



(51) МПК
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2009104769/10**, 13.07.2007(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.07.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
14.07.2006 EP 06014730.3(43) Дата публикации заявки: **27.08.2010** Бюл. № 24(45) Опубликовано: **20.11.2013** Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 2001/062801 A2**, 30.08.2001. **WO 2000/072880 A2**, 12.07.2000. **WO 2003/070760 A2**, 28.08.2003. **WO 2006/066171 A1**, 22.06.2006. **RU 2193406 C2**, 27.11.2002. **SOLOMON et al. Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer b-amyloid peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Neurobiology**, v.93, p.452-455, 1996.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **16.02.2009**(86) Заявка РСТ:
US 2007/073504 (13.07.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/011348 (24.01.2008)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
 ООО "Юридическая фирма Городиский и
 Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517**

(72) Автор(ы):

**ПФАЙФЕР Андреа (CH),
 ПИЛЬГРЕН Мария (CH),
 МУС Андреас (CH),
 УОТТС Райан (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**АЦ ИММУНЕ СА (CH),
 ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)**

RU 2 498 999 C2

RU 2 498 999 C2

(54) ГУМАНИЗИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО К АМИЛОИДУ БЕТА

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к иммунологии и биотехнологии. Предложены варианты антитела или его фрагмента, специфичных в отношении β -амилоидного белка. Каждый из вариантов характеризуется тем, что включает H и L-цепи, или области VH и VL, каждая из которых содержит по три соответствующих CDR. Описаны:

полипептид VL, полипептид VH, а также кодирующая нуклеиновая кислота, экспрессионный вектор, ее содержащий, и клетка, несущая вектор, используемые для получения антитела или его функционального фрагмента. Предложены: тест-набор, варианты фармацевтической композиции, смесь для применения в качестве лекарственного средства на основе антитела или его

функционального фрагмента. Раскрыты варианты способа получения антитела: с использованием клетки, НК или вектора. Описан способ приготовления композиции, а также способ диагностирования амилоидоза *in vitro*, способ определения степени загрузки амилоидогенными бляшками *in vitro*, способ лечения или облегчения воздействий амилоидоза, использующие антитело или его

функциональный фрагмент. Предложенное изобретение обеспечивает новые антитела, которые связывают эпитоп, находящийся в области 12-23 белка $A\beta_{1-42}$, причем остатки 15-20 имеют решающее значение. Изобретение может найти применение в терапии и диагностике болезни Альцгеймера и других перечисленных амилоидозах. 19 н. и 25 з.п. ф-лы, 18 ил., 9 табл., 16 пр.

RU 2 4 9 8 9 9 9 6 6 8 9 9 9 C 2

RU 2 4 9 8 9 9 9 6 6 8 9 9 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2009104769/10, 13.07.2007**

(24) Effective date for property rights:
13.07.2007

Priority:

(30) Convention priority:
14.07.2006 EP 06014730.3

(43) Application published: **27.08.2010 Bull. 24**

(45) Date of publication: **20.11.2013 Bull. 32**

(85) Commencement of national phase: **16.02.2009**

(86) PCT application:
US 2007/073504 (13.07.2007)

(87) PCT publication:
WO 2008/011348 (24.01.2008)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517**

(72) Inventor(s):
**PFAJFER Andrea (CH),
PIL'GREN Marija (CH),
MUS Andreas (CH),
UOTTS Rajan (US)**

(73) Proprietor(s):
**ATs IMMUNE SA (CH),
DZhENENTEK, INK. (US)**

(54) **HUMANISED ANTIBODY TO BETA AMYLOID**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.
SUBSTANCE: versions of an antibody or its fragment, which are specific in relation to β -amyloid protein, are proposed. Each version is characterised by the fact that it includes H- and L-chains, or areas VH and VL, each of which contains three corresponding CDR. The following is described: polypeptide VL, polypeptide VH, as well as coding nucleic acid, expression vector containing it and a cell carrying the vector, which are used for obtaining an antibody or its functional fragment. The following is proposed; a test kit, versions of pharmaceutical composition, a mixture to be used as a medicine based on the antibody or its functional fragment. Versions of the method used for production

of an antibody are described: using a cell, nucleic acid or a vector. A composite preparation method, as well as an in vitro amyloid disease diagnostics method, a method for determination of a degree of loading with in vitro amyloidogenic patches, a method for curing or relief of actions of amyloid disease, which use an antibody or its functional fragment, are described. Inventions can be used in therapy and diagnostics of Alzheimer disease and other enlisted amyloid diseases.

EFFECT: proposed inventions provide new antibodies that bind the epitope contained in the area of 12-23 protein $\alpha\beta_{1-42}$; with that, residues 15-20 have a fundamental importance.

44 cl, 18 dwg, 9 tbl, 16 ex

RU 2 498 999 C2

RU 2 498 999 C2

Настоящее изобретение относится к способам и композициям, предназначенным для диагностики и лечения амилоидоза, группы нарушений и патологий, ассоциированных с амилоидным белком, таких как болезнь Альцгеймера.

Амилоидоз представляет собой не отдельное заболевание, а скорее группу разнообразных прогрессирующих болезненных процессов, которые характеризуются 5 внеклеточными отложениями в ткани воскообразного крахмалоподобного белка, называемого амилоидом, который накапливается в одном или нескольких органах или системах организма. После образования амилоидных отложений они начинают 10 препятствовать нормальному функционированию органа или системы организма. Известно по меньшей мере 15 различных типов амилоидоза. Основными формами являются первичный амилоидоз, не имеющий известных предвестников (состояний-предшественников) заболевания, вторичный амилоидоз, сопровождающий 15 определенное другое состояние, и наследственный амилоидоз.

Вторичный амилоидоз возникает у людей, страдающих хроническим инфекционным или воспалительным заболеванием, таким как туберкулез, бактериальная инфекция, которую называют семейной средиземноморской лихорадкой, костные инфекционные заболевания (остеомиелит), ревматоидный 20 артрит, воспаление тонкого кишечника (гранулематозный илеит), болезнь Ходжкина и проказа.

Амилоидные отложения включают такой компонент, как амилоид Р (пентагональный) (AP), гликопротеин, родственный амилоиду Р сыворотки здорового индивидуума (SAP), и сульфатированные гликозаминогликаны (GAG), комплекс 25 углеводов соединительной ткани. Фибриллы амилоидного белка, на долю которых приходится примерно 90% амилоидного материала, содержат один из нескольких различных типов белков. Эти белки обладают способностью складываться в фибриллы, имеющие так называемую «бета-складчатую» конформацию, уникальную 30 конфигурацию белка, при которой сайты связывания становятся доступными для красителя конго красного, что приводит к уникальным особенностям окрашивания амилоидного белка.

Многие связанные с возрастом заболевания обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками и характеризуются, в частности, образованием 35 внеклеточных отложений амилоида или амилоидоподобного материала, которые участвуют в патогенезе, а также в развитии заболевания. Такие заболевания включают (но не ограничиваясь только ими) неврологические нарушения, такие как болезнь Альцгеймера (AD), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа); 40 комплекс деменции Гуама-Паркинсона. Другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, представляют собой прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический 45 боковой склероз), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна.

Хотя патогенез этих заболеваний может быть различным, характерные для них отложения часто содержат многие сходные молекулярные компоненты. В 50 значительной степени это может относиться к местной активации провоспалительных путей, приводя тем самым к конкурентному отложению компонентов активированного комплемента, реактантов острой фазы, иммуномодуляторов и других воспалительных медиаторов (McGeer и др., 1994).

Болезнь Альцгеймера (AD) представляет собой неврологическое нарушение, которое, как предполагается, вызывается прежде всего амилоидными бляшками, накоплением патологических отложений белков в головном мозге. Наиболее часто встречающийся тип амилоида, выявленный в головном мозге пораженных

5 заболеванием индивидуумов, в основном состоит из Аβ-фибрилл. Научно доказано, что увеличение производства и накопления бета-амилоидного белка в бляшках приводит к гибели нервных клеток, что способствует возникновению и развитию

10 болезни Альцгеймера. В свою очередь, утрата нервных клеток в стратегически важных областях головного мозга приводит к уменьшению уровня нейромедиаторов и ухудшению памяти. К белкам, которые в первую очередь ответственны за образование бляшки, относятся амилоидный белок-предшественник (APP) и два пресенилина (пресенилин I и пресенилин II). Последовательное расщепление

15 амилоидного белка-предшественника (APP), который конститутивно экспрессируется и катаболизируется в большинстве клеток ферментами β- и γ-секретазами, приводит к высвобождению состоящего из 39-43 аминокислот Аβ-пептида. Расщепление APP, по-видимому, приводит к повышению их способности к агрегации с образованием

20 бляшек. Аβ(1-42)-фрагмент обладает прежде всего наиболее высокой способностью образовывать агрегаты благодаря наличию двух высокогидрофобных аминокислотных остатков на его С-конце. Поэтому предполагается, что прежде всего Аβ(1-42)-фрагмент участвует и ответствен за инициацию образования нейритной бляшки при AD и следовательно обладает высоким патологическим потенциалом. Таким образом, существует необходимость в создании агентов, предназначенных для

25 предупреждения образования амилоидных бляшек и разрушения существующих при AD бляшек.

