C11 к полипролиновому домену в восстановительных условиях в градиенте концентраций ДСН-ПААГ (гель NuPAGE 4-12% Bis-Tris; Invitrogen) с последующим окрашиванием Кумасси (SimplyBlue SafeStain, Invitrogen).

При ДСН-ПААГ-анализе рекомбинантного первичного антитела человека NI-302 к полипролиновому домену в восстановительных условиях выявляются две основных полосы, соответствующие тяжелым и легким цепям антитела ожидаемого размера, как показано на фиг. 6, при этом не было детектировано значимых загрязняющих примесей или продуктов протеолитического разложения.

Пример 12. Определение характеристик антитела к НТТ NI-302.33C11 у трансгенных мышей, экспрессирующих НТТ человека

Для оценки связывания антитела NI-302.33C11 с патологическим гентинггином в тканях головного мозга трансгенных по НТТ человека мышей выполняли иммуногистохимическое исследование. Линия трансгенных мышей B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J (Mangiarini et al., Cell 87 (1996), 493-506) представляет собой хорошо описанную модель болезни Гентингтона (БГ) на мышах. Начиная с возраста приблизительно 9 недель у животных в указанной модели развивается прогрессирующая патология, характеризующаяся внутриядерными включениями гентинггина, что напоминает болезнь Гентингтона у человека (Naver et al., Neuroscience 122 (2003), 1049-1057). Полушария мозга указанных трансгенных мышей B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J на прогрессивной стадии заболевания (270 дней) фиксировали в забуференном фосфатом 4% раствор параформальдегида, заливали парафином и изготавливали срезы толщиной 5 мкм. После предварительной обработки муравьиной кислотой и цитратным буфером срезы инкубировали с 1, 5 или 50 нМ антитела человека NI-302.33C11 к НТТ с последующей инкубацией с биотинилированным вторичным антителом ослика против антитела человека (Jackson Immunoresearch; 1:250). Сигнал от антител усиливали с применением набора Vectastain ABC (Vector Laboratories) и детектировали с использованием диаминобензидина (Pierce).

Как показано на фиг. 27, происходящие от человека антитела NI-302.33C11 к полипролиновому домену обеспечивало очень ярко выраженное окрашивание патологических внутриядерных включений нейронов уже при минимальной концентрации, составляющей 1 нМ (фиг. 27 [Е-Н]), что согласуется с

высокой аффинностью связывания агрегатов гентингина по оценке с применением ИФА (ELISA) и дот-блоттинга. В концентрации, составляющей 5 нМ или более, указанное антитело дополнительно полностью окрашивало средние шипиковые нейроны и обеспечивало более генерализованное диффузное окрашивание, также детектируемое на срезах головного мозга нетрансгенных животных. Наличие определенной степени перекрестной реактивности исключать нельзя, поскольку полипролиновый эпитоп, на который нацелено NI-302.33C11, присутствовал также на многочисленных нерелевантных белках (фиг. 27 [F-H]).

Пример 13. Определение аффинности связывания и селективности антитела к богатому пролином домену NI-302.63F3 с применением прямого ИФА (ELISA), и определение EC₅₀

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀) рекомбинантного происхождения от человека антитела к НТТ NI-302.63F3 для растворимых и агрегированных белков Htt, кодированных экзоном 1 с 21 или 49 полиглутаминовыми повторами, проводили прямой ИФА (ELISA) и определяли EC₅₀ согласно описанию в примере 6, выше.

Можно отметить, что NI-302.63F3 связывается с аналогичной высокой аффинностью со всеми четырьмя видами, в том числе с агрегированным Htt, кодированным экзоном 1 HD49, со значениями EC₅₀, составляющими от приблизительно 200 до 400 пМ (фиг. 7А и В). Соответственно, происходящее от человека НТТ антитело к богатому пролином домену NI-302.63F3 нацелено на эпитоп, экспонируемый на агрегированном, а также на неусеченном, с более линейной структурой белке НТТ, кодированном экзоном 1 с высокой аффинностью в субнанолярном диапазоне.

Кроме того, для определения связывания рекомбинантного происхождения от человека антитела к НТТ NI-302.63F3 с растворимыми и агрегированными белками Htt, кодированными экзоном 1 с 21, 35 или 49 полиглутаминовыми повторами, проводили анализ методом задержки на фильтре и дот-блоттинг согласно описанию в примере 7, выше, с незначительной модификацией: инкубирование проводили с 1 мкг/мл антитела NI-302.63F3.

В анализе методом дот-блоттинга антитело NI-302.63F3 наиболее выраженно детектировало белок HD49 с удлинением за счет полиглутаминового тракта (фиг. 7С, левая часть). В анализе методом задержки на фильтре NI-302.63F3 детектировало агрегаты HD35 и HD49, остающиеся на мембране с размером пор 0,2 мкм (фиг. 7С, правая часть). Эти результаты, основанные на спотах с белковыми составами, демонстрируют, что антитело NI-302.63F3 распознает агрегированные конформеры НТТ с патогенными полиглутаминовыми удлинениями.

Кроме того, для определения связывания рекомбинантного антитела NI-302.63F3 с нерелевантными агрегирующими белковыми мишенями проводили прямой ИФА (ELISA) согласно описанию в примере 8, выше. Как показано на фиг. 16В, происходящее от человека NI-302.63F3 специфически связывалось с НТТ, тогда как связывания с нерелевантными белками не наблюдалось.

Пример 14. Определение связывающего эпитопа антитела к НТТ NI-302.63F3

Для картирования эпитопа гентингина, распознаваемого происходящим от человека антителом NI-302.63F3, выполняли картирование эпитопов на синтетических пептидах согласно описанию выше в примере 9.

Как показано на фиг. 8, наблюдалось ярко выраженное связывание NI-302.63F3 с пептидами №10 и №11, и слабый сигнал для пептидов № 8 и № 9, что указывает на локализацию эпитопа, распознаваемого указанным антителом, в богатом пролином домене (между областями с полипролиновыми повторами) НТТ. Соответственно, согласно прогнозу связывающий эпитоп для NI-302.63F3 локализован в последовательности аминокислот НТТ 43-(PPRQL)PQPPRQAQPL-57 (SEQ ID No: 161 и 140).

Пример 15: Картирование эпитопов с применением прямого ИФА (ELISA) на связывание с разными пептидами, кодированными экзоном 1 антитела к НТТ NI-302.63F3

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀) рекомбинантного происхождения от человека антитела к НТТ NI-302.63F3 для конъюгированных с БСА пептидных фрагментов гентингина, кодированных экзоном 1, осуществляли прямой ИФА-анализ ELISA с конъюгированными с БСА пептидным доменом Htt, кодированным экзоном 1, и определение EC₅₀ согласно описанию в примере 10.

Как показано на фиг. 9, NI-302.63F3 связывается с высокой аффинностью с конъюгированным с БСА богатым пролином пептидным доменом, а также с полноразмерным GST-HD49 с аналогичными показателями EC₅₀, составляющими от 200 до 300 пМ. Это подтверждает определенную путем картирования эпитопов локализацию в последовательности богатого пролином домена, как показано в примере 14.

Пример 16. Оценка чистоты и целостности рекомбинантного антитела человека NI-302.63F3 к богатому пролином домену

Для оценки чистоты и целостности рекомбинантного антитела человека NI-302.63F3 к богатому пролином домену проводили ДСН-ПААГ-анализ согласно описанию, приведенному в примере 11, выше.

ДСН-ПААГ-анализ рекомбинантного антитела человека NI-302.63F3 к богатому пролином домену в восстановительных условиях выявил две основных полосы, соответствующие тяжелым и легким цепям антитела ожидаемого размера. Не было детектировано значимых загрязняющих примесей или продуктов

протеолитического разложения, как видно на фиг. 10.

Пример 17. Определение характеристик антитела к НТТ NI-302.63F3 у трансгенных мышей, экспрессирующих НТТ человека

Оценку связывания антитела NI-302.63F3 к богатому пролином домену с патологическим НТТ в содержащих НТТ человека тканях головного мозга трансгенных мышей проводили согласно описанию в примере 12 выше, с той разницей, что инкубацию срезов выполняли с 1 или 50 нМ антителом к богатому пролином домену.

Как показано на фиг. 28 [E-F], происходящее от человека антитело NI-302.63F3 к богатому пролином домену выявило ярко выраженное высокоспецифичное окрашивание патологических внутриядерных включений нейронов при использовании концентраций 1 и 50 нМ в стриатуме и коре трансгенных животных R6/1, что согласуется с высокой аффинностью связывания с агрегатами НТТ по оценке с применением ИФА (ELISA) и анализа методом дот-блоттинга. Однако, как показано на фиг. 28[F], в концентрации 50 нМ антитело NI-302.63F3, кроме того, полностью слабо окрашивало ядро средних шипиковых нейронов.

Пример 18. Определение аффинности связывания и селективности антител NI-302.35C1 и NI-302.72F10 к С-концевому домену с применением прямого ИФА (ELISA), и EC_{50}

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) рекомбинантных происходящих от человека антител к НТТ NI-302.35C1 и NI-302.72F10 для растворимых и агрегированных белков Нт, кодированных экзоном 1 с 21 или 49 полиглутаминовыми повторами, проводили прямой ИФА (ELISA) и осуществляли определение EC_{50} согласно описанию в примере 6, выше.

Можно отметить, что NI-302.35C1 связывается с высокой аффинностью со всеми четырьмя видами, включая агрегированный НТТ, кодированный экзоном 1 HD49, при EC_{50} , составляющей приблизительно 2,7 нМ; см. фиг. 11А и В. Аналогичным образом, NI-302.72F10 связывается со всеми четырьмя видами, но с аффинностью, отличной от NI-302.35C1 (агрегированный HD21>>GST-HD21>>агрегированный HD49>>GST-HD49) (фиг. 31C) что может объясняться наличием разных эпитопов, распознаваемых обоими антителами (фиг. 20).

Соответственно, происходящие от человека антитела NI-302.35C1 и NI-302.72F10 НТТ против С-концевого домена нацелены на эпитоп, экспонируемый на агрегированных, а также на растворимых формах НТТ с аффинностью в низком наномолярном диапазоне.

Кроме того, для описания связывания рекомбинантных происходящих от человека антител NI-302.35C1 и NI-302.72F10 к НТТ с растворимыми и агрегированными белками Нт, кодированными экзоном 1 с 21, 35 или 49 полиглутаминовыми повторами, проводили анализ методом задержки на фильтре и дот-блоттинг согласно описанию в примере 7, выше.

В анализе методом дот-блоттинга антитело NI-302.35C1 преимущественно детектировало конструкции с НТТ, удлинённым за счёт полиглутаминовых (поли-Q) трактов (HD49>HD35>>HD21, фиг. 11C, слева). Кроме того, интенсивность сигнала возрастает при увеличении продолжительности инкубации продуктов реакций агрегации HD35 и HD49. Аналогичным образом, антитело NI-302.72F10 детектировало конструкции с НТТ, удлинённым за счёт полиглутаминовых (поли-Q) трактов, хотя и с разным предпочтением (HD35>>HD49>HD21), при этом интенсивность сигнала возрастала только при увеличении продолжительности инкубации продуктов реакций агрегации HD35 (фиг. 32C).

В анализе методом задержки на фильтре NI-302.35C1 детектировало агрегаты HD35 и HD49, задержавшиеся на мембране с размером пор 0,2 мкм (фиг. 11C, справа), тогда как NI-302.72F10 детектировало только агрегаты HD35 (фиг. 32C, справа). Эти результаты, основанные на мембраносвязанных белковых составах, предполагают, что антитела NI-302.35C1 и NI-302.72F10 преимущественно нацелены на агрегированные конформеры НТТ с патогенными поли-Q удлинёниями.

Кроме того, для определения связывания рекомбинантных антител NI-302.35C1 и NI-302.72F10 с нерелевантными агрегирующими белковыми мишенями проводили прямой ИФА (ELISA) согласно описанию в примере 8, выше. Как показано на фиг. 16C, происходящее от человека NI-302.35C1, а также представленное на фиг. 33C происходящее от человека NI-302.72F10 специфически связывались с НТТ, тогда как связывания с нерелевантными белками не наблюдалось.

Пример 19. Определение связывающего эпитопа антитела к НТТ NI-302.35C1

Для картирования эпитопа гентингина, распознаваемого происходящим от человека антителом NI-302.35C1, выполняли картирование эпитопов на синтетических пептидах согласно описанию выше в примере 9.

Определение связывающего эпитопа антитела NI-302.35C1 путем сканирования перекрывающихся пептидов не приводило к возникновению специфического сигнала. Соответственно, обработка указанного антитела идентичным другим NI-302-антителам к НТТ способом не приводила к возникновению какого-либо специфического сигнала от индивидуальных пептидов по неизвестным причинам. Указанный эпитоп был успешно картирован на С-концевом пептиде путем конъюгации последнего с БСА, см. также пример 20.

Пример 20. Картирование эпитопов посредством связывания с применением прямого ИФА (ELISA)

с разными пептидами С-концевого домена, кодированного экзоном 1, антитела к НТТ NI-302.35C1

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) рекомбинантного происхождения от человека антитела к НТТ NI-302.35C1 для конъюгированных с БСА пептидных фрагментов Нтт, кодированных экзоном 1, осуществляли прямой ИФА (ELISA) с конъюгированными с БСА пептидами доменов Нтт, кодированных экзоном 1, и проводили определение EC_{50} согласно описанию в примере 10.

Как показано на фиг. 12, NI-302.35C1 связывается с высокой аффинностью с конъюгированным с БСА С-концевым пептидом, а также с полноразмерным GST-HD49 со значением EC_{50} , составляющим приблизительно 0,7 нМ и 3,2 нМ соответственно. Эти результаты соответствуют локализации эпитопа в последовательности С-концевой области НТТ, кодированной экзоном 1 (71-PPGPAVAEEPLHRP-85, SEQ ID No: 96). В том случае, если тем же С-концевым пептидом непосредственно покрывали планшет, наблюдалось лишь незначительное связывание ($EC_{50} > 100$ нМ, данные не показаны), предполагая, что презентация конъюгированного с БСА пептида усиливает связывание с эпитопом; этим может объясняться тот факт, что картирование эпитопов методом пептидного сканирования согласно примеру 20 не дало результатов.

Пример 21. Оценка чистоты и целостности рекомбинантного антитела человека NI-302.35C1 к богатому пролином домену

Для оценки чистоты и целостности рекомбинантного антитела человека к С-концевому домену NI-302.35C1 проводили ДСН-ПААГ-анализ согласно описанию в примере 11, выше.

ДСН-ПААГ-анализ в восстановительных условиях рекомбинантного антитела человека NI-302.35C1 к С-концевому домену выявил две основных полосы, соответствующих тяжелым и легким цепям антитела ожидаемого размера, при этом не было детектировано значимых загрязняющих примесей или продуктов протеолитического разложения (фиг. 13).

Пример 22. Определение характеристик антитела к НТТ NI-302.35C1 у трансгенных по НТТ человека мышей

Оценку связывания антитела NI-302.35C1 к С-концевому домену патологического НТТ человека в тканях головного мозга трансгенных мышей оценивали согласно описанию в примере 12, выше, с той разницей, что инкубирование срезов проводили с 5 или 50 нМ антитела к С-концевому домену.

Как показано на фиг. 29 [E-F], происходящее от человека антитело к С-концевому домену NI-302.35C1 в концентрациях 5 и 50 нМ обеспечивало ярко выраженное окрашивание патологических внутриядерных включений нейронов в стриатуме трансгенных животных R6/1, что согласуется с высокой аффинностью к связыванию с агрегатами НТТ по оценке с применением ИФА (ELISA) и дот-блоттинга.

Пример 23. Оценка эффектов происходящих от человека антител, нацеленных на НТТ, на плотность шипиков в культурах срезов гиппокампа

Экспрессия и очищение антител

Происходящие от человека антитела, нацеленные на отдельные домены Нтт, кодированные экзоном 1, экспрессировали посредством транзientной трансфекции клеток CHO-S и проводили аффинное очищение с белком А в системе Акта. После обессоливания на колонке PD-10 антитела разводили в ФСБ. Подтверждали уровни эндотоксина менее <10 Ед/мл.

Культура срезов гиппокампа

Органотипические культуры срезов гиппокампа получали и проводили культивирование в соответствии с описанием в источнике: Stoppini et al., J Neurosci Methods. (1991) 37(2): 173-82. Вкратце, 6-8-дневных трансгенных B6CBA-Tg(HDexon1)62Gpb/1J и нетрансгенных однопородных животных декапитировали, извлекали головной мозг, выделяли оба гиппокампа и изготавливали срезы толщиной 400 мкм. Указанный способ обеспечивает получение тонких срезов толщиной 1-4 клеточных слоя, которые характеризуются хорошо сохраняющейся органотипической организацией. Срезы культивировали на культуральных вставках для планшетов Millicell (0,4 мкм, Millipore) в шестилуночных планшетах, содержащих 1 мл культуральной среды (46% минимальной эссенциальной среды Игла, модифицированной NEPES, 25% базовой среды, модифицированной по Иглу, 25% термоинактивированной сыворотки лошади, 2 мМ глутамин, 0,6% глюкозы, pH 7,2). Культуральные планшеты держали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Срезы культивировали на протяжении 7 дней до проведения экспериментов. Культуральную среду заменяли каждые 2-3 дня. На 7 день добавляли антитела в концентрации 10 мкг/мл. На 10 день культуры срезов *in vitro* инфицировали вирусом Синдбис с применением капельного метода (Shahani et al., J Neurosci. 31 (2006), 6103-6114). Для анализа шипиков культуры фиксировали на 4 день после инфицирования (14 дней *in vitro*). Срезы оставляли в присоединенном к мембране культурального планшета виде для сохранения структуры гиппокампа и промывали ФСБ. Затем срезы фиксировали в 4% растворе параформальдегида в ФСБ, содержащем 4% сахарозы, на протяжении 2 ч при 4°C. Каждый дендрит фотографировали и анализировали шипики на участке длиной 30-45 мкм. Для каждой обработки антителом проводили количественное определение на 6-13 срезах для группы из 12 трансгенных животных. Представленные данные соответствуют среднему $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ (MWU), # $p = 0,05$.

Количественное определение плотности дендритных шипиков в культурах срезов гиппокампа

трансгенных мышей Tg(HDexon1)62Gpb/1J (фиг. 17 В, D) выявило значимое снижение плотности, составляющее 53% относительно нетрансгенных однопаметных животных (фиг. 17А, С, Е), при использовании срезов гиппокампа 6-дневных животных через 14 дней *in vitro* в условиях описанного выше дизайна эксперимента. При добавлении происходящих от человека антител NI-302 в составляющей 10 мкг/мл концентрации на протяжении семи дней наблюдалось значимое уменьшение потери плотности шипиков в случае использования антител NI-302.31F11 (фиг. 17F, $p < 0,05$, t-критерий) и NI-302.63F3 ($p = 0,05$, t-критерий), тогда как антитела NI-302.33C11 и NI-302.35C1 не обеспечивали явного эффекта в протестированных условиях.

Значимое снижение плотности шипиков по сравнению с нетрансгенными однопаметными животными, наблюдаемое в культурах срезов гиппокампа трансгенных мышей Tg(HDexon1)62Gpb/1J позволило предположить, что указанная модель подходит для тестирования *in vitro* активности кандидатных антител к НТТ в отношении взаимодействия с токсичными НТТ. В указанной модели антитела NI-302.63F3 и NI-302.11F11, оба нацеленные на богатый Р домен в составе Нт, кодированного экзоном 1, были способны увеличивать плотность шипиков по сравнению с контрольным изотипическим антителом. Это свидетельствует о том, что указанные антитела способны смягчать токсические эффекты на плотность шипиков, обусловленные экспрессией патологического НТТ с полиглутаминовыми удлиннениями.

Пример 24. Проникновение антител NI-302 в головной мозг в модели на животных R6/1

Для тестирования проникновения антител к НТТ согласно настоящему изобретению использовали модель на трансгенных мышах. В частности, трансгенные мыши Tg(HDexon1)61Gpb/J являются носителями трансгена размером 1,9 т.п.н., выделенного из фага, содержащего геномный клон, происходящий от пациента с болезнью Гентингтона (БГ), и включающего 5'-конец гена гентингтина (НТТ) человека. Он состоит приблизительно из 1 т.п.н. последовательностей 5'-нетранслируемой области, экзона 1 (с удлиннениями из САG повторов, ~130 единиц) и первых 262 п.о. интрона 1. Указанные конструкции микроинъектировали в одноклеточные эмбрионы CBAxС57BL/6. Самца-основателя R6 скрещивали с самками CBAxС57BL/6 с получением нескольких линий-основателей. У мышей линии-основателя R6/1 трансген интегрирован в виде одной интактной универсально экспрессируемой копии. Трансгенных мышей со смешанным фоновым генотипом CBAxС57BL/6 повторно скрещивали с C57BL/6J на протяжении более чем 12 поколений для получения конгенной линии B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J.

У трансгенных мышей R6/1 наблюдается прогрессирующий неврологический фенотип, воспроизводящий многие признаки БГ, в том числе хореоформные движения, непроизвольные стереотипные движения, тремор и эпилептические судороги, а также компоненты двигательных расстройств, в том числе необычные вокализации. У них наблюдается частое мочеиспускание, снижение массы тела и мышечной массы в ходе заболевания. В неврологическом отношении у них развиваются внутриядерные включения нейронов (НИ), которые содержат как НТТ, так и убиквитиновые белки. Такие NN также были идентифицированы у пациентов-людей с БГ. Зарегистрированный возраст появления симптомов БГ для указанной линии 6/1 составляет от 15 до 21 недели.

Экспериментальные животные, которым для идентификации ставилась классическая ушная метка, отличались следующими характеристиками:

Линия: Гемизиготные B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J (Mangiarini et al., Cell, 87 (1996), 493-506)

Источник: Jackson Laboratory, Мэн, США

Пол: Самцы и самки

Исходный возраст: 230-260 дней

Когорты:

NI-302.31F11 Всего: 3 самца

NI-302.35C1 Всего: 3 самца

Основа Всего: 3 самца

Для получения гомогенизированного спинного мозга трансгенных мышей B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J глубоко анестезировали и транскардиально перфузировали холодным забуференным фосфатом солевым раствором через левый желудочек с помощью перистальтического насоса. Головной мозг извлекали и мгновенно замораживали на сухом льду. Образцы ткани гомогенизировали в пропорции 1:10 (мас./об.) в диэтаноламиновом (ДЭА) буфере (50 мМ NaCl, 0,2% ДЭА, полный набор ингибиторов протеаз, Roche Diagnostics) с использованием ручного ультразвукового аппарата (Sartorius, Labsonic M). Образцы центрифугировали в течение 30 мин при 100 000 × g при температуре 4°C; аликваты супернатанта помещали на хранение при -80°C до анализа.

В описанном ниже сэндвич-анализе ELISA на уровень лекарственного средства для IgG человека определяли уровни антител человека NI-302.35C1, NI-302.11F11 в плазме с применением в качестве стандарта соответствующего рекомбинантного антитела в известной концентрации. 96-луночные микропланшеты (Corning) покрывали антителами осли к IgG человека (709-005-149, Jackson ImmunoResearch) в концентрации 1 мкг/мл в 50 мМ карбонатном покрывающем буфере, pH 9,6. Сайты неспецифического связывания блокировали в течение 1 ч при КТ раствором ФСБ/0,1% Tween®-20, содержащим 2% БСА (Sigma, Букс, Швейцария). Образцы плазмы разводили до 1:20 000 и 1:100 000, гомогенаты головного

мозга разводили до 1:5 и 1:50, и инкубировали все образцы в течение 1 ч при КТ вместе со стандартами для кривых разведения. Связывание определяли с применением HRP-конъюгированного детекторного антитела против антител человека (709-036-098, Jackson Immunoresearch), с последующим измерением активности HRP в стандартном колориметрическом анализе. Концентрации в образцах плазмы и спинного мозга вычисляли на основании индивидуальных стандартных кривых. Значения, приведенные в табл. 6-1, представляют собой средние значения для 2 независимых экспериментов ELISA.

Образцы плазмы и головного мозга получали через 2 дня после однократной внутрибрюшинной инъекции 50 мг/кг антител NI-302.31F11, NI-302.35C1 трансгенным мышам R6/1. Уровни антител в гомотенатах плазмы и головного мозга определяли с применением сэндвич-анализа ELISA для IgG человека (фиг. 18А и В). Отношение уровней лекарственного средства в головном мозге/плазме было определено для происходящих от человека антител NI-302.31F11 и NI-302.35C1 как $0,13 \pm 0,02\%$ / $0,21 \pm 0,06\%$, соответственно. Указанные результаты свидетельствуют о проникновении в головной мозг трансгенных по НТТ мышей протестированных антител NI-302 в течение 48 ч в ожидаемом диапазоне.

Пример 25. Определение аффинности связывания и специфичности дополнительных антител, идентифицированных в настоящем изобретении

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) дополнительных идентифицированных рекомбинантных происходящих от человека антител к НТТ для растворимых и агрегированных белков Htt, кодированных экзоном 1 с 21 или 49 полиглутаминовыми повторами, проводили прямой ИФА (ELISA) с покрытием разными составами в концентрации 5 мкг/мл и определяли EC_{50} согласно описанию в примере 6, выше.

Определенные значения EC_{50} для разных видов НТТ приведены на фиг. 19, а также на фиг. 31 (А, D-F) и обобщены на фиг. 20. Большинство происходящих от человека антител связывались с высокой аффинностью со значениями EC_{50} в субнанолярном или низком нанолярном диапазоне. Некоторые кандидатные антитела, такие как NI-302.37C12, NI-302.55D8, NI-302.11A4, NI-302.22H9 или NI-302.64E5, по-видимому, предпочтительно связываются с неусеченным белком GST-НТТ, другие антитела, такие как NI-302.74C11, NI-302.71F6, NI-302.4A6, NI-302.12H2 или NI-302-8M1, демонстрировали в анализе ИФА (ELISA) высокая аффинность связывания со всеми составами с НТТ при аналогичных значениях EC_{50} . NI-302.15F9 демонстрировало приблизительно 5-кратное предпочтение HD49 относительно HD21, при значениях EC_{50} в диапазоне от 5 до 35 нМ. В качестве контроля в указанном эксперименте использовали антитело 33C11 (фиг. 32G).

Соответственно, панель высокоаффинных рекомбинантных специфических антител человека к НТТ клонировали из В-клеток памяти, происходящих из когорты здоровых доноров-людей пожилого возраста, рекомбинантным способом экспрессировали и характеризовали. Кроме того, для поиска дополнительных дублирующих антител инициировали проведение скрининга в когорте отобранных предсимптоматических пациентов с болезнью Гентингтона (БГ), носителей удлинений за счет CAG-повторов разной длины.

Для дополнительного описания связывания идентифицированных рекомбинантных происходящих от человека антител НТТ NI-302 с растворимыми и агрегированными белками Htt, кодированными экзоном 1 с 21, 35 или 49 полиглутаминовыми повторами, осуществляли анализ методом задержки на фильтре с использованием первичного антитела в концентрации 0,2 мкг/мл, и анализ методом дот-блоттинга с использованием первичного антитела в концентрации 1 мкг/мл согласно описанию в примере 7, выше.

Как показано на фиг. 21 и 32 (А, G), в анализе методом дот-блоттинга (левая часть фигуры, "Дот-блоты") большинство изученных антител демонстрировали преимущественную детекцию белков НТТ, удлиненных за счет полиглутаминовых (поли-Q) трактов (HD49 >> HD35 > HD21). Кроме того, интенсивность сигнала возрастала при увеличении продолжительности инкубации продуктов реакций агрегации HD35 и HD49, в частности, для антител NI-302.15F9, NI-302.71F6 (фиг. 21, первый ряд блотов) и NI-302-64E5 (фиг. 32 А, слева). В анализе методом задержки на фильтре NI-302.15F9, NI-302.71F6 (фиг. 21, справа, FRA) и NI-302-64E5 (фиг. 32 А, справа) детектировало стабильные в ДСН агрегаты HD35 и HD49, которые удерживались на мембране с размером пор 0,2 мкм размер пор, тогда как другие антитела, такие как NI-302.44D7 и NI-302.37C12 (фиг. 21, второй ряд блотов), или NI-302.4A6, NI-302.12H2 и NI-302.8M1 (фиг. 32 D, E, F), не связывались с агрегатами на фильтре. В указанном эксперименте использовали в качестве контроля антитело 33C11 (фиг. 32 G). Эти результаты, основанные на спотах с белковыми составами, предполагают, что некоторые из клонированных антител NI-302 демонстрируют предпочтение в отношении агрегированных конформеров НТТ с патогенными полиглутаминовыми удлинениями.

Кроме того, оценивали специфичность связывания идентифицированных антител с нерелевантными белками, в частности, с образующими агрегаты белками, с применением прямого ИФА (ELISA) (фиг. 22 и фиг. 33 А, D-F) согласно описанию, приведенному в примере 8, выше. Результаты показали, что большинство протестированных происходящих от человека антител NI-302 специфически связываются с НТТ, тогда как связывание с другими нерелевантными протестированными белками отсутствует.

Пример 26. Оценка связывания происходящих от человека НТТ антител и картирование их эпитопов

Для картирования эпитопа НТТ, распознаваемого вновь идентифицированными происходящими от человека антителами выполняли картирование эпитопов на синтетических пептидах согласно описанию выше в примере 9 (фиг. 23 и 35 А, D-F). Кроме того, определяли полумаксимальную эффективную концентрацию (EC_{50}) антител к НТТ для конъюгированных с БСА пептидных фрагментов Нт, кодированных экзоном 1, с применением прямого ИФА (ELISA) с конъюгированными с БСА пептидами доменов Нт, кодированных экзоном 1, а также определяли EC_{50} согласно описанию в примере 10.

Пример 27. Оценка связывания НТТ антителами у трансгенных мышей, экспрессирующих НТТ человека

Определение характеристик связывания идентифицированных антител с патологическими НТТ человека в тканях головного мозга трансгенных мышей оценивали согласно описанию в примере 12, выше, с той разницей, что инкубацию срезов проводили с антителами к НТТ в концентрациях 5 нМ (74C11, 39C12, 11A4, 22H9, 78H12, 37C12, 7D8, 72F10) или 50 нМ (15F9, 71F6, 55D8, 44D7, 7A8, 64E5). Как показано на фиг. 24, идентифицированные происходящие от человека антитела к НТТ обеспечивали ярко выраженное высокоспецифичное окрашивание патологических внутриядерных включений нейронов в стриатуме и коре трансгенных животных R6/1, также продемонстрированное для антител NI-302.33C11, NI-302.63F3 и NI-302.35C1, согласно описанию выше. Эти результаты согласуются с высокой аффинностью связывания агрегатов НТТ по оценке с применением ELISA и дот-блоттинга в примере 26.

Пример 28. Определение основных характеристик модели болезни Гентингтона (БГ) на трансгенных мышах R6/1

Трансгенные мыши Tg(HDexon1)61Gpb/J являются носителями трансгена размером 1,9 т.п.н., выделенного из фага, содержащего геномный клон от пациента с БГ, и включающего 5'-конец гена гентингтина (НТТ) человека. Он состоит приблизительно из 1 т.п.н. последовательностей 5'-нетранслируемой области, экзона 1 (с удлинением из CAG повторов, ~130 единиц) и первых 262 п.о. интрона 1. Указанный конструктор микроинъектировали в одноклеточные эмбрионы CBA×C57BL/6. Самца-основателя R6 скрещивали с самками CBA×C57BL/6 с получением нескольких линий-основателей (Mangiarini et al., Cell 87 (1996), 493-506). У мышей линии-основателя R6/1 трансген интегрирован в виде одной интактной универсально экспрессируемой копии. Трансгенные мыши со смешанным фоновым генотипом CBA×C57BL/6 повторно скрещивали с C57BL/6J на протяжении более чем 12 поколений для получения конгенной линии B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J. У трансгенных мышей R6/1 наблюдается прогрессирующий неврологический фенотип, воспроизводящий многие признаки БГ, в том числе хорееформные движения, непроизвольные стереотипные движения, тремор и эпилептические судороги, а также компоненты двигательных расстройств, в том числе необычные вокализации. У них наблюдается частое мочеиспускание, снижение массы тела и мышечной массы в ходе заболевания. В неврологическом отношении у них развиваются внутриядерные включения нейронов (НИ), которые содержат как НТТ, так и убиквитиновые белки. Такие НИ также были идентифицированы у пациентов-людей с БГ. Зарегистрированный возраст появления симптомов БГ для указанной линии 6/1 составляет от 15 недель до 21 недели (Naver et al., Neuroscience 122 (2003), 1049-1057; Hodges et al., Genes Brain Behav. 7(3) (2008), 288-299).

Трансгенных мышей R6/1, полученных от Jackson Laboratories, размножали и проводили лонгитюдное исследование поведенческого фенотипа, долгосрочной динамики массы тела, общей массы головного мозга, гистопатологических показателей и выживаемости, согласно фиг. 25. В целом, полученные результаты согласуются с опубликованными данными и показывают, что указанная линия мышей подходит для использования в качестве доклинической модели при исследовании эффективности происходящих от человека антител NI-302, нацеленных на агрегированный НТТ.

Пример 29. Определение основных характеристик модели БГ на трансгенных мышах N171-82Q

Линия трансгенных мышей B6C3-Tg(HD82Gln)81Dbo/J (N171-82Q) (Schilling et al., Hum Mol Genet. 8(3) (1999), 397-407) представляет собой хорошо описанную модель БГ на мышах. Трансгенные мыши B6C3-Tg(HD82Gln)81Dbo/J (N171-82Q) экспрессируют кДНК усеченного по N-концу НТТ человека, которая кодирует 82 остатка глутамина и захватывает первую 171 аминокислоту. Измененная кДНК НТТ находится под контролем промотора прионного белка мыши. Экспрессия наблюдается в нейронах центральной нервной системы. Мыши, экспрессирующие указанный трансген, внешне здоровы при рождении и на протяжении 1-2 первых месяцев жизни. Однако указанные мыши не набирают массу тела, у них развивается тремор, гипокинез и нарушение координации. У них наблюдается аномальная походка и частое поджимание задних конечностей. Ожидаемая продолжительность жизни составляет 5-6 месяцев. Исследования с применением НТТ антител диффузное мечение ядер и многочисленные иммунореактивные ядерные включения в нескольких нейронных популяциях. Кроме того, наблюдалось очевидное повреждение нейритов.

Трансгенных мышей N171-82Q, полученных от Jackson Laboratories размножали и проводили лонгитюдное исследование поведенческого фенотипа, долгосрочной динамики массы тела, общей массы головного мозга на конечной стадии, гистопатологических показателей и выживаемости (фиг. 26). В целом, полученные результаты согласуются с опубликованными данными и показывают, что указанная линия мышей, помимо линии мышей, описанной в примере 29, подходит для использования в качестве

доклинической модели при исследовании эффективности происходящих от человека антител NI-302, нацеленных на агрегированный НТТ.

Пример 30. Оценка окрашивания включений нейронов у пациентов с болезнью Гентингтона (БГ)

Для оценки окрашивания включений нейронов идентифицированными антителами согласно настоящему изобретению у пациентов проводили иммуногистохимический анализ. Оценку связывания идентифицированных антител с патологическим НТТ в тканях головного мозга человека оценивали согласно описанию в примере 12, выше, с той разницей, что инкубирование срезов выполняли с использованием концентраций 50 нМ для антитела NI-302.33C11, 50 нМ для антитела NI-302.63F3 или 100 нМ для антитела NI-302.35C1.

Как показано на фиг. 27, иммуногистохимический анализ со связывающим полипролиновую область антителом NI-302.33C11 показал окрашивание внутриядерных включений нейронов в кортикальных нейронах пациентов с болезнью Гентингтона (фиг. 27 A-D) в концентрации 50 нМ, и в стриарных нейронах трансгенных животных B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J) возрастом 270 дней на поздней стадии заболевания в концентрации 1 нМ (E) и 5 нМ (F), тогда как у нетрансгенных однопометных животных не было детектировано окрашивания (G), если при окрашивании не используется первичное антитело (H) или если контрольные образцы тканей, не пораженных болезнью Гентингтона, окрашивали NI-302.33C11 в концентрации 50 нМ. Антитела NI-302.63F3 к богатому пролином домену (фиг. 28) и NI-302.35C1 к C-концевому домену (фиг. 29) в иммуногистохимическом анализе при концентрациях 50 нМ для NI-302.63F3 или 100 нМ для NI-302.35C1 демонстрировали окрашивание внутриядерных включений нейронов (A-C) и окрашивание некоторых нейритов (D) кортикальных нейронов у четырех разных пациентов с болезнью Гентингтона (A-D). Также можно наблюдать окрашивание в стриарных нейронах трансгенных животных B6.Cg-Tg(HDexon1)61 Gpb/J) возрастом 270 дней на поздней стадии заболевания при использовании концентраций 1 нМ (E) и 50 нМ (F). Но окрашивание было детектировано у нетрансгенных однопометных животных (G), если при окрашивании не используется первичное антитело (H), или если контрольные образцы тканей, не пораженные болезнью Гентингтона, окрашивали антителом NI-302.63F3 в концентрации 50 нМ или NI-302.35C1 в концентрации 100 нМ, соответственно.