Симптомы болезни Альцгеймера проявляются медленно, и первым симптомом может быть лишь слабая забывчивость. На этой стадии индивидуумы могут забывать

30 последние события, действия, имена знакомых людей или названия вещей и могут быть не в состоянии решить простые математические задачи. По мере прогрессирования болезни симптомы становятся более заметными и настолько серьезными, что вынуждают людей, пораженных AD, или членов их семьи прибегать к

35 медицинской помощи. Симптомы, характерные для средней стадии AD, включают забывание того, как выполнять простые функции, такие как приводить себя в порядок, при этом возникают проблемы с речью, пониманием, чтением или письмом. Пациенты на поздней стадии AD могут становиться боязливыми или агрессивными, могут уходить далеко от дома и, в конце концов, нуждаться в полном уходе.

В настоящее время единственным надежным путем диагностики AD является

40 идентификация бляшек и сплетений в ткани головного мозга при вскрытии после смерти индивидуума. Таким образом, пока индивидуум еще жив, доктора могут ставить только диагноз «возможна» или «вероятна» AD. С помощью современных методов лечащие врачи могут правильно диагностировать вплоть до 90 процентов

45 случаев AD с помощью ряда средств, позволяющих диагностировать «возможную» AD. Лечащие врачи задают вопросы об общем состоянии здоровья индивидуума, медицинских проблемах, имевших место в прошлом, и истории каких-либо затруднений у индивидуума при выполнении повседневных действий.

50 Поведенческие тесты на память, решение задач, внимание, счет и речь позволяют получать информацию о когнитивной дегенерации, а медицинские анализы, такие как анализы крови, мочи или спинномозговой жидкости, и сканирование головного мозга могут дать некоторую дополнительную информацию.

Борьба с AD заключается в осуществлении лечения, основанного на применении лекарственных средств, и лечения без использования лекарственных средств (немедикаментозного лечения). Лечение с целью изменения основного течения болезни (замедления или реверсирования развития) до сих пор были по большей части
5 безуспешными. Было продемонстрировано, что лекарственные средства, которые восстанавливают дефицит (дефект) или недостаточную функцию химических медиаторов нервных клеток (нейромедиаторов), в частности, ингибиторы холинэстеразы (ChEI), такие как такрин и ривастигмин, позволяют улучшать
10 симптомы. ChEI задерживают ферментативное расщепление нейромедиаторов, повышая тем самым количество химических медиаторов, пригодных для передачи нервных сигналов в головном мозге.

Для некоторых людей на ранней и средней стадиях заболевания такие лекарственные средства, как такрин (COGNEX[®], Моррис-Плейнс, шт. Нью-Джерси),
15 донепезил (ARICEPT[®], Токио, Япония), ривастигмин (EXELON[®], Ист-ХанOVER, шт. Нью-Джерси) или галантамин (REMINYL[®], Нью-Брансуик, шт. Нью-Джерси), могут предупреждать ухудшение некоторых симптомов в течение ограниченного периода времени. Другое лекарственное средство, мемантин (NAMENDA[®], Нью-Йорк,
20 шт. Нью-Йорк), разрешено для лечения AD от средней до тяжелой степени. Лекарственные средства могут воздействовать также на психиатрические проявления AD. Некоторые лекарственные средства могут помогать также контролировать поведенческие симптомы AD, такие как бессонница, возбуждение,
25 блуждание, тревога и депрессия. Лечение этих симптомов часто делает жизнь пациентов более комфортной и облегчает обслуживающему персоналу уход за ними. К сожалению, несмотря на значительные успехи лечения, демонстрирующие, что этот класс агентов существенно превосходит по эффективности плацебо, болезнь продолжает прогрессировать, а влияние на умственные функции в среднем является
30 очень ограниченным. Многие лекарственные средства, применяемые для лечения AD, такие, например, как ChEI, обладают также побочными действиями, которые включают желудочно-кишечные нарушения, токсичность для печени и потерю веса.

Еще одним заболеванием, обусловленным или ассоциированным с накоплением и
35 отложением амилоидоподобного белка, является дегенерация желтого пятна.

Дегенерация желтого пятна представляет собой обычное заболевание глаза, которое вызывает деграцию желтого пятна, т.е. центральной области сетчатки (тонкий слой ткани на задней части глаза, откуда светочувствительные клетки посылают зрительные сигналы в головной мозг). Желтое пятно опосредует острое,
40 четкое, «неискаженное» зрение. Повреждение желтого пятна приводит к развитию слепых пятен и затуманенному или нарушенному зрению. Связанная с возрастом дегенерация желтого пятна (AMD) является основной причиной ухудшения зрения в Соединенных Штатах, и у людей старше 65 лет она представляет собой основную
45 причину медицински подтвержденной слепоты среди лиц кавказской расы. Примерно 1,8 миллионов американцев в возрасте 40 лет и старше имеют развитую AMD, а еще у 7,3 миллионов людей с умеренной AMD имеется значительный риск потери зрения. По оценкам правительства к 2020 г. 2,9 миллиона людей будут
50 иметь развитую AMD. Жертвы AMD часто бывают удивлены и расстроены, когда узнают, как мало известно о причинах и методах лечения этого состояния слепоты.

Существует две формы дегенерации желтого пятна: сухая дегенерация желтого пятна и влажная дегенерация желтого пятна. Сухая форма, при которой клетки желтого пятна медленно начинают разрушаться, диагностирована в 85 процентов

случаев дегенерации желтого пятна. Как правило, сухая AMD поражает оба глаза, хотя при этом один глаз может потерять зрение, а второй глаз может оставаться непораженным. Обычно ранними признаками сухой AMD являются друзы, которые представляют собой отложения желтого тела под сетчаткой. Риск возникновения развитой сухой AMD или влажной AMD повышается с увеличением количества или размера друз. Сухая AMD может прогрессировать и вызывать потерю зрения, не превращаясь во влажную форму заболевания; однако на ранней стадии сухая AMD может внезапно переходить во влажную форму.

Хотя на долю влажной формы приходится только 15 процентов случаев, она в 90 процентах приводит к слепоте, и ее рассматривают как развитую AMD (не существует ранней или промежуточной стадии влажной AMD). Влажной AMD всегда предшествует сухая форма заболевания. При прогрессировании сухой формы у некоторых людей начинается патологический рост кровеносных сосудов позади желтого пятна. Эти сосуды являются очень хрупкими, и из них просачивается жидкость и кровь (отсюда название «влажная» дегенерация желтого пятна), приводя к быстрому повреждению желтого пятна.

Сухая форма AMD первоначально часто вызывает слегка затуманенное зрение. Затем, прежде всего, центральная часть зрительного поля может становиться затуманенной, и эта область увеличивается в размерах по мере прогрессирования заболевания. Если поражен только один глаз, то симптомы могут оставаться незамеченными. В случае влажной AMD прямые линии могут представляться волнистыми и при этом может быстро наступать потеря центрального зрения.

Для установления диагноза дегенерации желтого пятна, как правило, проводят исследование расширенного глаза (зрачка), тест на остроту зрения и обследование задней стенки глаза с использованием процедуры, называемой фундоскопией, помогающей установлению диагноза AMD, и, если имеется предположение о наличии влажной AMD, то может быть проведена ангиография с использованием флуоресцеина. В настоящее время отсутствуют средства лечения, позволяющие предупреждать потерю зрения, если сухая AMD достигла развитой стадии. Однако применение определенной композиции, содержащей высокую дозу антиоксидантов и цинка, может замедлять или предупреждать прогрессирование промежуточной стадии AMD, приводящее к переходу в развитую стадию. Macugen® (инъекция пегаптана натрия), лазерное фотокоагулирование и фотодинамическая терапия позволяют контролировать патологический рост кровеносных сосудов и кровоизлияние в желтом пятне, что является полезным для определенной группы людей с влажной AMD; однако зрение, если оно уже потеряно, не может быть восстановлено с помощью таких методов. Если зрение потеряно, то существуют средства для слабого зрения, которые могут помогать улучшать качество жизни.

Одним из самых ранних признаков связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD) является накопление внеклеточных отложений, известных как друзы, в области, находящейся между базальным слоем пигментированного эпителия сетчатки (RPE) и базальной оболочкой Бруха (BM). Результаты современных исследований, проведенных Anderson с соавторами, подтвердили, что друзы содержат амилоид-бета (Experimental Eye Research 78, 2004, сс.243-256).