В отличие от специфических антител к НТТ согласно настоящему изобретению, при иммуногистохимическом анализе с коммерчески доступным антителом Mab1574 к поли-Q (1:2000, Chemicon) наблюдалось дополнительное окрашивание ткани, т.е. более общее окрашивание ядер и цитоплазмы и окрашивание некоторых нейритов (фиг. 30 A, D) кортикальных нейронов у четырех разных пациентов с болезнью Гентингтона и в стриарных нейронах предсимптоматических трансгенных животных B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J) на поздней стадии заболевания возрастом 150 дней (фиг. 30 E) и 270 дней (фиг. 30 F).

Пример 31. Определение аффинности связывания и селективности антитела NI-302.7D8 к поли-Q/поли-Р домену с применением прямого ИФА (ELISA), и определение EC_{50}

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) рекомбинантного происхождения от человека антитела к НТТ NI-302.7D8 для растворимых и агрегированных белков Htt, кодированных экзоном 1 с 21 или 49 полиглутаминовыми повторами, выполняли прямой ИФА (ELISA) и определяли EC_{50} согласно описанию в примере 6, выше.

Можно отметить, что NI-302.7D8 связывается с аналогичной высокой аффинностью с растворимым GST-HD21 и агрегированным HD21 с EC_{50} , составляющей от приблизительно 50 до 100 нМ, однако демонстрирует предпочтение в отношении удлиненной более патогенной формы агрегированного HD49 и растворимого GST-HD49, EC_{50} для которых составляет 17 и 6 нМ соответственно (фиг. 31B).

Соответственно, происходящие от человека антитело NI-302.7D8 к НТТ поли-Q/поли-Р домену нацелено на эпитоп, экспонируемый на агрегированном, а также на неусеченном, с более линейной структурой белке НТТ, кодированном экзоном 1, с высокой аффинностью в низком наномолярном диапазоне.

Кроме того, для определения связывания рекомбинантного происхождения от человека антитела к НТТ NI-302.7D8 с растворимыми и агрегированными белками Htt, кодированными экзоном 1 с 21, 35 или 49 полиглутаминовыми повторами, проводили анализ с концентрацией 1 мкг/мл с применением метода задержки на фильтре и дот-блоттинга согласно описанию в примере 7, выше.

Можно отметить, что в анализе методом дот-блоттинга (фиг. 32B, левая часть), антитело NI-302.7D8 одинаково эффективно детектирует белки гентингтина, удлиненные за счет полиглутаминовых (поли-Q) трактов (HD49=HD35=HD21). В анализе методом задержки на фильтре (фиг. 32 B, правая часть, FRA) антитело NI-302.7D8 не связывалось со стабильными в ДСН агрегатами HD21, HD35 или HD49 на мембране фильтра.

Кроме того, для определения связывания рекомбинантного антитела NI-302.7D8 с нерелевантными агрегирующими белковыми мишенями проводили прямой ИФА (ELISA) согласно описанию в примере 8, выше. Как показано на фиг. 33B, происходящее от человека антитело NI-302.7D8 специфически связывалось с НТТ, тогда как связывания с нерелевантными белками не наблюдалось.

Пример 32. Определение связывающего эпитопа антител к НТТ NI-302-64E5, NI-302.7D8 и NI-302.72F10

Для картирования эпитопа гентингтина, распознаваемого происходящими от человека антителами

NI-302-64E5, NI-302.7D8 и NI-302.72F10, выполняли картирование эпитопов на синтетических пептидах согласно описанию выше в примере 9.

На фиг. 35А показано ярко выраженное связывание NI-302-64E5 с пептидами №10 -№12, что указывает на локализацию эпитопа, распознаваемого указанным антителом, в богатом пролиновыми повторами домене гентингина. Связывающий эпитоп NI-302.64E5, соответственно, согласно прогнозу локализован в пределах аминокислот НТТ 48-PQPPQAQPL-58 (SEQ ID No: 200). Как показано на фиг. 35 В, наблюдалось ярко выраженное связывание NI-302.7D8 с пептидами №№ 6-8, что указывает на локализацию эпитопа, распознаваемого указанным антителом, в содержащем полиглутаминовые/полипролиновые повторы домене гентингина. Связывающий эпитоп для NI-302.7D8 соответственно, согласно прогнозу локализован в пределах аминокислот НТТ 28-QQQQQQPPP-37 (SEQ ID No: 201). В то же время, наблюдалось ярко выраженное связывание NI-302.72F10 с пептидами № 15 и № 16, что указывает на локализацию эпитопа, распознаваемого указанным антителом, в N-концевом домене НТТ (фиг. 35 С). Связывающий эпитоп для NI-302.72F10, соответственно, согласно прогнозу локализован в пределах аминокислот НТТ 70-PPPGPAVAEEPLH-82 (SEQ ID No: 202).

Пример 32. Определение аффинности связывания и селективности антитела к N-концевому домену NI-302.15E8 с применением прямого ИФА (ELISA) и определение EC_{50}

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) рекомбинантного происхождения от человека антитела к НТТ NI-302.15E8 для растворимых и агрегированных белков Нтт, кодированных экзоном 1 с 21 или 49 полиглутаминовыми повторами, осуществляли прямой ИФА (ELISA) и выполняли определение EC_{50} согласно описанию в примере 6, выше.

Можно отметить, что NI-302.15E8 связывается с более высокой аффинностью с неагрегированными GST-HD49 и GST-HD21, и с меньшей аффинностью с агрегированными HD49 и HD21, см. фиг. 14А и В. Соответственно, происходящее от человека НТТ антитело к N-концевому домену NI-302.15E8 нацелено на эпитоп, экспонируемый как на агрегированных, так и на растворимых формах НТТ, однако отличается большей аффинностью в отношении растворимых форм НТТ.

Пример 33. Картирование эпитопов посредством связывания с применением прямого ИФА (ELISA) разных пептидов, кодированных экзоном 1, с антителом к НТТ NI-302.15E8

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) рекомбинантного происхождения от человека антитела к НТТ NI-302.15E8 для конъюгированных с БСА пептидных фрагментов гентингина, кодированных экзоном 1 осуществляли прямой ИФА (ELISA) с конъюгированными с БСА пептидами доменов Нтт, кодированных экзоном 1, и проводили определение EC_{50} согласно описанию в примере 10.

Как показано на фиг. 15, NI-302.15E8 связывается с высокой аффинностью с первыми 19 конъюгированными с БСА аминокислот на N-конце, а также с полноразмерным GST-HD49 с EC_{50} , составляющей приблизительно 0,1 или 15 соответственно.

Пример 34. Влияние антитела к НТТ NI-302.35C1 на поведенческий дефицит у трансгенных по НТТ человека мышей

Проводили тест в приподнятом крестообразном лабиринте для измерения тревожного поведения и тест "вертикальный стержень" для измерения двигательной активности и координации у трансгенных по НТТ человека мышей для изучения антитела к НТТ NI-302.35C1 *in vivo*.

Группы и лечение

Для проведения поведенческого анализа использовали две группы трансгенных (tg) мышей (n = 24, 12 самцов/12 самок) B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J согласно описанию в примере 12 и одну группу мышей дикого типа (wt). В группах трансгенных мышей животные получали лечение путем внутрибрюшинного введения либо гибридного антитела мыши NI-302.35C1 в дозе 30 мг/кг, либо основы, начиная с возраста 6-7 недель и до развития у мышей фенотипа конечной стадии в возрасте 7-9 месяцев; мышам дикого типа инъектировали те же объемы основы. Поведенческие тесты с приподнятым крестообразным лабиринтом и "вертикальный стержень" проводили в возрасте 16 и 18 недель соответственно.

Тест в приподнятом крестообразном лабиринте

Тест в приподнятом крестообразном лабиринте проводили в соответствии с Naver et al., *Neuroscience* 122 (2003), 1049-1057. Лабиринт поднимали на высоту 50 см над поверхностью пола. Четыре рукава лабиринта (30 см × 5 см) отходили от центральной платформы, образуя крест. Два рукава, расположенных один напротив другого, были ограничены стенками высотой 15 см (закрытые рукава); другие рукава не были ничем ограничены (открытые рукава). Тест осуществляли в начале темновой фазы цикла животных при освещении в открытых рукавах в диапазоне 40 люкс. Каждую мышь помещали в центр крестообразного лабиринта, развернув в сторону открытого рукава. Эксперимент продолжался в течение 5 мин с регистрацией при помощи системы видеозаписи (VideoMot Software, TSE Systems). Между сессиями лабиринт промывали водой и высушивали с помощью бумажного полотенца. Затем подсчитывали количество входов в открытые и закрытые рукава, а также оценивали время, проведенное в открытых и закрытых отсеках. Вход определяют как расположение всех четырех лап животного в одном рукаве. Число входов в открытые рукава и время, проведенное в открытых рукавах, используют в качестве показателей индуцированной открытыми пространствами тревожности у мышей.

Тест "вертикальный стержень"

Тест "вертикальный стержень" широко используется для оценки связанных с базальными ганглиями расстройств движения у мышей; см., например, Matsuura et al. *J. Neurosci.* 73 (1997), 45-48; Sedelis et al. *Behav Brain Res.* 125(2001), 109-125, Fernagut et al., *Neuroscience* 116 (2003), 1123-1130. Вкратце, животных помещали головой вверх на вершину вертикального деревянного стержня длиной 50 см (с диаметром 1 см). Основание стержня размещалось в домашней клетке. При помещении на стержень животные разворачиваются головой вниз и спускаются по стержню в домашнюю клетку. В день проведения тестирования животных тестировали три раза, измеряя общее время, потребовавшееся для спуска (t-total). Результаты третьего суточного тестирования показаны на фиг. 24 В.

Как показано на фиг. 34А, животные R6/1, которые получали NI-302.35C1 проводят меньше времени в открытых рукавах лабиринта, реже заходят в открытые рукава и реже совершают незащищенных наклонов головы в открытом рукаве по сравнению с получавшими основу животными R6/1. Таким образом, у получавших NI-302.35C1 мышей R6/1 наблюдался характеризующийся большей тревожностью по сравнению с нетрансгенными однопотомными животными фенотип. Кроме того, как показано на фиг. 24В, у получавших NI-302.35C1 животных R6/1 наблюдались улучшенные показатели в тесте "вертикальный стержень" по сравнению с получавшими основу животными R6/1, достигая уровней, аналогичных уровням у нетрансгенных животных. В целом, антитело NI-302.35C1 согласно настоящему изобретению оказывает благоприятное действие на поведенческую активность и решение связанных с двигательной активностью задач у трансгенных мышей, экспрессирующих НТТ человека.

Пример 35. Выравнивание последовательностей антител к НТТ

Определение процента идентичности или сходства выполняли с использованием стандартных параметров программы BLASTn согласно описанию в разделе "Определения" настоящего изобретения. Как показано на фиг. 36, все антитела согласно настоящему изобретению богаты остатками тирозина в областях CDR.

Пример 36. Получение биспецифических антител к НТТ

Получение биспецифических антител может осуществляться согласно общему описанию у Бренна (Brennan); см. выше. Исходный материал для получения биспецифических антител представлен интактными IgG-антителами к НТТ согласно настоящему изобретению, распознающими что-либо из полипролиновой области, полиглутаминовой/полипролиновой области, богатой пролином области, С-концевой области или N-концевой области белка НТТ, кодированного экзоном 1 согласно описанию в разделе "Примеры" и обобщенной информации на фиг. 20. Антитела обрабатывают пепсином в течение трех часов при 37°C после обработки ацетатным буфером, pH 4,0, для отщепления Fc-части антитела. Реакцию останавливают путем повышения значений pH до 8 добавлением Tris-буфера. Затем в указанный раствор добавляют равный объем смеси 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты (ДТНБ) и инкубируют с тионитробензоатом (ТНБ) в течение 20 ч при комнатной температуре. Молярное соотношение в смеси ДТНБ-ТНБ, установленное путем инкубирования 40 мМ раствора ДТНБ с 10 мМ раствором ДТТ в течение нескольких минут, составляет 20:30. После дополнительного восстановления двух модифицированных F(ab')-фрагментов 0,1 мМ ДТТ в течение 1 ч при 25°C, полученные соответствующим образом фрагменты F(ab')-ТНБ и F(ab')-SH гибридузуют с биспецифическим F(ab')₂-фрагментом в течение 1 ч при 25°C. Биспецифические F(ab')₂-фрагменты очищали посредством гель-фильтрации (колонка Superdex 200).

Пример 37. Определение аффинности связывания и селективности биспецифических антител к НТТ с применением прямого ИФА (ELISA), и EC50

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC50) биспецифических НТТ антител с растворимыми и агрегированными белками Нт, кодированными экзоном 1 с 21 или 49 полиглутаминовыми повторами, осуществляют прямой ИФА (ELISA) и определение EC₅₀ согласно описанию в примере 6, выше. Биспецифические антитела к НТТ связываются с высокой аффинностью со всеми четырьмя видами, включая агрегированный НТТ, кодированный экзоном 1 HD49, в равной степени нацелены на соответствующие им эпитопы, экспонируемые на агрегированных, а также растворимых формах НТТ, обладая высокой аффинностью в низком наномолярном диапазоне. Кроме того, для описания связывания биспецифических антител к НТТ с растворимыми и агрегированными белками Нт, кодированными экзоном 1 с 21, 35 или 49 полиглутаминовыми повторами, осуществляют анализ методом задержки на фильтре и дот-блоттинг согласно описанию в примере 7, выше. В анализе методом дот-блоттинга биспецифические антитела к НТТ преимущественно детектируют конструкции НТТ, удлиненные за счет полиглутаминовых (поли-Q) трактов. Кроме того, интенсивность сигнала возрастает при увеличении продолжительности инкубирования продуктов реакций агрегации HD35 и HD49. В анализе методом задержки на фильтре биспецифические антитела к НТТ детектируют агрегаты HD35 и HD49, остающиеся на мембране с размером пор 0.2 мкм. Предполагается, что благодаря двойной специфичности в отношении НТТ и ранее обнаруженному связыванию индивидуальных антител на мембраносвязанных белковых составах, биспецифические антитела к НТТ преимущественно нацелены на агрегированные конформационные формы НТТ с патогенными полиглутаминовыми удлинениями. Кроме того, для определения связывания биспецифических антител к НТТ с нерелевантными агрегирующими белковыми мишенями,

осуществляют прямой ИФА (ELISA) согласно описанию в примере 8, выше. В указанном контексте биспецифические антитела к НТТ специфически связываются с НТТ, тогда как связывание с нерелевантными белками может и не наблюдаться.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Происходящее от человека моноклональное антитело к гентингтину (НТТ) или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела, которое содержит в своей вариательной области вариательные домены легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепи, и константный домен, где указанное антитело или его НТТ-связывающий фрагмент распознают эпитоп в С-концевой области экзона 1 гена НТТ, и при этом указанное антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела содержат в своей вариательной области:

(a) участки, определяющие комплементарность (CDR), последовательностей аминокислот V_H и V_L антитела NI-302.35C1, приведенных на фиг. 1C или 1AF, и представленных как:

(i) последовательность V_H (SEQ ID NO: 9) и

(ii) последовательность V_L (SEQ ID NO: 11), где один или более из указанных CDR могут содержать одну или две консервативные замены аминокислот; или

(b) последовательности аминокислот V_H и V_L антитела NI-302.35C1 согласно фиг. 1C или фиг. 1AF.

2. Происходящее от человека моноклональное антитело к гентингтину (НТТ) или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела, которое содержит в своей вариательной области вариательные домены легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепи, и константный домен, где указанное антитело или его НТТ-связывающий фрагмент распознают эпитоп в С-концевой области экзона 1 гена НТТ, и при этом указанное антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела содержат в своей вариательной области:

(a) участки, определяющие комплементарность (CDR), последовательностей аминокислот V_H и V_L антитела NI-302.72F10, приведенных на фиг. 1Z или 1AT, и представленных как:

(i) последовательность V_H (SEQ ID NO: 176 или 178) и

(ii) последовательность V_L (SEQ ID NO: 180 или 182), где один или более из указанных CDR могут содержать одну или две консервативные замены аминокислот; или

(b) последовательности аминокислот V_H и V_L антитела NI-302.72F10 согласно фиг. 1Z или 1AT.

3. Антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент относятся к типу IgG.

4. Антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-3, отличающиеся тем, что указанная легкая цепь представляет собой каппа-цепь (κ).

5. Антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-4, которые способны связывать агрегированные формы, кодируемые экзоном 1 НТТ.

6. Антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1 и 3-5, которые специфично связывают эпитоп в С-концевой области, кодируемой экзоном 1 НТТ, который содержит последовательность аминокислот PPGPAVAEEPLHRP (SEQ ID NO: 145).

7. Антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.2-5, которые специфично связывают эпитоп в С-концевой области, кодируемой экзоном 1 НТТ, который содержит последовательность аминокислот PPGPAVAEEPLN (SEQ ID NO: 202).

8. Антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела согласно любому из пп.1-7, отличающиеся тем, что указанный константный домен представляет собой константный домен иммуноглобулина человека IgG-типа.

9. Антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела согласно п.8, причём указанный константный домен иммуноглобулина человека представляет собой константный домен класса или изо-типа IgG1.

10. Антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-9, отличающиеся тем, что указанное антитело более предпочтительно распознает мутированные, агрегированные и/или растворимые формы НТТ, чем физиологические формы НТТ.

11. Антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-10, которое представляет собой химерное антитело мыши и человека или антитело, содержащее элементы антител мыши, и/или антитело или НТТ-связывающую молекулу, конкурирующие с антителом по любому из пп.1-5 за специфичное связывание с НТТ.

12. Полинуклеотид, кодирующий антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1, 3-6 и 8-11 или его цепи V_H и V_L .

13. Полинуклеотид, кодирующий антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.2-5 и 7-11 или его цепи V_H и V_L .

14. Вектор для экспрессии антитела или НТТ-связывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-11, или его цепей V_H и V_L , причём указанный вектор содержит полинуклеотид по п.12 или 13.

15. Клетка-хозяин для экспрессии антитела или НТТ-связывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-11 или его цепей V_H и V_L , содержащая полинуклеотид по п.12 или 13 или вектор по п.14.

16. Способ получения антитела или НТТ-связывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-11 или его цепей V_H и V_L , при этом указанный способ включает:

(а) культивирование клетки по п.15 и

(б) выделение указанного антитела, НТТ-связывающего фрагмента или его цепей V_H и V_L из указанной культуры.

17. Антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела, кодируемые полинуклеотидом по п.12 или 13 или полученные посредством способа по п.16.

18. Биспецифичное антитело, содержащее антитело согласно любому из пп.1-11 или 17, причём указанное антитело распознает два разных эпитопа на белке, кодируемом экзоном 1 гена НТТ, причем по меньшей мере один эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопов, которые определены в п.6 или 7.

19. Конъюгат антитела или НТТ-связывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-11 и 17 или биспецифичного антитела по п.18 с меткой с возможностью детекции, причем указанная метка с возможностью детекции выбрана из группы, состоящей из фермента, радиоизотопа, флуорофора и тяжелого металла.

20. Конъюгат антитела или НТТ-связывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-11 и 17 или биспецифичного антитела по п.18 с лекарственным средством.

21. Композиция для связывания НТТ, содержащая антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-11 и 17, или биспецифичное антитело по п.18, или конъюгат по п.19 или 20 и носитель.

22. Композиция по п.21, которая представляет собой фармацевтическую композицию, и указанный носитель представляет собой фармацевтически приемлемый носитель.

23. Композиция по п.21, которая представляет собой композицию для диагностики, содержащую стандартные реагенты для применения в способах иммунодиагностики или диагностики на основе нуклеиновых кислот.

24. Применение антитела или НТТ-связывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-11 и 17, биспецифичного антитела по п.18 или конъюгата по п.19 или 20 для визуализации НТТ или нацеливания терапевтического и/или диагностического агента на НТТ в организме человека или животного *in vivo*.

25. Применение по п.24, отличающееся тем, что указанная визуализация *in vivo* включает позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭТ), оптическую визуализацию в ближней инфракрасной области спектра (NIR) или магнитно-резонансную визуализацию (МРТ).

26. Набор для диагностики расстройства, связанного с НТТ-амилоидозом, содержащий по меньшей мере одно антитело или НТТ-связывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-11 и 17, или биспецифичное антитело по п.18, или конъюгат по п.19 и дополнительно содержащий реагенты и инструкции по применению.

(A) NI-302.33C11 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVESGGGVVQP^{GN}SLRLSCAASGFRFSDFGMHWVRQAPGKGLEWLALIWYDGGYKYYADSVKGRFT

-----CDR3-----FR4-----
 ISRDNSKNTMFLQMNSLRAEDTAVYYCATHLEYCSRTTCYLGHWGQGT^{LV}TVSS

NI-302.33C11 VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQLTQSPSFLSASVGD^{TV}TFTCRASQGISDYLA^{WF}QQKPGIAPKLLIYAASTLQTGVPSRFSGSGSGT

-----CDR3-----FR4-----
 EFTLTIRSLQSEDFGTYYCQQLKTPYTFGQGT^{VE}IK

(B) NI-302.63F3 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 QVQLVQSGSAFKKPGTSVKVSCASGYTFETRSMNWVRQAPGQGLE^{YMGW}INTNTGNRTYVQAFRGRFV

-----CDR3-----FR4-----
 FSLDTSVSTAYLQISNLKTEDTAVYYCARGAGGGYWFDSWGQGT^{LV}TVSS

NI-302.63F3 VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSNQSLFYSSNNNNYLAWYQHKSQPPKLLVYWGSGTRESGV^{PDR}FS

-----CDR3-----FR4-----
 GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAIYYCHQYYHN^{PN}PYTFGQGT^{LE}IK

(C) NI-302.35C1 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVESGGNLVQPGGSLRLSCTASGFTFSITALS^{WVRQ}APEKGPQWVSAITGNAYGTY^{YADSVKGRFT}

-----CDR3-----FR4-----
 ISRDNAKNTLYLQMNGLRAEDTAIYYCVKGIASDSSGYSAFWGPGT^{LV}TVSS

NI-302.35C1 VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV^{DNQFAWY}QQKPGQAPRLLIYDASRRAPGIPDRFSGSGSGT

-----CDR3-----FR4-----
 DFTLTISLPEPDAIYYCQHRYTWLYTFGQGT^{RL}EIK

(D) NI-302.31F11 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3-
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSTYMSWVRQAPGKGLCECVSVIFSGADTYADSVKGRFTV

-----CDR3-----FR4-----
 SRDNSKNTLFLQMNSLRVEDTATYYCVRHYGSDLPSEDFWGQGLTVTVSS

NI-302.31F11 VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DVVMTQSPSLSPVAPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPKPPQLLVYLGSDRASGVDPDRFSG

-----CDR3-----FR4-----
 SGSGKDFTLNISRVEAEDVGYYCMQGLQSPWTFGQGTKLEIK

(E) NI-302.2A2 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYWMNWVRQAPGKGLFWVANIKPDGSDKYVDSVKGRFT

-----CDR3-----FR4-----
 ISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARGDGGGWNVYWGQGLTVTVSS

NI-302.2A2 VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-
 DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYTSKNKDSKNYLGWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD

-----CDR3-----FR4-----
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYTTPQFGGGTKVEIK

(F) NI-302.6N9 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCVVSFTFSYAMTWVRQAPGKGLAWVSTISATGGSTFYTDSVRGRFT

-----CDR3-----FR4-----
 ISRDNSKNTLYLQMNSLRDDETAIYYCVKDLFGVDTSYYGMDVWGQGLTVTVSS

NI-302.6N9 VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRPSQSVSGRYVAWYQQKPGQAPRLLFYAASNRAIGIPDRFSGSGSG

-----CDR3-----FR4-----
 TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGASSYTFGPCTKVDIK

(G) NI-302.74C11 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3-----
 EVQLVQSGTEVQKPGASVKVSKASGYSFTGYFLHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAEKFRGRII
 -----CDR3-----FR4-----
 MTRDTSVSTAHMELSSLRFDLTALYYCTREAPDPAETDVGQGTITVTVSS

NI-302.74C11 VL (последовательность варибельной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSVLTQPPSVSVSPGQTARITCSGDAVPKQYIYWYQQKPGQAPILVIYKDTQRPSGIPERFSGSNSGTT
 -----CDR3-----FR4-----
 VTLTITGVQADDEGDYYCQADSSATWVFGGGTKLTVL

(H) NI-302.15F9 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR
 EVQLVESGGGLVTPGGSLRLSCEASGFLFKNSSMNVVRQTPGKLEWVSSIDTSATNYKYYADSVKGRF
 3-----CDR3-----FR4-----
 TISRDDATNSLYLQMNSLRADDTATYYCARGYYTPRDFDYWGQGTITVTVSS

NI-302.15F9 VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DVVMTQSPQTLVSLSGQAASISCRSSQSLLYRDNNTYLNWFHQRPQGSPRRLIYRASDRDSGVPDRFSG
 -----CDR3-----FR4-----
 GSGGTDFTLKISGVEAEDVGTYTCMQGTHWPRTFGQGTKVEIK

(I) NI-302.39G12 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3-
 EVQLVQSGGGLVHPWGSLRLSCAASGFSVSNYAITWVRRAPGKGLQYISVIYRDGRYYGDSVGRFTI
 -----CDR3-----FR4-----
 SRDDSKNTLYLQMNSLRFDLTAVYYCARAHGQYYYGVVDVWGQGTITVTVSS

NI-302.39G12 VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DVVMTQSPPLSLVSPGEPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYRQKPGQSPQLLIYLSNRPSPGVPDRFSA
 -----CDR3-----FR4-----
 SSGSTEFTLQISRVEAEDVGYYCMQSLQTFTFGGGTKVDIK

(J) NI-302.11A4 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3-
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFPVSSSYMSWVRQAPGEGLEWVSVLYRDGDTYYADSVQGRFTI

-----CDR3-----FR4-----
 SRDNSQNTFYLMNSLKAEDTAVYYCAGDRRSSHYYYGMDVWGQGTITVTVSS

NI-302.11A4 VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYFAWYQQKPGQAPRLIYGTSSRRATAIPDRFSGSGSG

-----CDR3---FR4-----
 TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSWTFGPGTKVEIK

(K) NI-302.22H9 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3-
 EVQLVESGGGLVHPWGSLRVSCAASGFSVSNYAITWVRQAPCKGLEYSVIYRDGRTYYGDSVGRFTI

-----CDR3-----FR4-----
 SRDDSKNTIYLMNSLRFEDTAVYYCARAHGQYYYGVVDVWGQGTITVTVSS

NI-302.22H9 VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DVVMTQSPFLSLVSPGEPASISCRSSQSLHNSGYNLDWYRQKPGQSPQLLIYLNNSNRASGVDPDRFSG

-----CDR3---FR4-----
 SSGSGTEFTLTISRVEAEDVGVYYCMQSLQTFTFGGGTKVEIK

(L) NI-302.44D7 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSGIGYSDTSTYYADSVKGRFT

-----CDR3-----FR4-----
 VSRDISKNTLYLMNSLRAEDTAVYYCAKGTDRDYGMVDVWGQGTMTVTVSS

NI-302.44D7 VL (последовательность варибельной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QTVVTQEPFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSYYPQWYQQTTPGRAPRTLIYSTNTRSSGVDPDRFSGSIL

-----CDR3-----FR4-----
 GNKAALTITGAQADDESYYCVLFMGSGIGVFGGGTRTLTVL

(M) NI-302.37C12 VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3--
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASALTVTNSQMTWVRRAPGRGLEWVSVIYTSGSAYYADSVKGRFTI
 -----CDR3-----FR4-----
 SRDNSKNTVFLQMNSLRVEDTAVYYCAKGPSAYYYGLDLWGQGTITVTVSS

NI-302.37C12 VK (последовательность вариабельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIVMTQSPLSLPVTLPGEFASISCRSSQSLHNSGYNLYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSTRASGVPRDFSG
 -----CDR3-----FR4-----
 SSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGLQTYTTFGQGTKLEIK

(N) NI-302.55D8 VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----
 QVQLVQSGSEVKKPGASVKVSKASGYTFDTDYIHWVRQAPGQGLEWMGRINPNNGGTNYAQNFQGWVT
 --FR3-----CDR3-----FR4-----
 MTRDTSISTAYMELSLRLSDDTAVYYCARVGGELLREGGYHYMDVWGKGTITVTVSS

NI-302.55D8 VL (последовательность вариабельной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGNSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIFDNTNRPSPGVPRDFSGSKS
 -----CDR3-----FR4-----
 GTSASLAITGLQAEDEANYHCQSYDNSLSGSWVFGGGTKLTVL

(O) NI-302.7A8 VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCVASGFIFRNSWMTWVRQDPGKLEWVANIKEDGSRTYYVDSVKGRFT
 -----CDR3-----FR4-----
 ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYNSGIYYFPGDYWGQGTITVTVSS

NI-302.7A8 VK (последовательность вариабельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DVVMTQSPLSLPVTLPGEFASISCRSSQSLVSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRDGSVPDRDFSG
 -----CDR3-----FR4-----
 SSGSGTDFTLRISRVEAEDVGIYYCMQGTHTWPGTFGQGTKVEIK

(P) NI-302.78H12 VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCLVSSYSISNGYYWGWIROPKGLLEWIGSIYHNGNTYYNPSLKSRVI

-----CDR3-----FR4-----
ISVDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAMPSATYYYGSGTQFHAFDVWGQTTVTVSS

NI-302.78H12 VL (последовательность вариабельной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSRDVGNVYVSWYQQHPGGEVPKLIIDVSEKPSGVPDRFSGSKS

-----CDR3-----FR4-----
GNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSYTFEVFGGGTKLTVL

(Q) NI-302.71F6 VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3--
QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSLSGYYWSWIRQPPKGLLEWIGEVNHSGGTNLNSSLKSRVII

-----CDR3-----FR4-----
SVDKSKKQFSLKLSVTAADTAMYFCARGYSYDPKYYFDSWSQGLTVTVSS

NI-302.71F6 VL (последовательность вариабельной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
QSALTQPASVSGSPGQAITISCTGTSSDIGSYDFVSWYQQDPGKAPKVIIYGVNKRPSGVSNRFGSGSKS

-----CDR3-----FR4-----
GNTASLTISGLQADDEADYYCCSYAGSTTWVFGGGTKLTVL

(R) NI-302.11H6 VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
EVQLVQSGAVMKKPGDSVRVSCRASTYSFSTYSFTWVRQVPGGLEWGMWISAYNGHTNYVDSFQGRIT

-----CDR3-----FR4-----
LTTDTSASTAYMELRSLRSDDTAIYYCAAVDTTYYYYGMDVWGQGLTVTVSS

NI-302.11H6 VL (последовательность вариабельной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
QTVVTQEPTFSVSPGGTVTLTCLALRFGSVSSSYPSWFFQQTGQAPRTLIYSTNTRSSGVPARFSGSIL

-----CDR3-----FR4-----
GNKAALTIAGAQAQDEADYYCVLYMGSGIGVFGGGTKLTVL

(S) NI-302.3D8 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCEASGFI FKTYAMSWVRQLPGRGLEWVSAISATGGSTFYAESVKGRLT

-----CDR3-----FR4-----
 ISRDTAKNTVYLQMNNLRAEDTAMYYCAKGSTAVYLFDSWGQGTIVTVSS

NI-302.3D8 VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTLTCRASQDIRNFLAWIQQKPGKPPKSLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGT

-----CDR3-----FR4-----
 DFTLTISLHPEDFATYYCQQFYNYPPTFGQGTKVEIK

(T) NI-302.18A1 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR
 QLQLQESGPGLVKPSSEALSLTCTVSGGSITTDYYYWGWIQSPGKGLEWVGTYIFGGATYYNPISLRNV

3-----CDR3-----FR4-----
 SISVDTSNTRLRLISLSAADTAVYYCARVGYLDRSGLLVGQGTIVTVSS

NI-302.18A1 VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPPLSVPTPGEPASISCRSSQSLHNNNGYNYLDWYLLKPGQSPQLLIYLGSTRASGVDFRFA

-----CDR3-----FR4-----
 SSGSGTDTLEISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGRGTKVEIK

(U) NI-302.8F1 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----F
 EVQLVESGGGLVKPGGSLTISCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGHIHQAEGGTSDYAAPVKGR

R3-----CDR3-----FR4-----
 FTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCIPPPYYYGLDVWGQGTIVTVSS

NI-302.8F1 VL (последовательность варибельной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGASSDVGTLDVSWYQQHPGKAPKLIIEVFNKRPSGVSYRFSASKS

-----CDR3-----FR4-----
 ANTASLTISGLQAEDEAEYYCCSYAGYSTVFGGGTKLTVL

(V) NI-302.52C9 VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3-
 EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTVSDTYMSWVRQAPGKGLEWVSGIHAGGETYYADSVKGRFTI

-----CDR3-----FR4-----
 SRDNSKNTLYLQMNRLTPEDTAVFYCARHYYGNDDDTDYWGQGLVTVSS

NI-302.52C9 VK (последовательность вариабельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DVVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYVQKPGQSPQLLIYLGSTRASGVDPDRFSG

-----CDR3-----FR4-----
 SGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCLQAQQIPWTFGQGTKVEIK

(W) NI-302.46C9 VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR
 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGASVSSGAYYWSWIRQPAKRLIEWIGRVYPTWSTNYPNPSLESRV

3-----CDR3-----FR4-----
 TISLDTSNQFSLKLTSLTAADTAVYYCAREAPGDYDAAPLAYWGQGLVTVSS

NI-302.46C9 VK (последовательность вариабельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQYISHYLNWYRQKPGKAPQLVIYAASSLQSEVPSRFSGSGSGP

-----CDR3-----FR4-----
 EFTLTISLQPEDFATYYCQQSYYTPRTFGQGTKLEIK

(X) NI-302.64E5 VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----F
 EVQLVETGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDQAWMSWVRQVPGKGLEWVGRIKTKTEGEATDYAAPVRGR

R3-----CDR3-----FR4-----
 FTISRDDSEDTVFLQMNSLKTEDTALYYCTSTGVLAADVYWGQGLVTVSS

NI-302.64E5 VK (последовательность вариабельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQLTQSPDSLAVSLGERATMTCKSSQSLFYSYNNENYLAWYQQRPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFS

-----CDR3-----FR4-----
 GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYYSTPQTFGQGTKVDIK

(Y) NI-302.7D8 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYNFNNYAINWLRQAPGGLEWMGWINTITGHPTYAQGFKGRFV

-----CDR3-----FR4-----
 FSLDTSVSTAYLQISSLPEDTAVYYCARTYSNYGEFDYWGQGTLVTVSS

NI-302.7D8 VL (последовательность вариательной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSALTQPASVSGSRGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQYPGKAPKLIIEGSERPSGVSNRFGSGSKS

-----CDR3-----FR4-----
 GNTASLTISGLQAEDEADYCCSYAGTTTFVLFGGGTKLTVL

(Z) NI-302.72F10 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVETGGGFVQPGGSLRLSCAASGFNFGSYAMSWVRQAPGKLEWVSDISGIGSNTYYADSVKGRFT

-----CDR3-----FR4-----
 ISRDNSDNTLYLDMSSLRAEDTARYYCAKDRKRSGWYEQWQGTLVTVSS

NI-302. 72F10 VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVMTQSPATLTLSLSPGERATLSCRASQSISAYLGWYQQKPGQAPRLLIYDASIRATGIPDRFGSGSGGT

-----CDR3-----FR4-----
 DFTLTISLLEPEDSAVYYCHQRSKWPLTFGGGTKVEIK

(AA) NI-302.4A6 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYAMSWVRQAPGKLEWVSTISGSGGSTYYADSVKGRFS

-----CDR3-----FR4-----
 ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKVTELYGANSYYYYMDVWGKGTTVTVSS

NI-302.4A6 VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFGSGSGG

-----CDR3-----FR4-----
 TDFTLTISRLEPEDFAMYQCQLYGNSQTFGQGTKVEIK

(AB) NI-302.12H2 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVQSGGGIVQPGGSLRLSCEASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSVISGTGGSTYYADSVKGRFT
 -----CDR3-----FR4-----
 ISRDNMNTLYLQMNSPRADDTAVYYCAKDLRKISGPLYYYGMDVWGQGTITVTVSS

NI-302.12H2 VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSGYLA~~WYQQKPGQAPRLLIYG~~ASTRATGIPDRFSGSGSG
 -----CDR3-----FR4-----
 TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGASSYTFGQGTKLEIK

(AC) NI-302.8M1 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFIYYMHWVRQAPQGLEWMGGISPSGAHTMYAQNFQGRVT
 -----CDR3-----FR4-----
 VTRDTSTSTVYME~~LSLR~~SEDTAVYYCARGSTVTNYPFDYWGQGLTVTVSS

NI-302.8M1 VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLA~~WYQQKPGKVPKLLI~~FAASTLQSGVPSRFSGSGSGT
 -----CDR3-----FR4-----
 DFTLTIS~~SLQ~~PE~~DV~~ATYYCQNYNSGPPPFPGPGTKVDIK