В настоящее время проводятся исследования, в которых изучают факторы окружающей среды, генетические и связанные с питанием факторы, которые могут влиять на AMD. Исследуют также новые стратегии лечения, включая применение трансплантатов клеток сетчатки, лекарственных средств, которые должны

предупреждать или замедлять прогрессирование заболевания, лучевой терапии, генной терапии, компьютерного чипа, имплантированного в сетчатку, который может помогать стимулировать зрение, и агентов, которые должны предупреждать рост новых кровеносных сосудов под желтым пятном.

5 Важным фактором, который необходимо принимать во внимание при разработке новых лекарственных средств, является простота их применения пациентами, для которых они предназначены. На долю вводимых оральным путем лекарственных средств, в частности, таблеток, капсул и мягких гелей, приходится 70% всех
10 применяемых лекарственных форм из-за удобства их применения пациентами. Разработчики лекарственных средств признают, что пациенты предпочитают оральное применение по сравнению с инъекциями, или другими более инвазивными формами, применяемыми в медицине. Также предпочтительными являются
15 препаративные формы, которые позволяют снижать количество доз (т.е. формы, применяемые один раз в день, или формы с пролонгированным высвобождением). Простота применения антибиотиков в виде оральных лекарственных форм приводит к тому, что соблюдение пациентом режима и схемы лечения в процессе лечения
улучшается.

20 Таким образом, необходима разработка эффективных способов и композиций, предназначенных для предупреждения или направленных на борьбу с осложнениями, ассоциированными с амилоидозом, представляющим собой группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая
25 вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь только ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые
30 обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна. В частности,
35 существует необходимость в разработке агентов, которые обладают способностью противодействовать физиологическим проявлениям заболевания, таким как образование бляшек, ассоциированное с агрегацией волокон амилоида или амилоидоподобного пептида.

40 Было установлено, что антитела к амилоидам, которые вырабатываются при инокуляции $A\beta_{1-42}$ в смеси с полным или неполным адьювантом Фрейнда, обладают способностью снижать амилоидную нагрузку у трансгенных мышей, на которых смоделирована человеческая болезнь Альцгеймера (Schenk и др., 1999).

45 Внутривентрикулярная инокуляция тетрапальмитоилированного $A\beta_{1-16}$, реконструированного в липосомах, трансгенным мышам линии NORBA приводила к получению высоких титров антител к амилоидам, которые, как установлено, обладали способностью сольубилизовать амилоидные волокна и бляшки *in vitro* и *in vivo* (Nicolau и др., 2002).

50 Впервые гипотеза о возможном механизме, посредством которого происходит растворение амилоидных бляшек и волокон, была предложена Bard с соавторами, 2000, которые сделали заключение о том, что антитела опсонизируют бляшки, которые затем разрушаются макрофагами микроглии. De Mattos с соавторами, 2001

установили, что МАт к центральному домену β -амилоида обладает способностью связываться и полностью разрушать амилоид в плазме. Они доказали, что присутствие указанных МАт в кровотоке сдвигает равновесие А β между головным мозгом и плазмой в сторону периферического клиренса и катаболизма вместо накопления в головном мозге.

Длительное лечение человека антителами грызунов можно вызывать антиглобулиновый ответ, который выявляется примерно на 8-12 день после введения и достигает пика примерно через 20-30 дней. Если такой антиглобулиновый ответ обнаружен, то лечение необходимо прерывать не более чем через примерно 10 дней, и повторную обработку в более поздний момент времени, как правило, не проводят, поскольку она может приводить к быстрому возникновению вторичного антиглобулинового ответа. Хотя для антител грызунов характерен заметный уровень консервативности последовательностей с человеческими антителами, существует много различий в последовательностях грызунов и человека, что является достаточным для иммуногенности антител грызунов для человека.

Эту проблему можно решить путем создания антител непосредственно в организме человека или путем создания «гуманизированных» (известных также как «реконструированные» антитела). Гуманизированные антитела содержат аминокислотную последовательность варибельной области, которая несет полученные из антител грызунов CDR, распределенные в человеческих или напоминающих человеческие последовательностях каркасных участков. Поскольку специфичность гуманизированного антитела обеспечивается полученными из антител грызунов CDR, эти остатки следует применять практически в неизмененном виде, при этом допустимы лишь минорные модификации, которые не оказывают существенного воздействия на аффинность и специфичность антитела в отношении его антигена-мишени. Каркасные остатки можно получать из варибельной области антитела любого примата или прежде всего из любой человеческой варибельной области или их комбинации и созданную в результате варибельную область следует рассматривать как реконструированную.

Для максимизации вероятности того, что аффинность будет сохраняться в реконструированном антителе, важно осуществлять соответствующий отбор каркасного участка. Известно, что последовательности каркасных участков служат для поддержания CDR в их правильной пространственной ориентации для взаимодействия с антигеном, и что каркасные остатки могут иногда даже принимать участие в связывании антигена. Для поддержания аффинности антитела к его антигену целесообразно выбирать последовательности человеческих каркасных участков, обладающие наибольшим подобием с последовательностями каркасных участков грызунов. Затем может оказаться необходимым заменять одну или несколько аминокислот в последовательности человеческого каркасного участка на соответствующий остаток в каркасном участке грызунов для того, чтобы избежать потери аффинности. Эту замену можно осуществлять с помощью компьютерного моделирования.

Настоящее изобретение относится к новым способам и композициям, которые содержат обладающие высокой специфичностью и высокой эффективностью антитела, прежде всего химерные антитела, включая их фрагменты, более конкретно частично или полностью гуманизированные антитела, включая их фрагменты, которые обладают способностью распознавать и связываться со специфическими эпитопами ряда β -амилоидных антигенов, которые могут презентоваться антителу в

мономерной, димерной, тримерной и т.д., полимерной форме, в форме агрегата, волокон, филаментов или в конденсированной форме бляшки. Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, наиболее предпочтительно применять для лечения амилоидоза, группы заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь только ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельда-Якоба, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа), болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна, но не ограничиваясь указанными заболеваниями.

Краткое изложение сущности изобретения

Одним из вариантов осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, которое/который распознает и связывается по меньшей мере с одним индивидуальным определенным сайтом связывания, прежде всего по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания и более предпочтительно по меньшей мере с тремя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, при этом каждый из указанного одного, указанных по меньшей мере двух, указанных по меньшей мере трех сайтов связывания содержит по меньшей мере один или два последовательно расположенных аминокислотных остатка, которые преимущественно участвуют в связывании антитела.

В частности, химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в изобретении, связывается по меньшей мере с двумя, прежде всего по меньшей мере с тремя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, при этом по меньшей мере два из трех индивидуальных сайтов связывания содержат по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, которые преимущественно участвуют в связывании антитела, и по меньшей мере один из трех индивидуальных сайтов связывания содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток.

По меньшей мере два индивидуальных сайта связывания, которые содержат по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, преимущественно участвующих в связывании антитела, локализованы в непосредственной близости относительно друг друга на антигене, разделены и/или фланкированы по меньшей мере одним аминокислотным остатком, который не участвует в связывании антитела, или участвует в существенно меньшей степени по сравнению с двумя указанными последовательно расположенными аминокислотными остатками, формируя тем самым конформационный прерывистый эпитоп.

По меньшей мере три индивидуальных сайта связывания, которые содержат по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка и по меньшей мере один аминокислотный остаток соответственно, преимущественно участвующих в связывании антитела, локализованы в непосредственной близости относительно друг друга на эпитопе, разделены и/или фланкированы по меньшей мере

одним аминокислотным остатком, который не участвует в связывании антитела или участвует в существенно меньшей степени по сравнению с аминокислотными остатками, которые преимущественно участвуют в связывание антитела, формируя тем самым конформационный прерывистый эпитоп.

5 В частности, предложено химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, которое/который распознает и связывается по меньшей мере с одним индивидуальным сайтом связывания, прежде всего по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания, более
10 предпочтительно по меньшей мере с тремя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, при этом каждый из указанного по меньшей мере одного или указанных по меньшей мере двух сайтов связывания содержит по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, которые
15 преимущественно участвуют в связывание антитела, где по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, образующие первый сайт связывания, представляют собой -Phe-Phe-, встроенные в следующую коровую последовательность (SEQ ID NO: 9):

Хаа₃-Phe-Phe-Хаа₄-Хаа₅-Хаа₆, где

20 Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile;

25 Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp;

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, и где указанные аминокислотные Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅ и Хаа₆ не участвуют в связывании антитела, или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -Phe-Phe-.

Другим вариантом изобретения является химерное антитело или его фрагмент или гуманизированное антитело или его фрагмент, в котором

Хаа₃ обозначает Val или Leu, но предпочтительно Val;

35 Хаа₄ обозначает Ala или Val, но предпочтительно Ala;

Хаа₅ обозначает Glu or Asp, но предпочтительно Glu;

Хаа₆ обозначает Glu or Asp, но предпочтительно Asp.