(AD) NI-302.33C11-PIMC VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 QVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFRFSDFGMHWVRQAPGKGLEWLALIWDGGYKYYADSVKGRFT
 -----CDR3-----FR4-----
 ISRDN~~SKNTMFLQ~~MNSLRAEDTAVYYCATHLEYSRTTCYLGHWGQGLTVTVSS

NI-302.33C11-PIMC VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQLTQSPSFLSASVGDTVTFTCRASQGISDYLA~~WFQQKPGIAPKLLIYA~~ASTLQ~~TG~~VPSRFSGSGSGT
 -----CDR3-----FR4-----
 EFTLTIRSLQSEDFGTYCQQLKTPYTFGQGTKLEIK

(AE) NI-307.63F3-PIMC VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSNQSLFYSSNNNNYLAWYQHKSGQPPKLLVYWGSTRESGVPDFRS
 -----CDR3-----FR4-----
 GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAIYYCHQYYHNPYTFGQGTKLEIK

NI-307.63F3-PIMC-NS VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYSSNNNNYLAWYQHKSGQPPKLLVYWGSTRESGVPDFRS
 -----CDR3-----FR4-----
 GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAIYYCHQYYHNPYTFGQGTKLEIK

NI-307.63F3-PIMC-SG VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSNQGLFYSSNNNNYLAWYQHKSGQPPKLLVYWGSTRESGVPDFRS
 -----CDR3-----FR4-----
 GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAIYYCHQYYHNPYTFGQGTKLEIK

NI-307.63F3-PIMC-NQ VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSQSLFYSSNNNNYLAWYQHKSGQPPKLLVYWGSTRESGVPDFRS
 -----CDR3-----FR4-----
 GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAIYYCHQYYHNPYTFGQGTKLEIK

(AF) NI-302.35C1-PIMC VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDNQFAWYQQKPGQAPRLLIYDASRRAPGIPDRFSGSGSGT
 -----CDR3-----FR4-----
 DFTLTISSEPEDFAIYYCQHRYTWLYTFGQGTKLEIK

(AG) NI-302.31F11-PIMC VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIVMTQSP¹LSLPVAPGEPASISCRSSQSL²LYSNGYNYLDWYLQKPGKPPQLLVYLGS³DRASGV⁴PD⁵RFSG
 -----CDR3-----FR4-----
 SSGSGKDFTLNISRVEAEDVG⁶VYYCMQGLQSP⁷WTFGQGT⁸KVEIK

(AH) NI-302.2A2-PIMC VK (последовательность вариательной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSL²LYTSKNKDSKNYLGWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV⁴PD
 -----CDR3-----FR4-----
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYTTPQFGG⁷GTKVEIK

(AJ) NI-302.74C11-PIMC VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----
 QVQLVQSGTEVQKPGASVKVSCKASGYSFTGYFLHWVRQAPGGLEWMGWINPNSGDTNYAEKFRGRII
 -----CDR3-----FR4-----
 MTRDTSVSTAHMELSSLRFDDTALYYCTREAPDPAETDVWGQGT¹⁰TVTVSS

NI-302.74C11-PIMC VL (последовательность вариательной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDAVPKQYIY²WYQQKPGQAPILVIYKDTQRPSGIPERFSGSNSGTT
 -----CDR3-----FR4-----
 VTLTITGVQADDEGDYYCQSADSSATWVFGG⁷GTKLTVL

NI-302.74C11-PIMC VL (последовательность вариательной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----
 EVQLVESGGGLVHPWGSRLRLSCAASGFVS²NYAITWVRRAPGKGLQYISVIYRDGR³TIYGD⁴SVRG⁵RTI
 -----CDR3-----FR4-----
 SRDDSKNTLYLQMNSLRFEDTAVYYCARAHGQYYYGVDVWGQGT¹⁰TVTVSS

NI-302.39G12-PIMC VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIVMTQSP~~PLSLSVSPGEPASISCRSSQSL~~HSNGYN~~LDWYRQKPGQSPQLLIYLSSNRPSGVPDRFSA~~
 -----CDR3---FR4-----
 SSGSGTEFTLQISRVEAEDVG~~VYYCMQSLQTF~~TFGGGTKVEIK

(AL) NI-302.11A4-PIMC VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPGTL~~SLSPGERATLSCRASQSVSSSYFAWYQQKPGQAPRLLIYGT~~SRRA~~TAIPDRFSGSGSG~~
 -----CDR3---FR4-----
 TDFTLTISRLEPEDFAVYYC~~QQYGSSWT~~FGPGTKVEIK

(AM) NI-302.22H9-PIMC VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIVMTQSP~~PLSLSVSPGEPASISCRSSQSL~~HSNGYN~~LDWYRQKPGQSPQLLIYLN~~SNRASGVPDRFSG
 -----CDR3---FR4-----
 SSGSGTEFTLTISRVEAEDVG~~VYYCMQSLQTF~~TFGGGTKVEIK

(AN) NI-302.44D7-PIMC VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIGYSDTSTYYADSVKGRFT~~
 -----CDR3-----FR4-----
 VSRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~GTRDY~~YGM~~DVWGQGT~~TVTVSS

(AO) NI-302.78H12-PIMC VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCLVSSYSIS~~NGYYGWIRQPPGKGLEWIGSIYHNGNTYYNPSLKS~~RV
 -----CDR3-----FR4-----
 ISVDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAMP~~SATYYYGSGTQFHAFDVWGQGT~~MTVTVSS

(AP) NI-302.15E8 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAVSGFTVSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYTSSSRNTKKYADSVKGRF

3-----CDR3-----FR4-----
 TISRDNARNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARAGDFGELLTGEGYYGMDVWGQGTITVTVSS

NI-302.15E8 VL (последовательность варибельной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 SYELTQPPSVSVSPGQTATITCSGDELGDKYVGWYQQKPGQSPLLVIYQDAKRPSGIPERFSGSNSGNT

-----CDR3-----FR4-----
 ATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSGTMVFGGGTRLTVL

(AQ) NI-302.15D3 VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3-----
 EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRISNDGSSKTYADSVKGRFT

-----CDR3-----FR4-----
 ISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAILGGYCSSTSCRPFNDNWGQGTITVTVSS

(AR) NI-302.15D3 VL (последовательность варибельной области легкой цепи VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGYNVSWYQQHPGKAPKLMIFDVSNRPSGISNRFSGSKS

-----CDR3-----FR4-----
 GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSDTWVFGGGTKLTIL

(AS) NI-302.64E5-PIMC VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----F
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDQAWMSWVRQVPGKGLEWVGRIKTKTEGEATDYAAPVRGR

R3-----CDR3-----FR4-----
 FTISRDDSEDTVFLQMNSLKTEDTALYYCTSTGVLAADVYWGQGTITVTVSS

NI-302.64E5-PIMC VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATMTCKSSQSLFYSYNNENYLAWYQQRPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFS
 -----CDR3-----FR4-----
 GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPQTFFGGTKVEIK

(AT) NI-302.72F10-PIMC VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVESGGGFVQPQGSRLRLSCAASGFNFGSYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISGIGSNTYYADSVKGRFT
 -----CDR3-----FR4-----
 ISRDNSDNTLYLDMSSLRAEDTARYYCAKDRKRSGWYEQWGQGTTLVTVSS

NI-302.72F10-PIMC VK (последовательность варибельной области легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPATLTLSLGERATLSCRASQSI SAYLGWYQKPGQAPRLLIYDASIRATGIPDRFSGSGSGT
 -----CDR3-----FR4-----
 DFTLTISLLEPEDSAVYYCHQRSKWPLTFGGGKVEIK

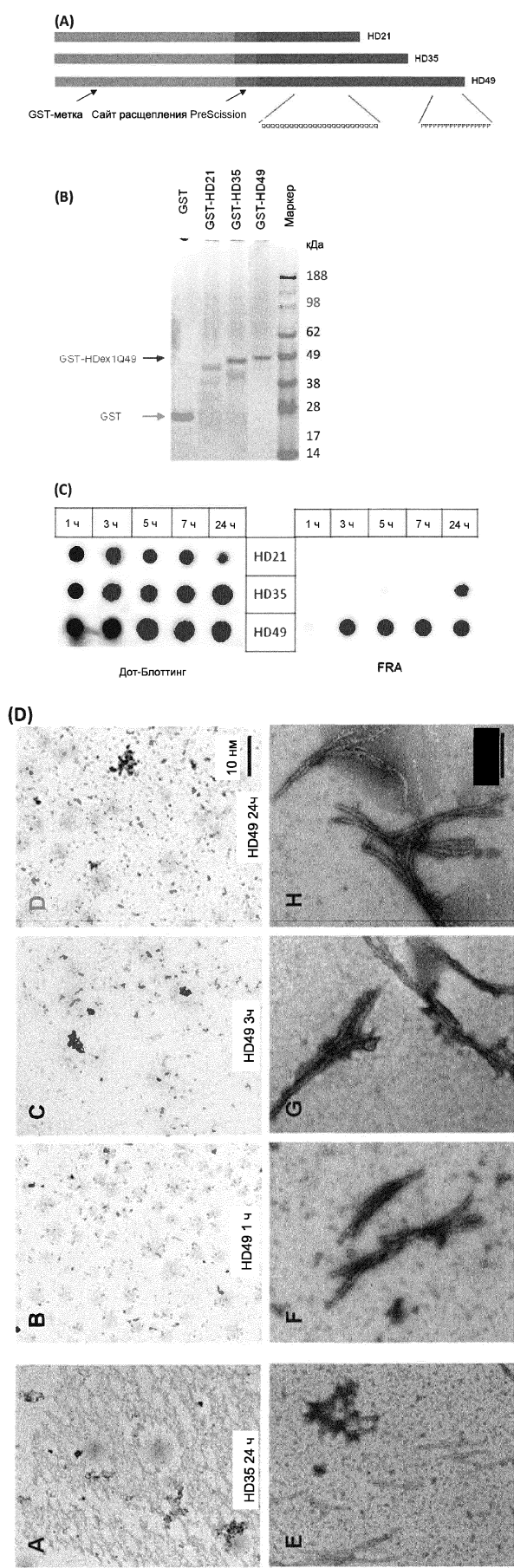
(AU) NI-302.12H2-PIMC VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCEASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSVISGTGGSTYYADSVKGRFT
 -----CDR3-----FR4-----
 ISRDNSMNTLYLQMNSPRADDTAVYYCAKDLRKISGPLYYYGMDVWGQGTTLVTVSS

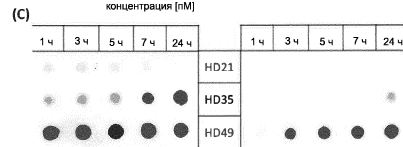
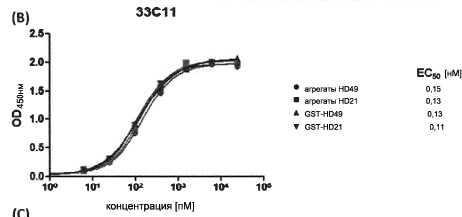
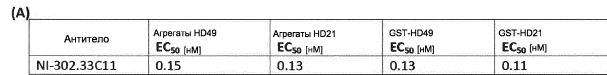
NI-302.8M1-PIMC VH (последовательность варибельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTIYYMHWVRQAPGQGLEWMGGISPSGAHTMYAQNFQGRVT
 -----CDR3-----FR4-----
 VTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGSTVTNRYRPFDYWGQGTTLVTVSS

Фиг. 1

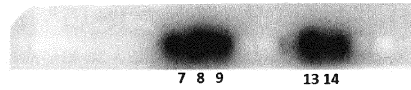


Фиг. 2

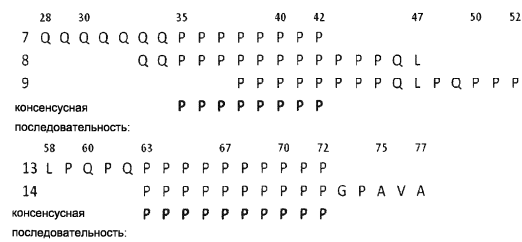


Фиг. 3

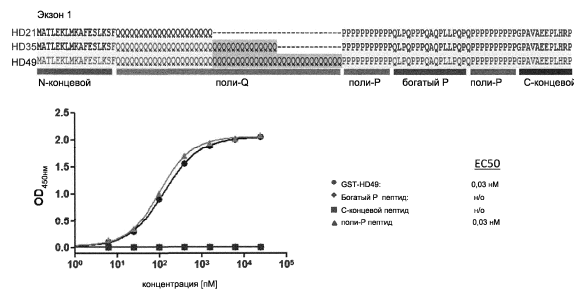
33C11 1 МКГ/МЛ



Только 2-е АТ козы против (Н+L)человека 1:20 000

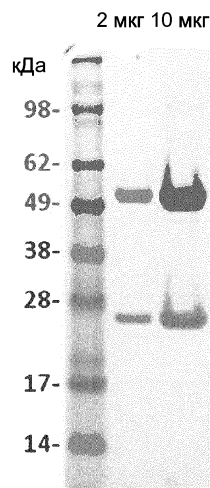


ФИГ. 4

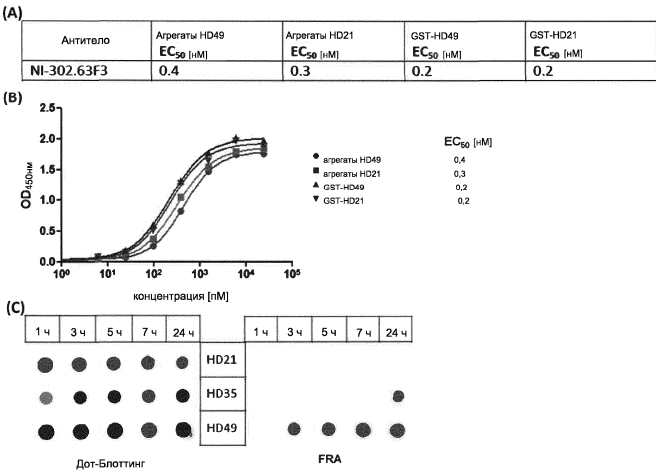


ФИГ. 5

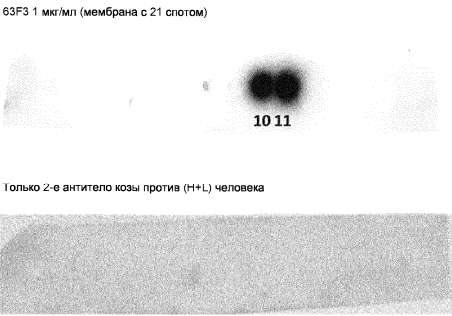
046697



Фиг. 6



Фиг. 7



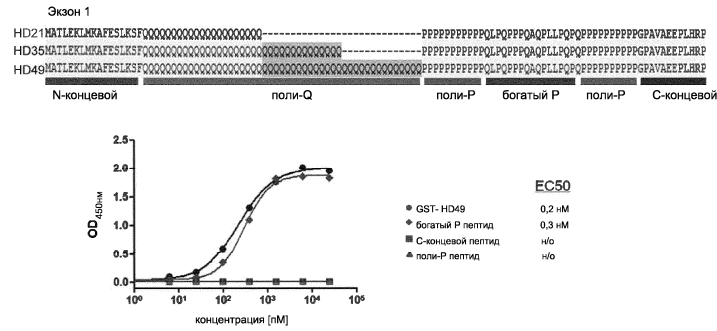
43 47 50 52 55 57 60 62

10 P P P Q L P Q P P P Q A Q P L

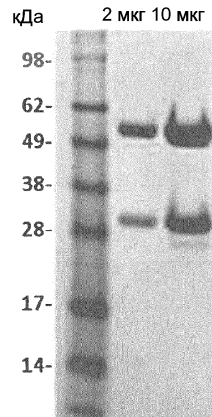
11 P Q P P P Q A Q P L L P Q P Q

консенсусная последовательность: P Q P P P Q A Q P L

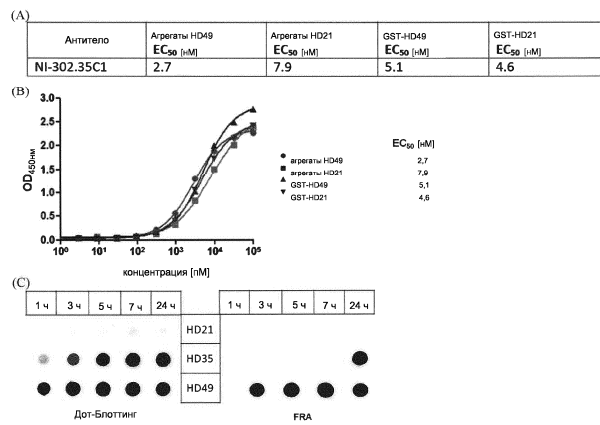
Фиг. 8



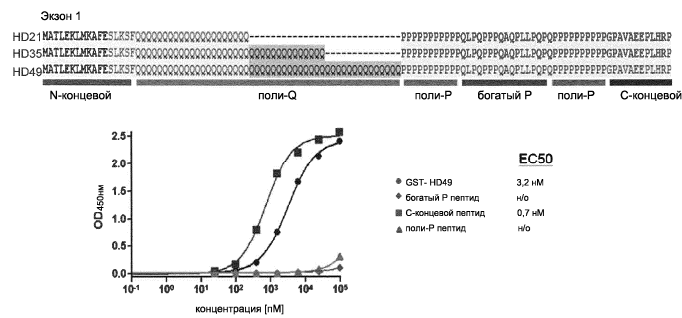
ФИГ. 9



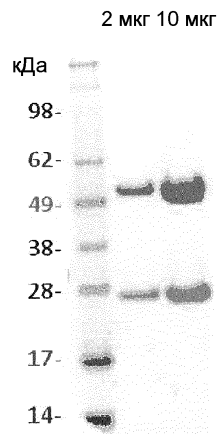
ФИГ. 10



ФИГ. 11



ФИГ. 12

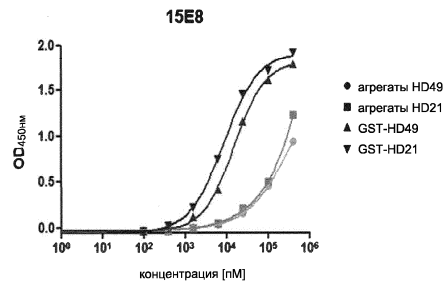


Фиг. 13

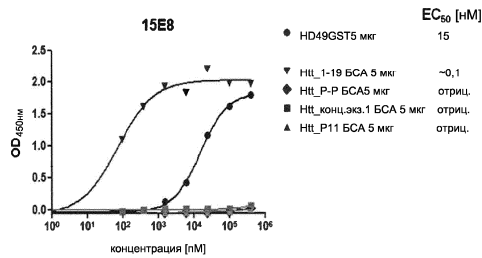
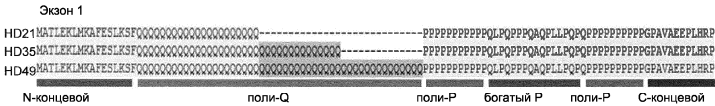
(A)