В частности, предложено химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, которое/который распознает и
40 связывается по меньшей мере с одним индивидуальным сайтом связывания, прежде всего по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания, более предпочтительно по меньшей мере с тремя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, при этом указанные индивидуальные сайты связывания
45 содержат по меньшей мере один и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка соответственно, которые преимущественно участвуют в связывание антитела, где по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, образующие первый сайт связывания, представляют собой -Phe-Phe-, и по меньшей мере один аминокислотный остаток
50 представляет собой -His-, встроенные в следующую коровую последовательность:

-Хаа₁-His-Хаа₃-Хаа₄-Хаа₅-Хаа₆-Phe-Phe-Хаа₇-Хаа₈- Хаа₉, в которой

Хаа₁ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln, Lys и Arg,

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln,

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln, Lys и Arg,

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile;

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile,

Хаа₇ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu и Ile,

Хаа₈ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp,

Хаа₉ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, и где аминокислотные остатки Хаа₁, Хаа₃, Хаа₆, Хаа₇, Хаа₈ и Хаа₉ не участвуют в связывании антитела или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -His- и -Phe-Phe- соответственно.

Другим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, в котором

Хаа₃ обозначает Gln или Asn, но предпочтительно Gln;

Хаа₄ обозначает Lys;

Хаа₅ обозначает Leu;

Хаа₆ обозначает Val или Leu, но предпочтительно Val;

Хаа₇ обозначает Ala или Val, но предпочтительно Ala;

Хаа₈ обозначает Glu или Asp, но предпочтительно Glu; и

Хаа₉ обозначает Asp или Glu, но предпочтительно Asp.

Следующим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, которое/который распознает и связывается по меньшей мере с одним индивидуальным сайтом связывания, прежде всего по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания, более предпочтительно по меньшей мере с тремя индивидуальными сайтами связывания на β-амилоидном белке, при этом каждый из указанного по меньшей мере одного или по меньшей мере из указанных двух индивидуальных сайтов связывания содержит по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, которые преимущественно участвуют в связывании антитела, где по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, образующие второй сайт связывания, представляют собой -Lys-Leu-, встроенные в следующую коровую последовательность (SEQ ID NO: 10):

Хаа₁-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃, в которой

Хаа₁ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln, Lys и Arg;

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln;

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile; и где аминокислотные остатки Хаа₃, Хаа₃ не участвуют в связывании антитела, или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -Lys-Leu-.

Следующим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент,

которое/который распознает и связывается по меньшей мере с одним индивидуальным сайтом связывания, прежде всего по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания, более предпочтительно по меньшей мере с тремя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, при этом указанные индивидуальные сайты связывания содержат по меньшей мере один и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка соответственно, которые преимущественно участвуют в связывании антитела, где по меньшей мере один и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, которые разделены по меньшей мере одним аминокислотным остатком, не участвующим в связывании антитела или участвующим в существенно меньшей степени по сравнению с аминокислотными остатками, которые преимущественно участвуют в связывании антитела, представляют собой -His- и -Lys-Leu- соответственно, встроенные в следующую коровую последовательность:

His-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃-Хаа₄-Хаа₅-Хаа₆-Хаа₇-Хаа₈-, в которой

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asp и Gln;

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile;

Хаа₇ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp;

Хаа₈ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp,

и где аминокислотные остатки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₆, Хаа₇, Хаа₈ не участвуют в связывании антитела, или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -His- и -Lys-Leu- соответственно.

Другим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, в котором

Хаа₂ обозначает Gln или Asp, но предпочтительно Gln;

Хаа₃ обозначает Val или Leu, но предпочтительно Val;

Хаа₄ обозначает Phe;

Хаа₅ обозначает Phe;

Хаа₆ обозначает Ala или Val, но предпочтительно Ala;

Хаа₇ обозначает Glu или Asp, но предпочтительно Glu; и

Хаа₈ обозначает Asp или Glu, но предпочтительно Asp.

Следующим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, которое/который распознает и связывается по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, при этом каждый из по меньшей мере двух указанных сайтов связывания содержит по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, которые преимущественно участвуют в связывании антитела, где по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, которые разделены по

меньшим мере одним аминокислотным остатком, не участвующим в связывании антитела, или участвующим в существенно меньшей степени по сравнению с последовательно расположенными, аминокислотными остатками, такими как -Phe-Phe- и -Lys-Leu- соответственно, образуют первый и второй сайт связывания, встроенные в следующую коровую последовательность:

Хаа₁-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃-Phe-Phe-Хаа₄-Хаа₃-Хаа₆, в которой

Хаа₁ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln Lys и Arg;

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln;

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile;

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp;

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, и где аминокислотные остатки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅ и Хаа₆ не участвуют в связывании антитела, или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -Lys-Leu- и -Phe-Phe- соответственно.

Следующим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, которое/который распознает и связывается по меньшей мере с одним индивидуальным сайтом связывания, прежде всего по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания, более предпочтительно по меньшей мере с тремя индивидуальными сайтами связывания на β-амилоидном белке, при этом указанные индивидуальные сайты связывания содержат по меньшей мере один и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка соответственно, которые преимущественно участвуют в связывании антитела, где по меньшей мере один и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка разделены по меньшей мере одним аминокислотным остатком, не участвующим в связывании антитела или участвующим в существенно меньшей степени по сравнению с аминокислотными остатками, которые преимущественно участвуют в связывании антитела, и где указанные аминокислотные остатки представляют собой -His- и -Phe-Phe- и -Lys-Leu- соответственно, встроенные в следующую коровую последовательность:

His-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃-Phe-Phe-Хаа₄-Хаа₅-Хаа₆, в которой

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln;

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile;

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp;

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, и где аминокислотные остатки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆ не участвуют в связывании антитела, или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с

сайтом связывания -His-, -Lys-Leu- и -Phe-Phe- соответственно.

Другим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, в котором

Хаа₂ обозначает Gln или Asn, но предпочтительно Gln;

Хаа₃ обозначает Val или Leu, но предпочтительно Val;

Хаа₄ обозначает Ala или Val, но предпочтительно Ala;

Хаа₅ обозначает Glu или Asp, но предпочтительно Glu, и

Хаа₆ обозначает Asp или Glu, но предпочтительно Asp.

Следующим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент,

которое/которое распознает и связывается по меньшей мере с двумя

индивидуальными сайтами связывания на β-амилоидном белке, при этом каждый из по меньшей мере двух индивидуальных сайтов связывания содержит по меньшей мере

два последовательно расположенных аминокислотных остатка, которые

преимущественно участвуют в связывании антитела, где по меньшей мере два

последовательно расположенных аминокислотных остатка разделены по меньшим

мере одним аминокислотным остатком, не участвующим в связывании антитела или

участвующим в существенно меньшей степени по сравнению с указанными

последовательно расположенными аминокислотными остатками, представляющими

собой -Phe-Phe- и -Lys-Leu- соответственно, которые образуют первый и второй сайт

связывания, встроенные в следующую коровую последовательность:

Хаа₁-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃-Phe-Phe-Хаа₄-Хаа₅-Хаа₆, в которой

Хаа₁ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln, Lys и Arg;

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln;

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Val, Ala, Leu, Met, Phe, норлейцин и Ile;

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu и Ile;

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp;

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, и где аминокислотные остатки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆ не участвуют в связывании антитела, или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтами связывания -Lys-Leu- и -Phe-Phe- соответственно.

Другим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, в котором

Хаа₁ обозначает His или Arg, но предпочтительно His;

Хаа₂ обозначает Gln или Asn, но предпочтительно Gln;

Хаа₃ обозначает Val или Leu, но предпочтительно Val;

Хаа₄ обозначает Ala или Val, но предпочтительно Ala;

Хаа₅ обозначает Glu или Asp, но предпочтительно Glu, и

Хаа₆ обозначает Asp или Glu, но предпочтительно Asp.

Следующим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент,

которое/который распознает и связывается по меньшей мере с двумя

индивидуальными сайтами связывания на β-амилоидном белке, при этом каждый из

по меньшей мере двух индивидуальных сайтов связывания содержит по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, которые преимущественно участвуют в связывании антитела, представляющие собой -Phe-Phe-Ala-Glu-, прежде всего -Phe-Phe-Ala-, но наиболее предпочтительно -Phe-Phe- и -Lys-Leu- соответственно, и указанные по меньшей мере два индивидуальных сайта связывания имеют аминокислотную последовательность -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-, представленную в SEQ ID NO:7, и аминокислотную последовательность His-Gln-Lys-Leu-Val-, представленную в SEQ ID NO 8, соответственно.

Одним из вариантов осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизованное антитело или его фрагмент, которое/который распознает и связывается по меньшей мере с одним индивидуальным сайтом связывания, прежде всего по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания, более предпочтительно по меньшей мере с тремя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, при этом указанный по меньшей мере один или указанные по меньшей мере два индивидуальных сайта связывания содержит(ат) по меньшей мере один и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка соответственно, преимущественно участвующие в связывании антитела, которые представляют собой -Phe-Phe- и -Lys-Leu-, и -His- соответственно, где указанные индивидуальные сайты связывания встроены в аминокислотную последовательность -Val-Phe-Phe-Ala-Glu- и аминокислотную последовательность -His-Gln-Lys-Leu-Val- соответственно.