Антитело	Агрегаты HD49	Агрегаты HD21	GST-HD49	GST-HD21
	EC ₅₀ [нМ]	EC ₅₀ [нМ]	EC ₅₀ [нМ]	EC ₅₀ [нМ]
NI302.15E8	>100	>100	15	9.3

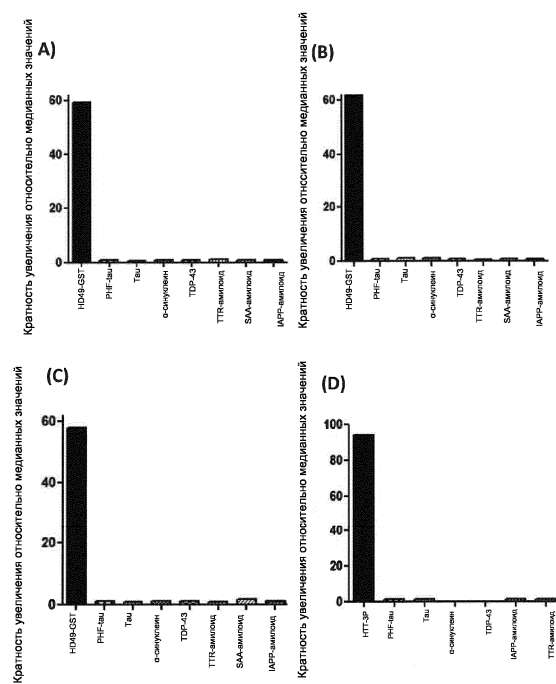
(B)



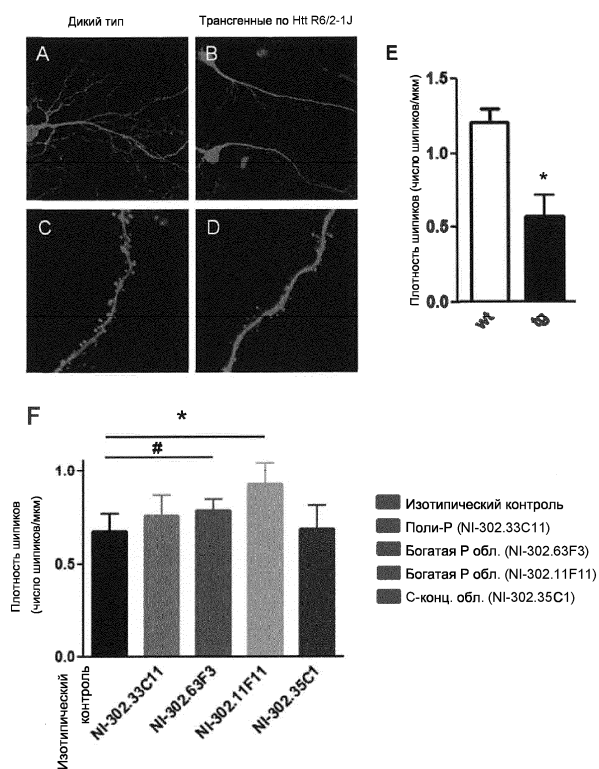
Фиг. 14



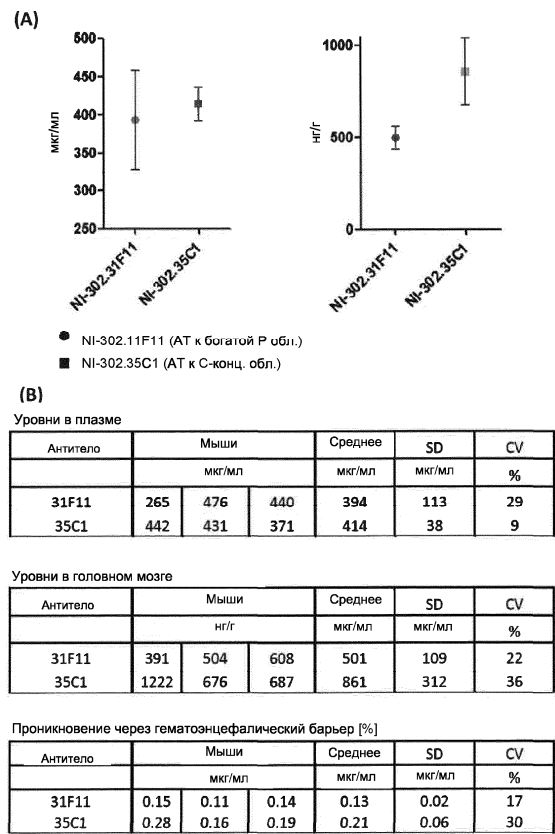
Фиг. 15



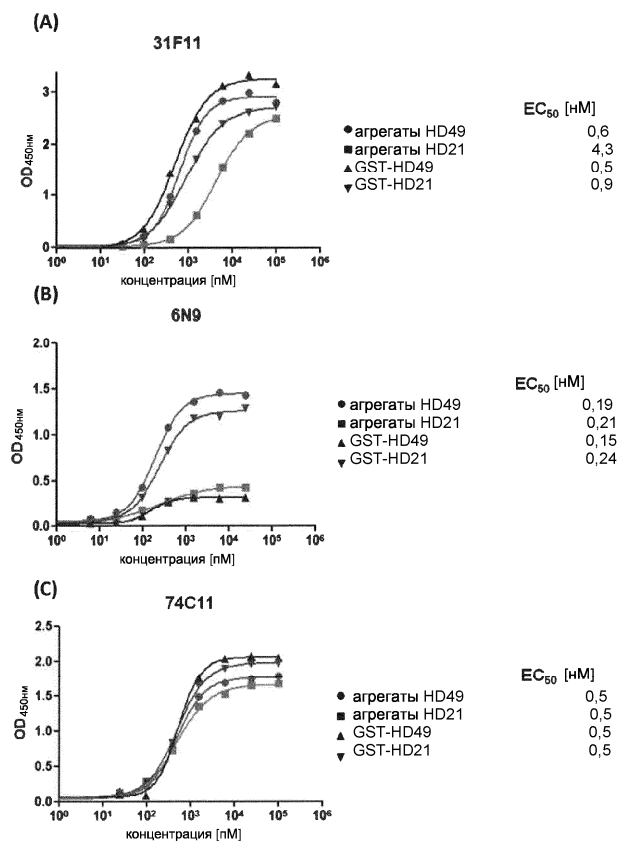
Фиг. 16

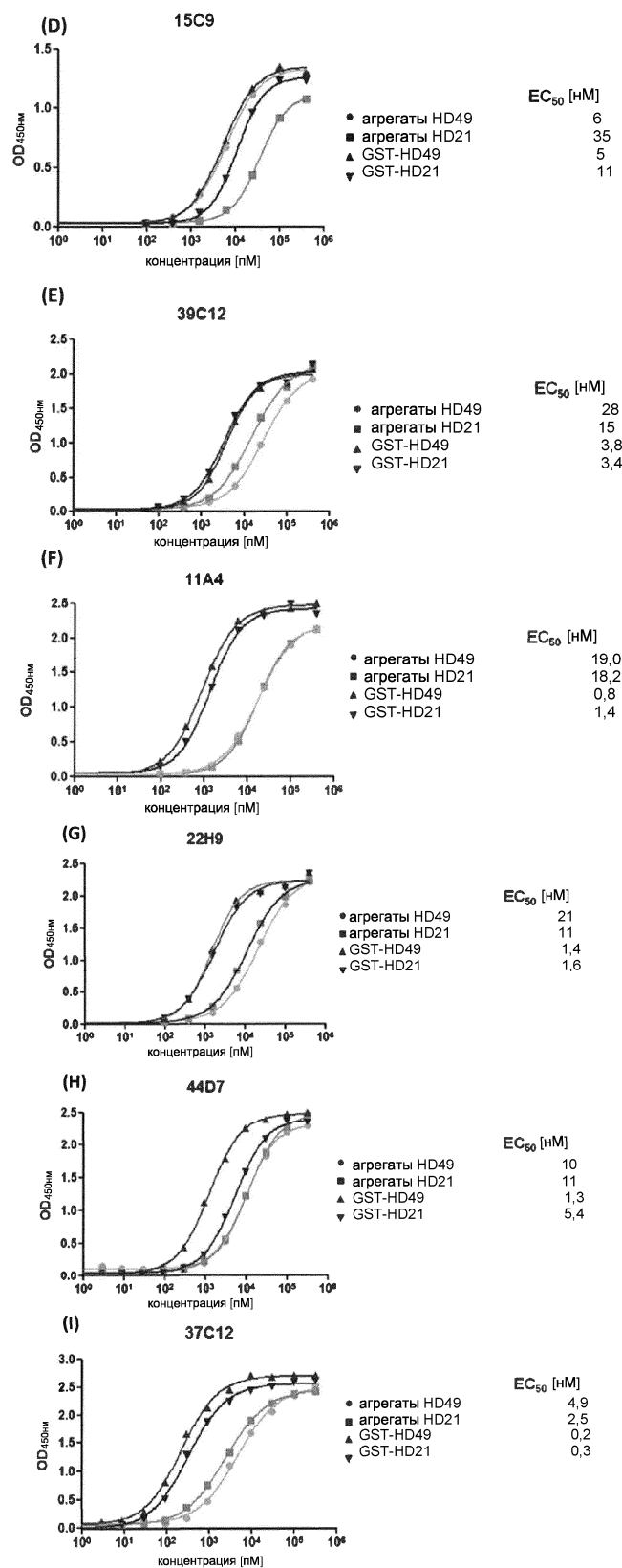


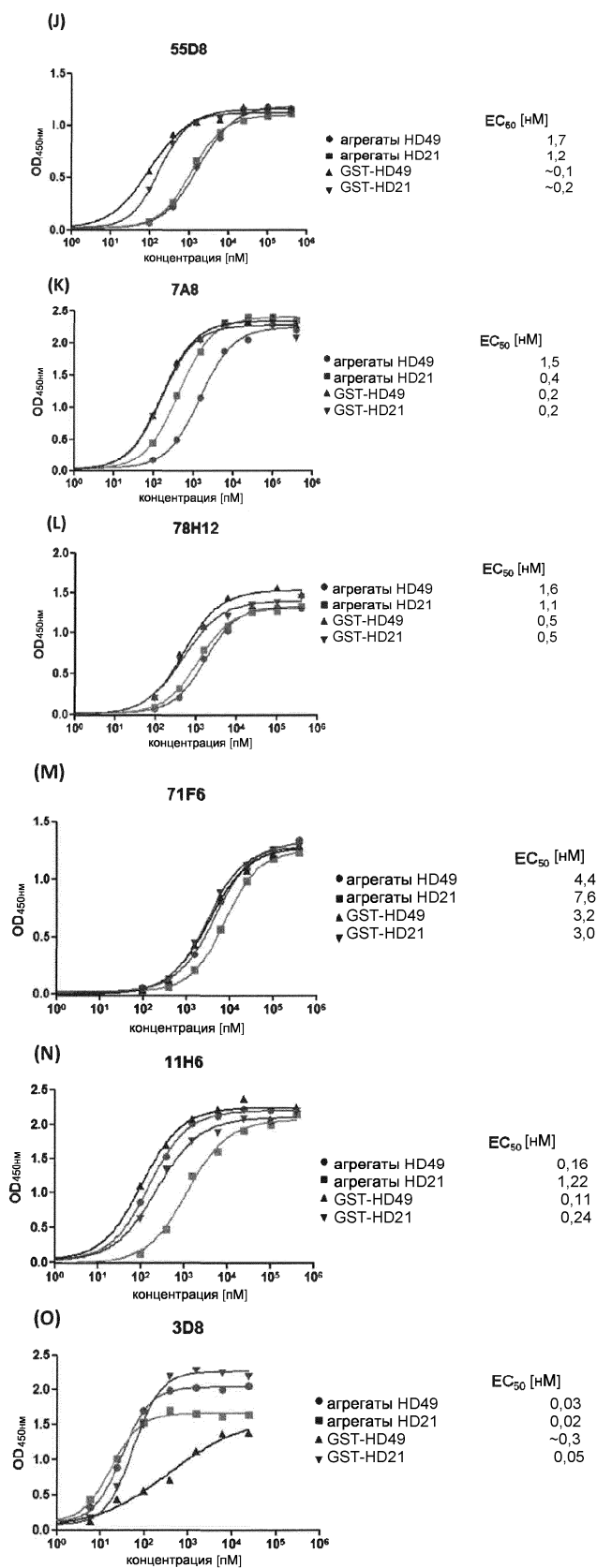
Фиг. 17

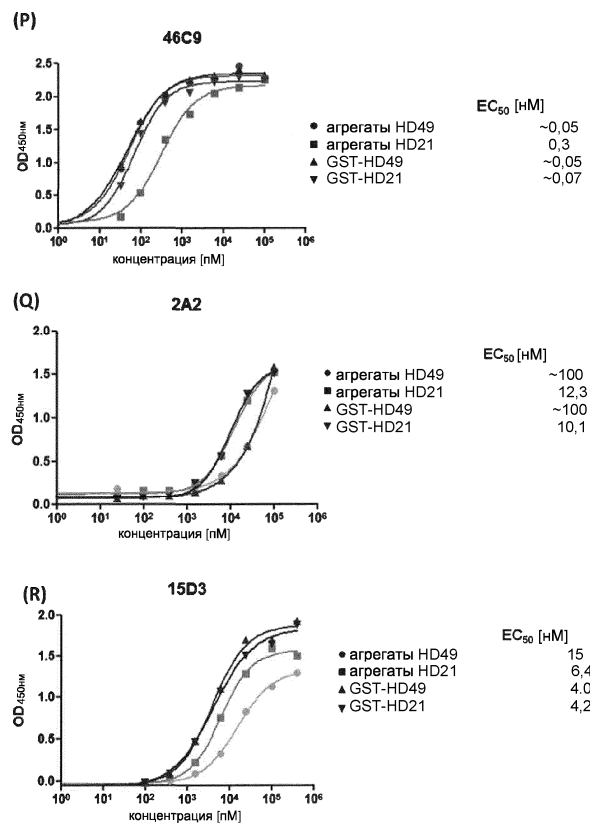


Фиг. 18







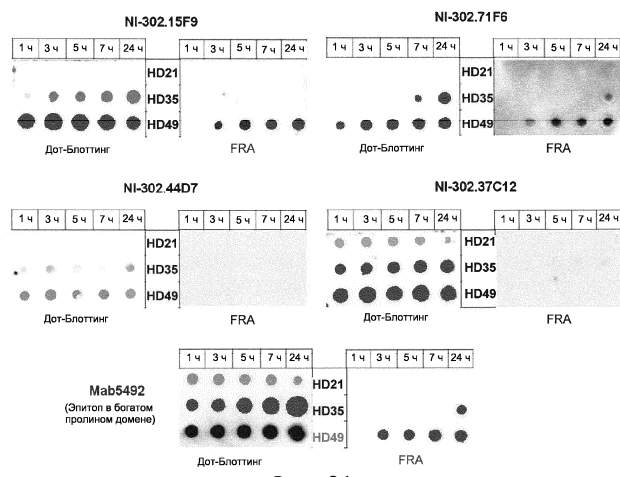


Фиг. 19

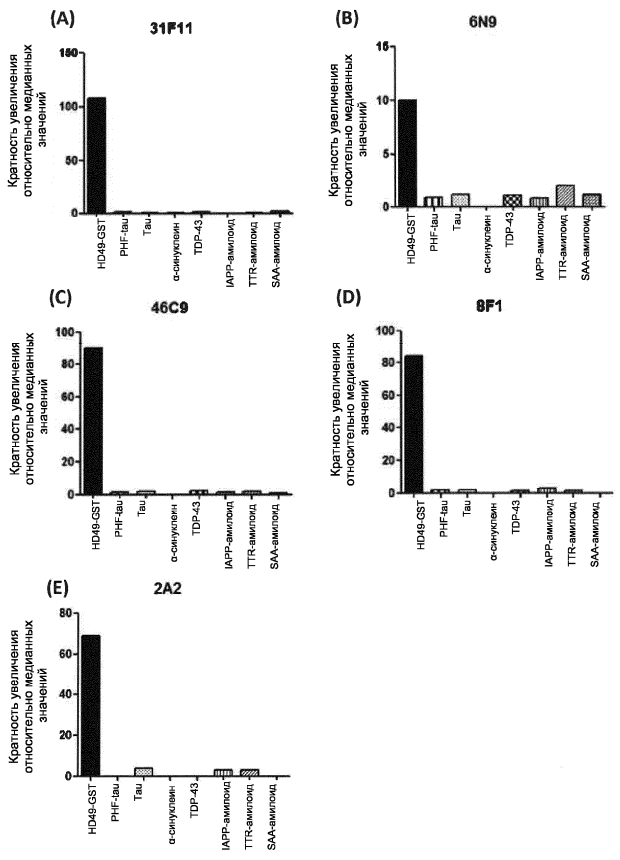
Антитело	Агрегаты HD49, EC50 [нМ]	Агрегаты HD21, EC50 [нМ]	GST-HD49, EC50 [нМ]	GST-HD21, EC50 [нМ]	Пептид, EC50 [нМ]	Эпитоп
NI-	0,15	0,13	0,13	0,11	0,1 (поли-Р)	PPPPPPPP
NI-	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3 (богатая Р	PQPPPPQAQPL
NI-	0,6	4,3	0,5	0,9	0,5 (богатая Р	PPPQLPQPPP
NI-	>100	12,3	>100	10,1	1,4 (богатая Р	QAQPLLPQPP
NI-	15	6,4	4,0	4,2	1,2 (богатая Р	PPPQLPQPPQA
NI-	2,7	7,9	5,1	4,6	0,7 (конц.экз.)	PPGPAVAEEPLH
NI302.15	>100	>100	15	9,3	0,1 (N-конц.)	KAFESLKSFQQ
NI-	1,6	0,7	0,05	1,4	0,1 (богатая Р	PQPPPPQAQPL
NI-	17	>100	6	51	н/о (Q/P)	QQQQQQQPPP
NI-	26	4	>100	10	0,1 (конц.экз.)	PPPGPAVAEEPL
NI-	3	3	6	3	отриц.	нет сигнала на
NI-	0,04	0,05	0,04	0,04	отриц.	нет сигнала на
NI-	0,003	0,002	0,003	0,002	отриц.	нет сигнала на
NI-	0,19	0,21	0,15	0,24	отриц.	нет сигнала на
NI-	0,5	0,5	0,5	0,5	н/о	PPPPPPPPPP
NI-	6	35	5	11	н/о	PPPPPPPPPP