Следующим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизованное антитело или его фрагмент, которое/который распознает и связывается по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, каждый из которых содержит по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка в аминокислотных последовательностях, представленных в SEQ ID NO:7 и 8 соответственно, где указанные последовательно расположенные аминокислотные остатки, прежде всего -Phe-Phe- и -Lys-Leu-, преимущественно участвуют в связывании β -амилоидного белка.

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в изобретении, которое/который связывается с 4 индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, при этом 4 индивидуальных сайтов связывания включают 2 сайта связывания, каждый из которых содержит один аминокислотный остаток, и 2 сайта связывания, каждый из которых содержит два последовательно расположенных аминокислотных остатка, которые преимущественно участвуют в связывании антитела, где указанные 4 индивидуальных сайта связывания локализованы в непосредственной близости относительно друг друга на β -амилоидном белке и где указанные 4 сайта связывания разделены по меньшей мере одним аминокислотным остатком, который не участвует в связывании антитела или участвует в существенно меньшей степени по сравнению с указанным одним аминокислотным остатком, и указанными двумя последовательно расположенными аминокислотными остатками 4 индивидуальных сайтов связывания, образуя тем самым конформационный прерывистый эпитоп.

В частности, первые из двух последовательно расположенных аминокислотных остатков, преимущественно участвующих в связывании антитела, представляют собой -Lys-Leu-, а вторые из по меньшей мере двух последовательно расположенных аминокислотных остатков представляют собой -Phe-Phe-, первый из одиночных

аминокислотных остатков представляет собой -His-, а второй из одиночных аминокислотных остатков представляет собой -Asp-, которые встроены в следующую коровую последовательность:

- Хаа₁-His-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃-Phe-Phe-Хаа₄-Хаа₅-Asp-Хаа₆, в которой

Хаа₁ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln, Lys и Arg, но предпочтительно His;

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln, но предпочтительно Gln;

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile, но предпочтительно Val;

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile, предпочтительно Ala;

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, предпочтительно Glu;

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile, предпочтительно Val; где аминокислотные остатки Хаа₁, Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆ не участвуют в связывании антитела, или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -His-, -Asp-, -Lys-Leu и -Phe-Phe-.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в изобретении, которое/который связывается с 4 индивидуальными сайтами связывания на β-амилоидном белке, при этом 4 индивидуальных сайта связывания включают 2 сайта связывания, каждый из которых содержит один аминокислотный остаток, и два сайта связывания, каждый из которых содержит два последовательно расположенных аминокислотных остатка, при этом первые из двух последовательно расположенных аминокислотных остатков, преимущественно участвующих в связывании антитела, представляют собой -Lys-Leu-, а вторые из по меньшей мере двух последовательно расположенных аминокислотных остатков представляют собой -Phe-Phe-, первый из одиночных аминокислотных остатков представляет собой -His-, а второй из одиночных аминокислотных остатков представляет собой -Asp-, где остатки встроены в следующую коровую последовательность:

- Хаа₁-His-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃-Phe-Phe-Хаа₄-Хаа₅-Asp-Хаа₆, в которой

Хаа₁ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln, Lys и Arg, но предпочтительно His;

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln, но предпочтительно Gln;

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile, предпочтительно Val;

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile, предпочтительно Ala;

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, предпочтительно Glu;

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile, предпочтительно Val; и где аминокислотные остатки Хаа₁, Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆ не участвуют в связывании антитела или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -His-, -Asp-, -Lys-Leu и -Phe-Phe-.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанные выше сайты распознавания и связывания образуют конформационный прерывистый эпитоп, локализованный в области β -амилоидного белка между аминокислотными остатками 12-24, прежде всего между остатками 14-23, более конкретно между 5 аминокислотными остатками 14 и 20, при этом по меньшей мере каждый из двух индивидуальных сайтов распознавания и связывания, содержащих по меньшей мере 2 аминокислотных остатка, локализован в положении 16 и 17 и в положении 19 и 20 соответственно, и при этом по меньшей мере один индивидуальный сайт 10 распознавания и связывания, содержащий по меньшей мере 1 аминокислотный остаток, локализован в положении 14, при этом указанные остатки преимущественно участвуют в связывании β -амилоидного белка и при этом индивидуальные сайты распознавания и связывания по меньшей мере на одной стороне фланкированы 15 аминокислотными остатками, прежде всего остатками 21 и 22, и разделены одним аминокислотным остатком, локализованным в положении 15 и 18, эти аминокислотные остатки не участвуют непосредственно в связывании антигена или участвуют по меньшей мере в существенно меньшей степени.

В еще одном варианте осуществления изобретения указанные по меньшей мере три 20 индивидуальных сайта распознавания и связывания фланкированы на обоих концах аминокислотными остатками, прежде всего остатками 12 и 13 и остатками 21 и 22, и разделены одним аминокислотным остатком, локализованным в положении 15 и 18, эти аминокислотные остатки не участвуют непосредственно в связывании антигена или по меньшей мере участвуют в существенно меньшей степени.

В конкретном варианте осуществления изобретения указанные последовательно 25 расположенные аминокислотные остатки, прежде всего -Lys-Leu- в положении 16 и 17 и -Phe-Phe- в положении 19 и 20, которые преимущественно участвуют в связывании β -амилоидного белка, встроены в следующую коровую область:

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp-
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

В другом конкретном варианте осуществления изобретения указанные 35 аминокислотные остатки, прежде всего -Lys-Leu- в положении 16 и 17 и -Phe-Phe- в положении 19 и 20, и -His- в положении 14, которые преимущественно участвуют в связывании β -амилоидного белка, встроены в следующую коровую область:

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp-	Val-	Gly-
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

Другим вариантом осуществления изобретения является гуманизованное 40 антитело или его фрагмент, которое/который содержит варибельную область легкой и тяжелой цепи соответственно, по меньшей мере один CDR из нечеловеческого антитела, прежде всего два CDR из нечеловеческого антитела, более предпочтительно три CDR из нечеловеческого антитела, встроены в один или несколько полученных 45 организма человека или приматов каркасных участков, и необязательно константную область, полученную из антитела человека или приматов, где гуманизованное антитело или его фрагмент обладает способностью специфически распознавать и 50 связывать β -амилоидный белок, прежде всего β -амилоидный мономерный пептид, более предпочтительно β -амилоидный полимерный пептид, еще более предпочтительно β -амилоидные волокна, фибриллы или филаменты в выделенном

состоянии или в виде части β -амилоидной бляшки, в эпитопе, который содержит следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 11):

Хаа₁-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃-Phe-Phe-Хаа₄-Хаа₅-Хаа₆, в которой

Хаа₁ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln, но предпочтительно His;

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln, но предпочтительно Gln; и

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Val, Leu и Ile, но предпочтительно Val;

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala и Val, но предпочтительно Ala;

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, но предпочтительно Glu;

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, но предпочтительно Asp.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело или его фрагмент, которое/который содержит переменные области легкой и тяжелой цепи соответственно, по меньшей мере один CDR из нечеловеческого антитела, прежде всего два CDR из нечеловеческого антитела, более предпочтительно три CDR из нечеловеческого антитела, встроенные в один или несколько полученных из антитела человека или приматов каркасных участков, и необязательно константную область, полученную из антитела человека или приматов, где гуманизованное антитело или его фрагмент обладает способностью специфически распознавать и связывать β -амилоидный белок, прежде всего β -амилоидный мономерный пептид, более предпочтительно β -амилоидный полимерный пептид, еще более предпочтительно β -амилоидные волокна, фибриллы или филаменты в выделенном состоянии или в виде части β -амилоидной бляшки, в эпитопе, который содержит следующую аминокислотную последовательность:

His-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃-Phe-Phe-Хаа₄-Хаа₅-Хаа₆, в которой

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln, но предпочтительно Gln; и

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Val, Leu и Ile, но предпочтительно Val;

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala и Val, но предпочтительно Ala;

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, но предпочтительно Glu;

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, но предпочтительно Glu; и где указанные аминокислотные остатки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆, не участвуют в связывании антитела или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -His- и -Lys-Leu-, и -Phe-Phe-.