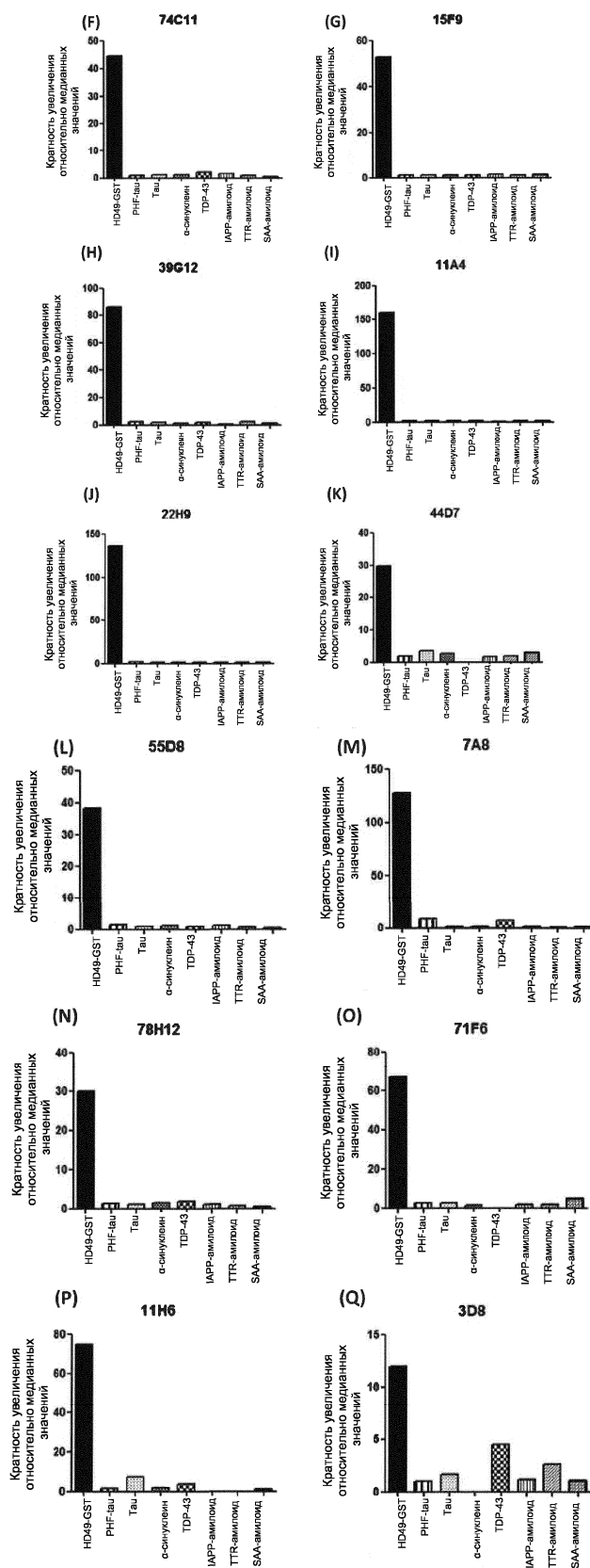
Антитело	Агрегаты HD49, EC50 [нМ]	Агрегаты HD21, EC50 [нМ]	GST-HD49, EC50 [нМ]	GST-HD21, EC50 [нМ]	Пептид, EC50 [нМ]	Эпитоп
NI-302.39G12	28	15	3,8	3,4	н/о	PPPPPPPPPP
NI-302.11A4	19	18	0,8	1,4	н/о	PPPPPPPPPP
NI-302.22H9	22	11	1,4	1,6	н/о	PPPPPPPPPP
NI-302.44D7	10	11	1,2	5,4	н/о	PPPPPPPP
NI-302.37C12	4,9	2,5	0,23	0,33	н/о	PPPPPPPPPP
NI-302.55D8	1,7	1,2	0,1	0,2	н/о	PPPPPPPPPP
NI-302.7A8	1,5	0,4	0,2	0,2	н/о	PPPPPPPP
NI-302.78H12	1,6	1,1	0,5	0,5	н/о	PPPPPPPPPP
NI-302.71F6	4,4	7,6	3,2	3,0	н/о	PPPPPPPPPP
NI-302.11H6	0,2	1,2	0,1	0,2	н/о	PPPPPP
NI-302.3D8	0,03	0,02	0,3	0,05	н/о	PPPPPPPP
NI-302.18A1	0,03	0,02	0,07	0,04	н/о	PPPPPP
NI-302.8F1	1,9	1,6	0,4	0,8	н/о	Поли-Р
NI-302.52C9	30	28	4,9	10,2	н/о	PPPPPP
NI-302.46C9	0,05	0,3	0,05	0,07	н/о	PPPPPPPP

Фиг. 20



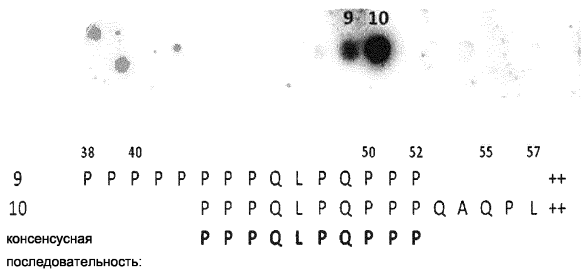
Фиг. 21



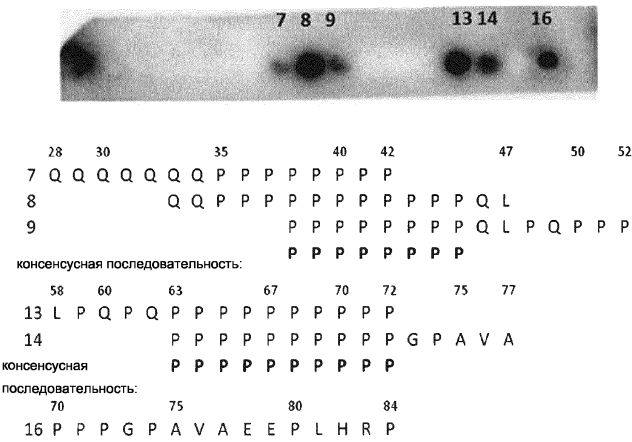


Фиг. 22

(A) NI-302.31F11 1 мкг/мл (мембрана с 21 спотом)

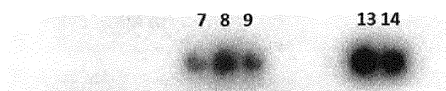


(B) NI-302.15F9 1 мкг/мл (мембрана с 16 спотами)



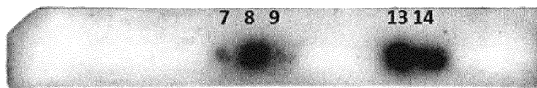
046697

(C) NI-302.11A4 1 мкг/мл (мембрана с 16 спотами)



28 30 35 40 42 47 50 52
 7 Q Q Q Q Q Q Q P P P P P P P P
 8 Q Q P P P P P P P P P P Q L
 9 P P P P P P P P Q L P Q P P P
 консенсусная P P P P P P P P P P
 последовательность:
 58 60 63 67 70 72 75 77
 13 L P Q P Q P P P P P P P P P
 14 P P P P P P P P P P G P A V A
 консенсусная P P P P P P P P P P
 последовательность:

(D) NI-302.39G12 1 мкг/мл (мембрана с 16 спотами)



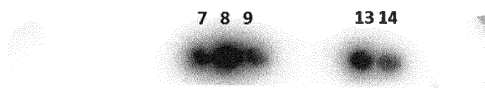
28 30 35 40 42 47 50 52
 7 Q Q Q Q Q Q Q P P P P P P P P
 8 Q Q P P P P P P P P P P Q L
 9 P P P P P P P P Q L P Q P P P
 консенсусная P P P P P P P P P P
 последовательность:
 58 60 63 67 70 72 75 77
 13 L P Q P Q P P P P P P P P P
 14 P P P P P P P P P P G P A V A
 консенсусная P P P P P P P P P P
 последовательность:

(E) NI-302.11A4 1 мкг/мл (мембрана с 16 спотами)



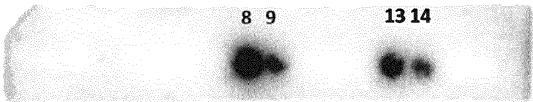
28 30 35 40 42 47 50 52
 7 Q Q Q Q Q Q Q P P P P P P P P
 8 Q Q P P P P P P P P P P Q L
 9 P P P P P P P P Q L P Q P P P
 консенсусная P P P P P P P P P P
 последовательность:
 58 60 63 67 70 72 75 77
 13 L P Q P Q P P P P P P P P P
 14 P P P P P P P P P P G P A V A
 консенсусная P P P P P P P P P P
 последовательность:

(F) NI-302.22H9 1 мкг/мл (мембрана с 16 спотами)



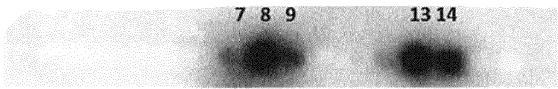
28 30 35 40 42 47 50 52
 7 Q Q Q Q Q Q Q P P P P P P P P
 8 Q Q P P P P P P P P P P Q L
 9 P P P P P P P P Q L P Q P P P
 консенсусная P P P P P P P P P P
 последовательность:
 58 60 63 67 70 72 75 77
 13 L P Q P Q P P P P P P P P P
 14 P P P P P P P P P P G P A V A
 консенсусная P P P P P P P P P P
 последовательность:

(G) NI-302.44D7 1 мкг/мл (мембрана с 16 спотами)



33 35 40 42 47 50 52
8 Q Q P P P P P P P P P P Q L
9 P P P P P P P P Q L P Q P P P
консенсусная P P P P P P P P Q L
последовательность:
58 60 63 67 70 72 75 77
13 L P Q P Q P P P P P P P P P
14 P P P P P P P P P P G P A V A
консенсусная P P P P P P P P P
последовательность:

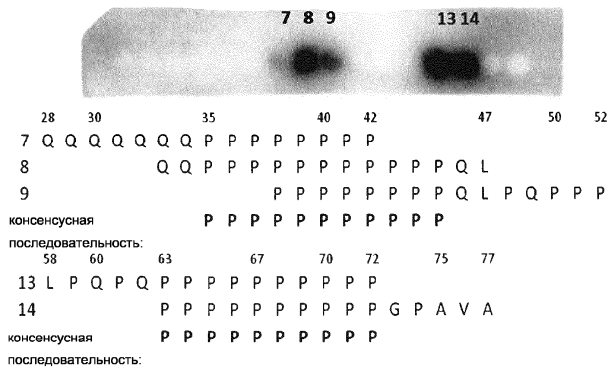
(H) NI-302.37C12 1 мкг/мл (мембрана с 16 спотами)



28 30 35 40 42 47 50 52
7 Q Q Q Q Q Q P P P P P P P P
8 Q Q P P P P P P P P P P Q L
9 P P P P P P P P Q L P Q P P P
консенсусная P P P P P P P P P P
последовательность:
58 60 63 67 70 72 75 77
13 L P Q P Q P P P P P P P P P
14 P P P P P P P P P P G P A V A
консенсусная P P P P P P P P P
последовательность:

046697

(I) 55D8 1 мкг/мл (мембрана с 16 спотами)

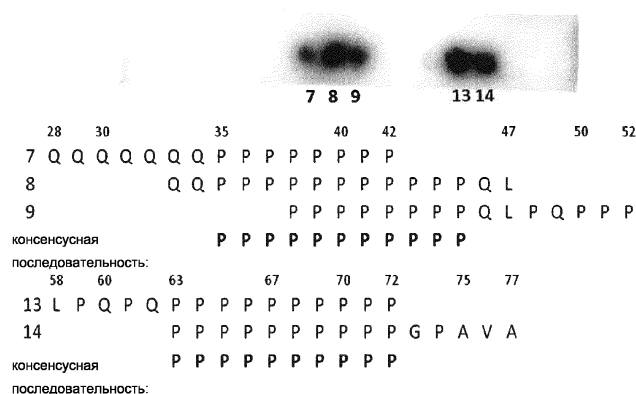


(J) 7A8 1 мкг/мл (мембрана с 21 спотом)

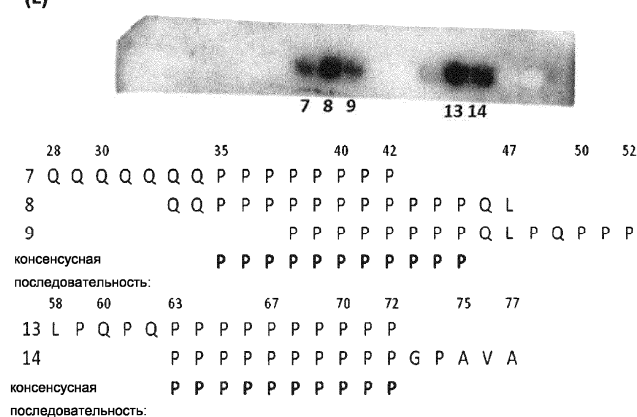


046697

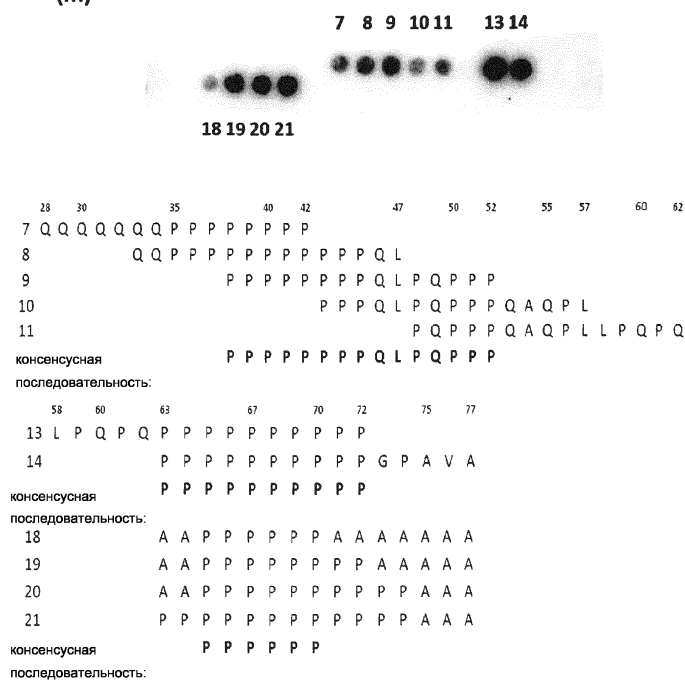
(K) NI-302.78H12 1 мкг/мл (мембрана с 16 спотами)



(L) NI-302.71F6 1 мкг/мл (мембрана с 16 спотами)

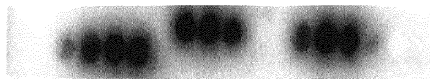


(M) NI-302.11P6 1 мкг/мл (мембрана с 21 спотом)



046697

(N) NI-302.18A1 1 мкг/мл (мембрана с 21 спотом)

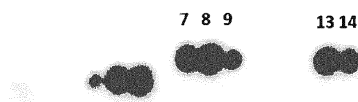


18 19 20 21

28 30 35 40 42 47 50 52
 7 Q Q Q Q Q Q Q P P P P P P P
 8 Q Q P P P P P P P P P P Q L
 9 P P P P P P P P Q L P Q P P P
 консенсусная последовательность: P P P P P P P P
 53 58 60 63 67 70 72 75 77
 12 Q A Q P L L P Q P Q P P P P
 13 L P Q P Q P P P P P P P P
 14 P P P P P P P P P P G P A V A
 консенсусная последовательность: P P P P P P P P
 18 A A P P P P P P A A A A A A
 19 A A P P P P P P P A A A A A
 20 A A P P P P P P P P A A A A
 21 P P P P P P P P P P P A A A

консенсусная последовательность: P P P P P P

(O) NI-302.D8 1 мкг/мл (мембрана с 21 спотом)



19 20 21

28 30 35 40 42 47 50 52
 7 Q Q Q Q Q Q Q P P P P P P P
 8 Q Q P P P P P P P P P P Q L
 9 P P P P P P P P Q L P Q P P P
 консенсусная последовательность: P P P P P P P P P
 58 60 63 67 70 72 75 77
 13 L P Q P Q P P P P P P P P
 14 P P P P P P P P P P G P A V A
 консенсусная последовательность: P P P P P P P P
 19 A A P P P P P P P P A A A A A
 20 A A P P P P P P P P P A A A A
 21 P P P P P P P P P P P A A A

консенсусная последовательность: P P P P P P P P

(P) NI-302.46C9 1 мкг/мл (мембрана с 21 спотом)

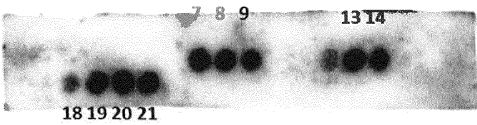


19 20 21

28 30 35 40 42 47 50 52
 7 Q Q Q Q Q Q Q P P P P P P P
 8 Q Q P P P P P P P P P P Q L
 9 P P P P P P P P Q L P Q P P P
 консенсусная последовательность: P P P P P P P P P
 58 60 63 67 70 72 75 77
 13 L P Q P Q P P P P P P P P
 14 P P P P P P P P P P G P A V A
 консенсусная последовательность: P P P P P P P P
 19 A A P P P P P P P P A A A A A
 20 A A P P P P P P P P P A A A A
 21 P P P P P P P P P P P A A A

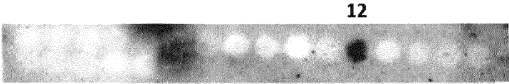
консенсусная последовательность: P P P P P P P P

(Q) NI-302.52D9 1 мкг/мл (мембрана с 21 спотом)



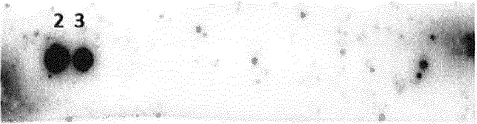
28 30 35 40 42 47 50 52
7 Q Q Q Q Q Q P P P P P P P
8 Q Q P P P P P P P P P Q L
9 P P P P P P P P Q L P Q P P P
консенсусная последовательность: P P P P P P P P P P
58 60 63 67 70 72 75 77
13 L P Q P Q P P P P P P P P
14 P P P P P P P P P G P A V A
консенсусная последовательность: P P P P P P P P P
18 A A P P P P P P A A A A A A
19 A A P P P P P P P A A A A A
20 A A P P P P P P P P P A A A
21 P P P P P P P P P P P A A A
консенсусная последовательность: P P P P P P P