В конкретном варианте осуществления изобретения CDR из нечеловеческого антитела получают из донорского антитела, но предпочтительно из мышинового донорского антитела к фрагменту антигена, которое не содержит указанный индивидуальный сайт связывания. Этот сдвиг в эпитопной области можно по меньшей мере частично вызывать путем применения надмолекулярной антигенной конструкции, содержащей антигенный пептид, который соответствует аминокислотной последовательности β -амилоидного пептида, прежде всего β -амилоидного пептида

Авмб, модифицированного гидрофильным фрагментом, таким, например, как полиэтиленгликоль (ПЭГ), где гидрофильный фрагмент ковалентно связан с каждым концом антигенного пептида по меньшей мере через одну, прежде всего через одну или две аминокислоты, такие, например, как лизин, глутаминовая кислота и цистеин, или любую другую приемлемую аминокислоту или аналог аминокислоты, которые могут служить связующим элементом для сочетания гидрофильного фрагмента с описанным ниже пептидным фрагментом, в процессе иммунизации. Когда ПЭГ применяют в качестве гидрофильного фрагмента, то свободные концы ПЭГ ковалентно связывают с фосфатидилэтаноламином или любым другим соединением, которое может функционировать в качестве «заякоривающего» элемента, например, для встраивания антигенной конструкции в бислой липосомы, как представлено в настоящем описании.

В частности, CDR из нечеловеческого антитела получают из мышиноного донорского антитела, которое обладает характерными свойствами антитела AC1-01-Ab7C2 (которое в настоящем описании обозначено также как «mC2»), депонированного в соответствии с требованиями Будапештского договора 01 декабря 2005 г. в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Брауншвейг, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, под регистрационным номером DSM ACC2750.

В одном из вариантов осуществления изобретения CDR из нечеловеческого антитела получают из мышиноного донорского антитела AC1-01-Ab7C2 (которое в настоящем описании обозначено также как «mC2»), депонированного в соответствии с требованиями Будапештского договора 01 декабря 2005 г. в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Брауншвейг, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, под регистрационным номером DSM ACC2750).

В качестве компонента протокола иммунизации для сдвига эпитопной области можно применять также липид А.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело или его фрагмент, содержащее/содержащий интегрированный в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки по меньшей мере один пептид, аминокислотная последовательность которого выбрана из группы последовательностей, включающей SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 варибельной области тяжелой цепи (HCVR), и SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1 варибельной области легкой цепи (LCVR).

Другим вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело или его фрагмент, где указанное гуманизованное антитело содержит интегрированный в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки по меньшей мере один пептид, аминокислотная последовательность которого выбрана из группы последовательностей, включающей SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 варибельной области тяжелой цепи (HCVR).

Еще одним вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело или его фрагмент, где указанное гуманизованное антитело содержит интегрированный в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1 варибельной области легкой цепи (LCVR).

В частности, изобретение относится к варибельной области легкой цепи (LCVR),

которая содержит интегрированный в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1 варибельной области легкой цепи (LCVR).

5 Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является варибельная область тяжелой цепи (HCVR), которая содержит интегрированный в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки по меньшей мере один пептид, аминокислотная последовательность которого выбрана из группы
10 последовательностей, включающей SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 варибельной области тяжелой цепи (HCVR).

Изобретение относится также к гуманизованному антителу или его фрагменту, содержащему интегрированные в полученные из антитела человека или приматов
15 каркасные участки по меньшей мере два пептида, эти пептиды являются различными и содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, включающей SEQ ID NO:1, которая соответствует CDR1, SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 варибельной области тяжелой цепи (HCVR), и SEQ ID NO:4, которая
20 соответствует CDR1, SEQ ID NO:5, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:6, которая соответствует CDR3 варибельной области легкой цепи (LCVR), где один и тот же CDR не может присутствовать дважды в антителе. В частности, если по меньшей мере два присутствующих CDR оба представляют собой CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), то по меньшей мере один из указанных CDR должен
25 представлять собой CDR1, которому соответствует SEQ ID NO:4.

Изобретение относится также к гуманизованному антителу или его фрагменту, содержащему интегрированные в полученные из организма человека или приматов
30 каркасные участки тяжелой цепи по меньшей мере два пептида, аминокислотная последовательность которых выбрана из группы последовательностей, включающей SEQ ID NO:1, которая соответствует CDR1, SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 варибельной области тяжелой цепи (HCVR), но прежде всего к гуманизованному антителу или его фрагменту, в котором один и тот же CDR не может присутствовать дважды в
35 антителе.

В частности, изобретение относится к варибельной области тяжелой цепи (HCVR), которая содержит интегрированные в полученные из антитела человека или приматов
40 каркасные участки тяжелой цепи по меньшей мере два пептида, аминокислотная последовательность которых выбрана из группы последовательностей, включающей SEQ ID NO:1, которая соответствует CDR1, SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 варибельной области тяжелой цепи (HCVR).

Следующим вариантом осуществления изобретения является гуманизованное
45 антитело или его фрагмент, содержащее/содержащий интегрированные в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки легкой цепи по меньшей мере два пептида, аминокислотная последовательность которых выбрана из группы последовательностей, включающей SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1, SEQ ID
50 NO:5, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:6, которая соответствует CDR3 варибельной области легкой цепи (LCVR).

В частности, изобретение относится к варибельной области легкой цепи (LCVR), которая содержит интегрированные в полученные из антитела человека или приматов

каркасные участки легкой цепи по меньшей мере два пептида, аминокислотная последовательность которых выбрана из группы последовательностей, включающей SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1, SEQ ID NO:5, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:6, которая соответствует CDR3 вариательной области легкой цепи (LCVR), где один и тот же CDR не может присутствовать дважды в антителе, и, в частности, по меньшей мере один из указанных CDR должен представлять собой CDR1, которому соответствует SEQ ID NO:4.

Изобретение относится также к гуманизованному антителу или его фрагменту, которое/который содержит интегрированные в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки тяжелой цепи пептиды, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая соответствует CDR1, SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 вариательной области тяжелой цепи (HCVR), предпочтительно в указанном выше порядке.

В частности, изобретение относится к вариательной области тяжелой цепи (HCVR), которая содержит интегрированные в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки тяжелой цепи пептиды, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая соответствует CDR1, SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 вариательной области тяжелой цепи (HCVR), предпочтительно в указанном выше порядке.

Изобретение относится также к гуманизованному антителу или его фрагменту, которое/который содержит интегрированные в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки легкой цепи пептиды, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1, SEQ ID NO:5, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:6, которая соответствует CDR3 вариательной области тяжелой цепи (LCVR), предпочтительно в указанном выше порядке.

В частности, изобретение относится к вариательной области легкой цепи (LCVR), которая содержит интегрированные в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки легкой цепи пептиды, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1, SEQ ID NO:5, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:6, которая соответствует CDR3 вариательной области легкой цепи (LCVR), предпочтительно в указанном выше порядке.

Изобретение относится также к гуманизованному антителу или его фрагменту, содержащему интегрированные в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки по меньшей мере три пептида, которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:1, которая соответствует CDR1, SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 вариательной области тяжелой цепи (HCVR), и SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1, SEQ ID NO:5, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:6, которая соответствует CDR3 вариательной области легкой цепи (LCVR), но предпочтительно к гуманизованному антителу или его фрагменту, где один и тот же CDR не может присутствовать дважды в антителе.

Другим вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело или его фрагмент, где антитело содержит интегрированные в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки по меньшей мере четыре пептида, которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:1, которая соответствует CDR1, SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 вариательной области тяжелой цепи (HCVR), и SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1, SEQ ID

NO:5, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:6, которая соответствует CDR3
вариабельной области легкой цепи (LCVR), но предпочтительно к гуманизованному
антителу или его фрагменту, где один и тот же CDR не может присутствовать дважды
в антителе.

5 Еще одним вариантом осуществления изобретения является гуманизованное
антитело или его фрагмент, содержащее/содержащий интегрированные в полученные
из антитела человека или приматов каркасные участки по меньшей мере пять
10 пептидов, которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из
группы, включающей SEQ ID NO:1, которая соответствует CDR1, SEQ ID NO:2,
которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3
вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), и SEQ ID NO:4, которая
соответствует CDR1, SEQ ID NO:5, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:6,
15 которая соответствует CDR3 вариабельной области легкой цепи (LCVR), но
предпочтительно к гуманизованному антителу или его фрагменту, где один и тот
же CDR не может присутствовать дважды в антителе.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является гуманизованное
антитело или его фрагмент, которое/который содержат интегрированные в
20 полученные из антитела человека или приматов каркасные участки пептиды, имеющие
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая соответствует CDR1, SEQ
ID NO:2, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3
вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), и SEQ ID NO:4, которая
соответствует CDR1, SEQ ID NO:5, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:6,
25 которая соответствует CDR3 вариабельной области легкой цепи (LCVR).

Конкретным вариантом осуществления изобретения является гуманизованное
антитело, его вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) или фрагмент, где
гуманизованное антитело, его вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) или
30 фрагмент содержит интегрированный в полученные из антитела человека или
приматов каркасные участки тяжелой цепи по меньшей мере пептид, имеющий
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2
вариабельной области тяжелой цепи (HCVR).

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является
35 гуманизованное антитело, его вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) или
фрагмент, где гуманизованное антитело, его вариабельная область тяжелой
цепи (HCVR) или фрагмент содержит интегрированный в полученные из антитела
человека или приматов каркасные участки тяжелой цепи по меньшей мере пептид,
40 имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, которая
соответствует CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR).

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения являются
гуманизованное антитело, его вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) или
фрагмент, где гуманизованное антитело, его вариабельная область тяжелой
45 цепи (HCVR) или фрагмент содержит интегрированные в полученные из антитела
человека или приматов каркасные участки тяжелой цепи по меньшей мере два
пептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая
соответствует CDR1, и SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2 вариабельной
50 области тяжелой цепи (HCVR).

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является
гуманизованное антитело, его вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) или
фрагмент, где гуманизованное антитело, его вариабельная область тяжелой

цепи (HCVR) или фрагмент содержит интегрированные в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки тяжелой цепи по меньшей мере два пептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая соответствует CDR1, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 вариательной области тяжелой цепи (HCVR).

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело, его вариательная область тяжелой цепи (HCVR) или фрагмент, где гуманизованное антитело, его вариательная область тяжелой цепи (HCVR) или фрагмент содержит интегрированные в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки тяжелой цепи по меньшей мере два пептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2, и SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 вариательной области тяжелой цепи (HCVR).

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело, его вариательная область легкой цепи (LCVR) или фрагмент, где гуманизованное антитело, его вариательная область легкой цепи (LCVR) или фрагмент содержит интегрированные в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки легкой цепи по меньшей мере два пептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1, и SEQ ID NO:5, которая соответствует CDR2 вариательной области легкой цепи (LCVR).

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело, его вариательная область легкой цепи (LCVR) или фрагмент, где гуманизованное антитело, его вариательная область легкой цепи (LCVR) или фрагмент содержит интегрированные в полученные из антитела человека или приматов каркасные участки легкой цепи по меньшей мере два пептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1, и SEQ ID NO:6, которая соответствует CDR3 вариательной области легкой цепи (LCVR).

Кроме того, под объем изобретения подпадают гуманизованное антитело или его фрагмент, причем и из вариательной области тяжелой цепи (HCVR), и из вариательной области легкой цепи (LCVR) мышинового антитела С2 встраивают по меньшей мере один из их CDR-участков в по меньшей мере два CDR-участка гуманизованного антитела. Таким образом, полученное в результате гуманизованное антитело или его фрагмент содержит

- по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая соответствует CDR1 (HCVR), в сочетании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1 (LCVR);

- по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2 (HCVR), в сочетании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1 (LCVR);

- по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 (HCVR), в сочетании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, которая соответствует CDR1 (LCVR);

- по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая соответствует CDR1 (HCVR), в сочетании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5, которая соответствует CDR2 (LCVR);

- по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2,

которая соответствует CDR2 (HCVR), в сочетании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5, которая соответствует CDR2 (LCVR);

- по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, которая соответствует CDR2 (HCVR), в сочетании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, которая соответствует CDR3 (LCVR);

- по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая соответствует CDR1 (HCVR), в сочетании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, которая соответствует CDR3 (LCVR);

- по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 (HCVR), в сочетании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5, которая соответствует CDR2 (LCVR);

- по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, которая соответствует CDR3 (HCVR), в сочетании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, которая соответствует CDR3 (LCVR).

Еще одним вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизованное антитело или его фрагмент, описанное/описанный выше, где антитело содержит константную область легкой цепи и/или тяжелой цепи, полученную из антитела человека или приматов.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизованное антитело или его фрагмент, в котором по меньшей мере одна, прежде всего по меньшей мере одна, но не более 5, более предпочтительно по меньшей мере одна, но не более 4, еще более предпочтительно по меньшей мере одна, но не более 3, но наиболее предпочтительно по меньшей мере одна, но не более 2, аминокислот, присутствующих CDR-участках легкой цепи и/или тяжелой цепи, которые представлены в SEQ ID NO:1-6, заменены путем консервативной замены таким образом, что антитело полностью сохраняет свою функциональную активность.

В частности, изобретение относится к химерному антителу или его фрагменту, либо к гуманизованному антителу или его фрагменту, в котором в CDR2 варибельной области легкой цепи (LCVR), последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 5, Lys в положении 50 согласно номенклатуре Кэбота заменен аминокислотным остатком, выбранным из группы, включающей Arg, Gln и Glu, предпочтительно Arg.

В частности, изобретение относится к варибельной области легкой цепи (LCVR), в которой в CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:5, Lys в положении 50 согласно номенклатуре Кэбота заменен аминокислотным остатком, выбранным из группы, включающей Arg, Gln и Glu, предпочтительно Arg.

Другим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизованное антитело или его фрагмент, в котором в CDR2 варибельной области легкой цепи (LCVR), последовательность которого представлена в SEQ ID NO:5, Ser в положении 53 согласно номенклатуре Кэбота заменен аминокислотным остатком, выбранным из группы, включающей Asn и Thr, но предпочтительно Asn.

В частности, изобретение относится к варибельной области легкой цепи (LCVR), в которой в CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:5, Ser в положении 53 согласно номенклатуре Кэбота заменен аминокислотным остатком, выбранным из группы, включающей Asn и Thr, но предпочтительно Asn.

Одним из вариантов осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизованное антитело или его фрагмент, в котором

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) идентична на 90%, предпочтительно на 95%, более предпочтительно на 98% последовательности, представленной в SEQ ID NO:15 и 16 соответственно.

5 Другим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизованное антитело или его фрагмент, в котором аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR) идентична на 90%, предпочтительно на 95%, более предпочтительно на 98% последовательности, представленной в SEQ ID NO:12 и 13 соответственно.

10 Еще одним вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело или его фрагмент, в котором аминокислотная последовательность по меньшей мере двух, но особенно предпочтительно трех CDR-участков вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), идентична на 90%, предпочтительно на 95%, более предпочтительно на 98% последовательности соответствующего CDR-участка, 15 представленной в SEQ ID NO:1-3.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело или его фрагмент, в котором аминокислотная последовательность по 20 меньшей мере двух, но особенно предпочтительно трех CDR-участков вариабельной области легкой цепи (LCVR), идентична на 90%, предпочтительно на 95%, более предпочтительно на 98% последовательности соответствующего CDR-участка, представленной в SEQ ID NO:4-6.

Другим вариантом осуществления изобретения является описанное/описанный 25 выше химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизованное антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в настоящем изобретении, в котором аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) идентична на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO:15 и 16 соответственно.

30 Еще одним вариантом осуществления изобретения является описанное выше химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизованное антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в настоящем изобретении, в котором аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR) 35 идентична на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO:12 и 13 соответственно.

Другим вариантом осуществления изобретения является описанное выше химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизованное антитело или его фрагмент, 40 предлагаемое/предлагаемый в настоящем изобретении, в котором аминокислотная последовательность по меньшей мере одного, предпочтительно по меньшей мере двух, но особенно предпочтительно трех CDR-участков вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) идентична на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности, соответствующего CDR-участка, представленной в SEQ ID NO:1-3.

45 Другим вариантом осуществления изобретения является описанное выше химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизованное антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в настоящем изобретении, в котором аминокислотная 50 последовательность по меньшей мере одного, предпочтительно по меньшей мере двух, но особенно предпочтительно трех CDR-участков вариабельной области легкой цепи (LCVR) идентична на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности, соответствующего CDR-участка, представленной в SEQ ID NO:4-6.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является описанное выше гуманизованное антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, в котором по меньшей мере одна из аминокислот, входящих в последовательности акцепторных каркасных участков, полученных из последовательностей V_H и Ук человеческой зародышевой линии соответственно, заменена на аминокислоту из соответствующей области мышинового антитела ACI-01-Ab7C2 или ее консервативную замену.

В частности, изобретение относится к вариабельной области тяжелой цепи и гуманизованному антителу, содержащему эту вариабельную область тяжелой цепи, соответственно, в которых Trp в положении 47 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_HIII вариабельной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Leu, норлейцин, Ile, Val, Met, Ala и Phe, предпочтительно Leu и Ile, но наиболее предпочтительно Leu, как показано в SEQ ID NO:15.

Изобретение относится также к вариабельной области тяжелой цепи и гуманизованному антителу, содержащему эту вариабельную область тяжелой цепи, соответственно, в которых Arg в положении 94 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_HIII вариабельной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Ser и Thr, но особенно предпочтительно Ser, как показано в SEQ ID NO:15.

Еще одним вариантом осуществления изобретения являются вариабельная область тяжелой цепи и гуманизованное антитело, содержащее эту вариабельную область тяжелой цепи, соответственно, в которых Trp в положении 47 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_HIII вариабельной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Leu, норлейцин, Ile, Val, Met, Ala и Phe, предпочтительно Leu и Ile, но особенно предпочтительно Leu, и Arg в положении 94 согласно номенклатуре Кэбота заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Ser и Thr, но особенно предпочтительно Ser, как показано в SEQ ID NO:15.