(R) NI-302.2A2 1 мкг/мл (мембрана с 21 спотом)



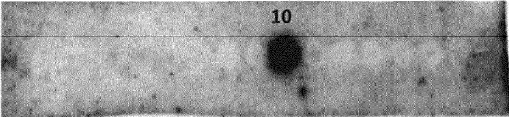
53 58 60 63 67
12 Q A Q P L L P Q P Q P P P P

(S) NI-302.15E8 1 мкг/мл (мембрана с 21 спотом)



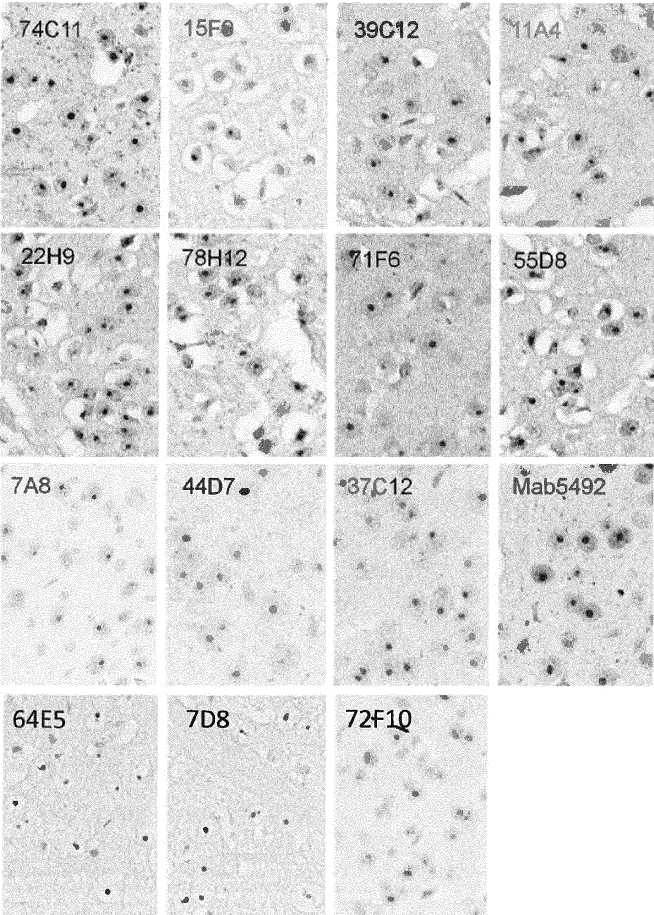
5 10 20
2 E K L M K A F E S L K S F Q Q
3 K A F E S L K S F Q Q Q Q Q Q
консенсусная последовательность: K A F E S L K S F Q Q

(T) NI-302.15D3 1 мкг/мл (мембрана с 21 спотом)

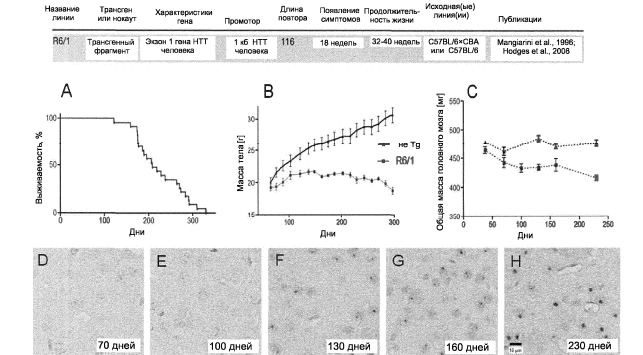


43 50 57
10 P P P Q L P Q P P P Q A Q P L

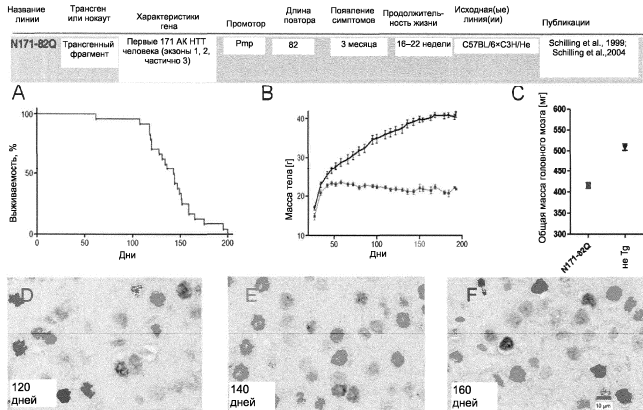
Фиг. 23



Фиг. 24

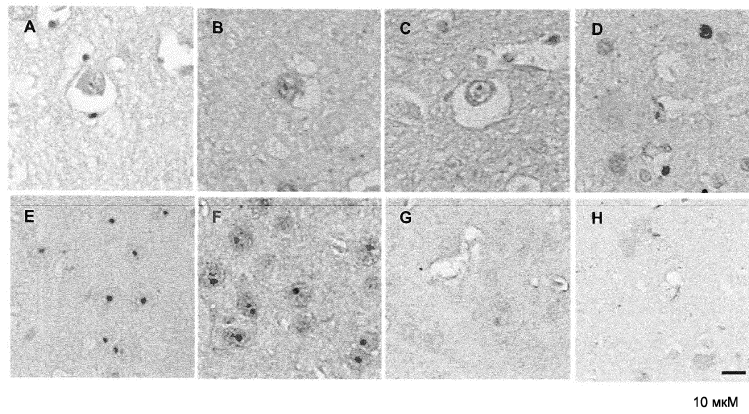


Фиг. 25

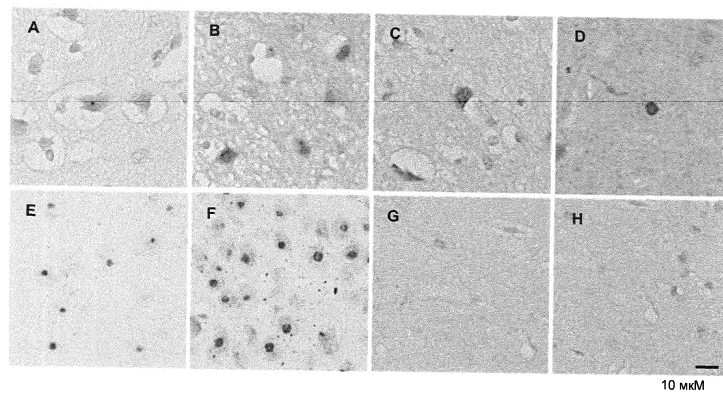


Фиг. 26

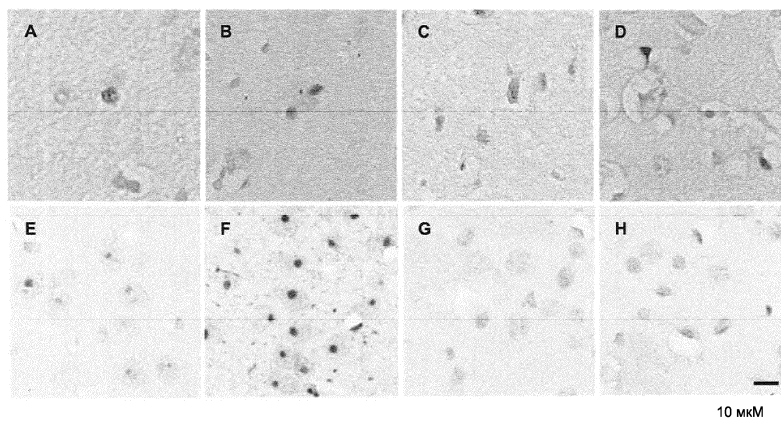
046697



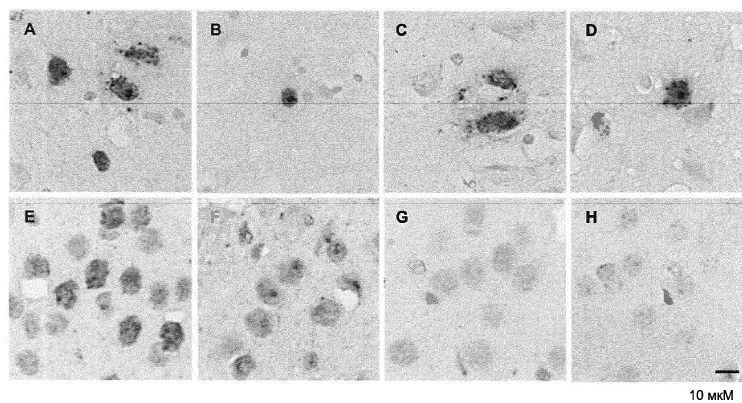
Фиг. 27



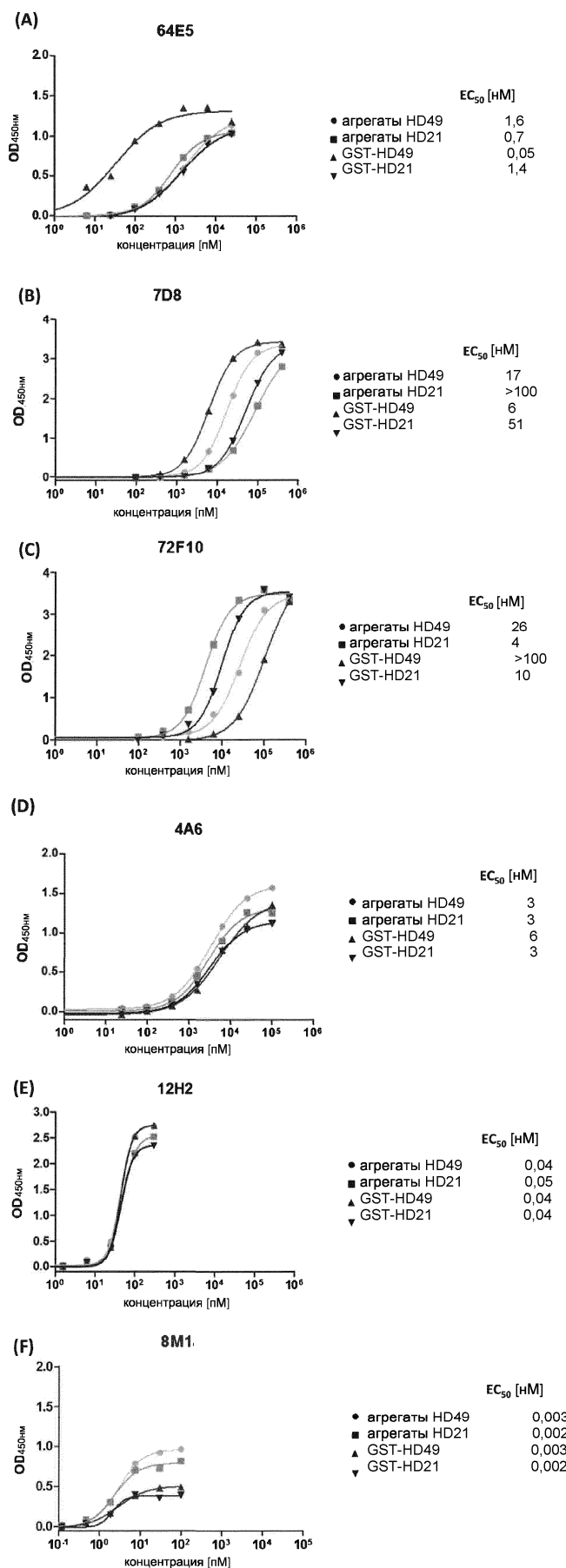
Фиг. 28



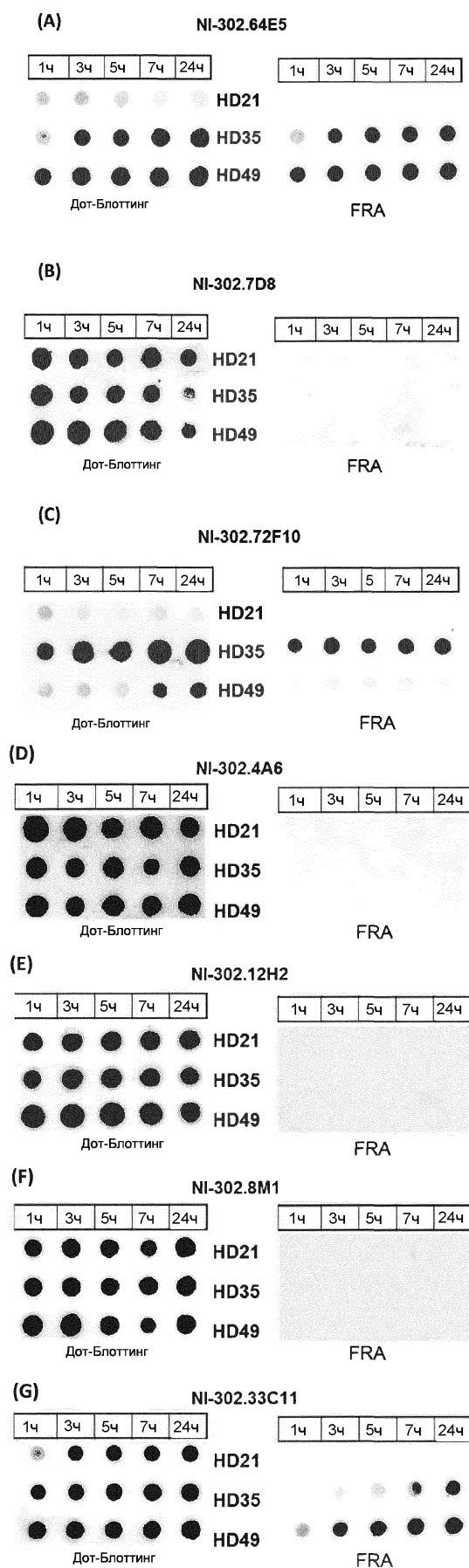
Фиг. 29



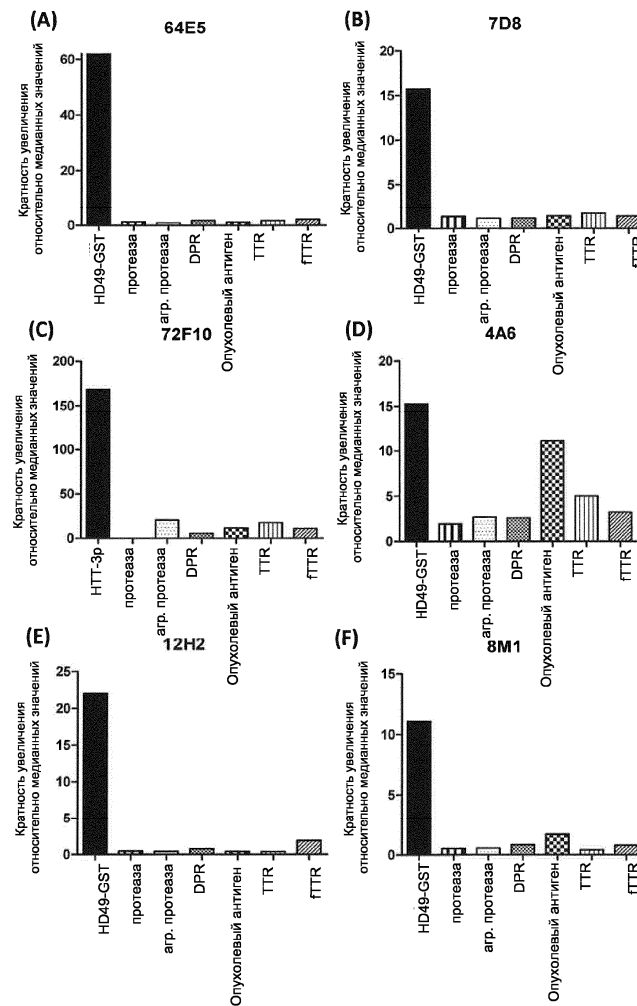
Фиг. 30



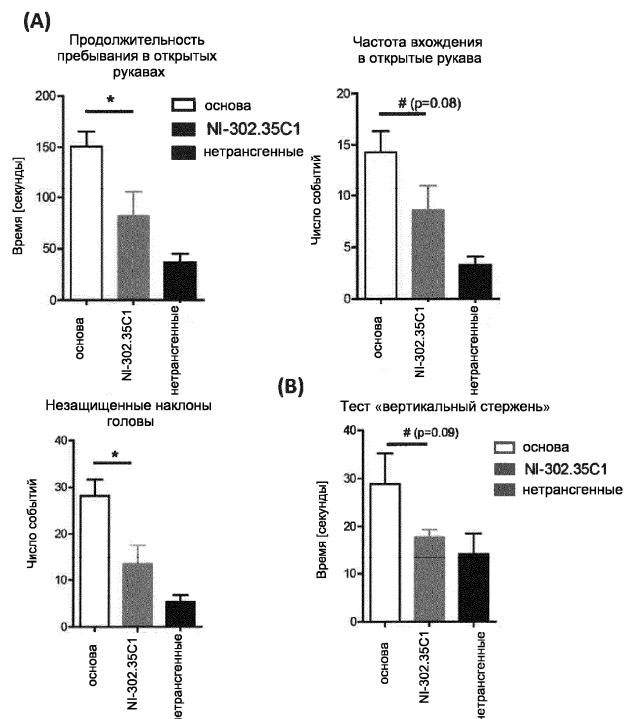
Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33

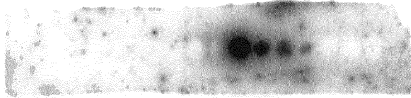


Фиг. 34

(A)

64E5 1 мкг/мл

10 11 12



43 50 57 60 67
10 P P P Q L P Q P P P Q A Q P L
11 P Q P P P Q A Q P L L P Q P Q
12 Q A Q P L L P Q P Q P P P P
консенсусная P Q P P P Q A Q P L
последовательность:

(B)

7B8 1 мкг/мл

6 7 8



28 30 35 40 42 47 50 52
6 Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q P P P
7 Q Q Q Q Q Q P P P P P P P P
8 Q Q P P P P P P P P P P Q L
консенсусная Q Q Q Q Q Q P P P
последовательность:

(C)

72F10 1 мкг/мл

15 16



68 70 75 80 84
15 P P P P P G P A V A E E P L H
16 P P P G P A V A E E P L H R P
консенсусная P P P G P A V A E E P L H
последовательность:

(D)

4A6 1 мкг/мл

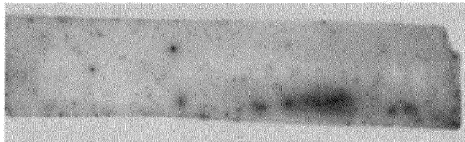
Связывание отсутствует



(E)

12H2 1 мкг/мл

Связывание отсутствует



(F)

8M1 1 мкг/мл

Связывание отсутствует



Фиг. 35