Изобретение относится также к вариабельной области легкой цепи и гуманизованному антителу, содержащему эту вариабельную область легкой цепи, соответственно, в которых Gln в положении 45 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_K человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_KII вариабельной области легкой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Lys, Arg, Gln и Asn, предпочтительно Lys и Arg, но особенно предпочтительно Lys.

Изобретение относится также к вариабельной области легкой цепи и гуманизованному антителу, содержащему эту вариабельную область легкой цепи, соответственно, в которых Tyr в положении 87 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_K человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_KII вариабельной области легкой цепи согласно номенклатуре Кэбота,

заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Phe, Leu, Val, Ile и Ala, предпочтительно Leu и Phe, но особенно предпочтительно Phe.

Изобретение относится также к вариательной области легкой цепи и гуманизованному антителу, содержащему эту вариательную область легкой цепи, соответственно, в которых Lys в положении 50 согласно номенклатуре Кэбота в CDR2-участке, полученном из мышинового моноклонального антитела, предпочтительно мышинового антитела ACI-01-Ab7C2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:12, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Arg, Gln, His и Asn, но особенно предпочтительно Arg.

Еще одним вариантом осуществления изобретения являются вариательная область легкой цепи и гуманизованное антитело, содержащее эту вариательную область легкой цепи, соответственно, в которых Asp в положении 53 согласно номенклатуре Кэбота в CDR2-участке, полученном из мышинового моноклонального антитела, предпочтительно мышинового антитела ACI-01-Ab7C2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:12, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile; но предпочтительно Ser.

Еще одним предпочтительным вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело, в котором Trp в положении 47 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_{HIII} вариательной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Leu, норлейцин, Ile, Val, Met, Ala и Phe, предпочтительно Leu и Ile, но наиболее предпочтительно Leu, и Arg в положении 94 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_{HIII} вариательной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Ser и Thr, но наиболее предпочтительно Ser, как показано в SEQ ID NO:15, и Tyr в положении 87 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_K человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_{KII} вариательной области легкой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Phe, Leu, Val, Ile и Ala, предпочтительно Leu и Phe, но наиболее предпочтительно Phe.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является вариательная область тяжелой цепи и гуманизованное антитело, содержащее эту вариательную область тяжелой цепи, соответственно, в которых Trp в положении 47 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_{HIII} вариательной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, показанной в SEQ ID NO:15, заменен на Leu.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является вариательная область тяжелой цепи и гуманизованное антитело, содержащее эту вариательную область тяжелой цепи, соответственно, в которых Arg в положении 94 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_{HIII} вариательной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен на Ser, как показано в SEQ ID NO:15.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является переменная область тяжелой цепи и гуманизованное антитело, содержащее эту переменную область тяжелой цепи, соответственно, в которых Trp в положении 47 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_{HIII} переменной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен на Leu и Ile, но наиболее предпочтительно на Leu, и Arg в положении 94 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_{HIII} переменной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен на Ser, как показано в SEQ ID NO:15.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является переменная область легкой цепи и гуманизованное антитело, содержащее эту переменную область легкой цепи, соответственно, в которых Trp в положении 87 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_K человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_{KII} переменной области легкой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен на Phe.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является переменная область тяжелой цепи и гуманизованное антитело, содержащее эту переменную область тяжелой цепи, соответственно, в которых Trp в положении 47 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_{HIII} переменной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен на Leu и Ile, но наиболее предпочтительно на Leu, и Arg в положении 94 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_{HIII} переменной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен на Ser, как показано в SEQ ID NO:15, и Trp в положении 87 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_K человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_{KII} переменной области легкой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен на Phe.

Одним из вариантов осуществления изобретения является переменная область тяжелой цепи и гуманизованное антитело, содержащее эту переменную область тяжелой цепи, соответственно, в которых Trp в положении 47 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_{HIII} переменной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Leu, норлейцин, Ile, Val, Met, Ala и Phe, предпочтительно Leu и Ile, но наиболее предпочтительно Leu, и Arg в положении 94 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_{HIII} переменной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Ser и Thr, но наиболее предпочтительно Ser, как показано в SEQ ID NO:15, и в которых Lys в положении 50 согласно номенклатуре Кэбота в CDR2-участке, полученном из мышинового моноклонального антитела, предпочтительно

мышинного антитела ACI-01-Ab7C2, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Arg, Gln, His и Asn, но наиболее предпочтительно Arg.

Одним из вариантов осуществления изобретения является переменная область тяжелой цепи и гуманизованное антитело, содержащее эту переменную область тяжелой цепи, соответственно, в которых Trp в положении 47 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_HIII переменной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Leu, норлейцин, Ile, Val, Met, Ala и Phe, предпочтительно Leu и Ile, но наиболее предпочтительно Leu, и Arg в положении 94 согласно номенклатуре Кэбота в последовательности акцепторного каркасного участка, полученной из последовательностей V_H человеческой зародышевой линии, которая относится к подгруппе V_HIII переменной области тяжелой цепи согласно номенклатуре Кэбота, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Ser и Thr, но наиболее предпочтительно Ser, как показано в SEQ ID NO:15, и в которых Asn в положении 53 согласно номенклатуре Кэбота в СВК2-участке, полученном из мышинного моноклонального антитела, предпочтительно мышинного антитела ACI-01-Ab7C2, заменен аминокислотой, выбранной из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile; но наиболее предпочтительно Ser.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является переменная область легкой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:12.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело, содержащее переменную область легкой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:12.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является переменная область легкой цепи, включая сигнальные последовательности, как показано в SEQ ID NO:13.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело, содержащее полную переменную область легкой цепи, включая сигнальные последовательности, как показано в SEQ ID NO:13.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело, содержащее переменную область легкой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:12, и константную область легкой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:14.

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело, содержащее полную переменную область легкой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:13, и константную область легкой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:14.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является переменная область тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:15.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:15.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является переменная область тяжелой цепи, включая сигнальные последовательности, как показано в SEQ ID NO:16.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является гуманизованное антитело, содержащее полную переменную область тяжелой цепи, включая сигнальные последовательности, как показано в SEQ ID NO:16.

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является

гуманизированное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:15, и константную область тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:17.

5 Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является гуманизированное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:16, и константную область тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:17.

10 В одном из вариантов осуществления гуманизированное антитело, предлагаемое в изобретении, и описанное выше, при совместной инкубации с мономерным A β -пептидом, который имеет по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 35, более предпочтительно по меньшей мере 38, еще более предпочтительно по меньшей мере 40 аминокислотных остатков, и/или с полимерным растворимым амилоидным A β -пептидом, содержащим множество указанных мономерных A β -звеньев, но
15 наиболее предпочтительно с мономерным A β_{1-42} и/или полимерным растворимым амилоидным A β -пептидом, содержащим множество указанных мономерных A β_{1-42} -звеньев, прежде всего при соотношении молярных концентраций антитела и A β_{1-42} вплоть до 1:1000, предпочтительно вплоть до 1:500, более предпочтительно вплоть до 1:300, еще более предпочтительно вплоть до 1:200, но наиболее предпочтительно при соотношении молярных концентраций от 1:10 до 1:100, ингибирует агрегацию A β -мономеров, приводящую к образованию высокомолекулярных полимерных фибрилл.

25 В частности, совместную инкубацию антитела, предлагаемого в изобретении, с амилоидными мономерными и/или полимерными растворимыми амилоидными пептидами осуществляют в течение промежутка времени, составляющего от 24 до 60 ч, предпочтительно от 30 до 50 ч, более предпочтительно в течение 48 ч, но наиболее предпочтительно в течение 24 ч, при температуре от 28 до 40°C, предпочтительно от 32 до 38°C, наиболее предпочтительно при 37°C.

30 В конкретном варианте осуществления изобретения совместную инкубацию с амилоидными мономерными и/или полимерными растворимыми амилоидными пептидами осуществляют в течение 24 ч при температуре 37°C.

35 В частности, антитело, прежде всего гуманизированное антитело, предлагаемое в изобретении, включая любые функциональные эквиваленты антитела или его функциональные фрагменты, связывается с мономерным A β_{1-42} -пептидом и/или полимерным растворимым амилоидным A β -пептидом, содержащим множество указанных мономерных A β_{1-42} -звеньев, и при совместной инкубации с мономерным A β_{1-42} -пептидом и/или полимерным растворимым амилоидным A β -пептидом,
40 содержащим множество указанных мономерных A β_{1-42} -звеньев, ингибирует агрегацию A β -мономеров, приводящую к образованию высокомолекулярных полимерных фибрилл.

45 В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, прежде всего гуманизированное антитело, предлагаемое в изобретении, включая любые функциональные эквиваленты антитела или его функциональные фрагменты, ингибирует агрегацию мономеров A β и/или растворимых полимеров A β , содержащих множество указанных мономерных A β -звеньев, приводящую к образованию высокомолекулярных полимерных фибрилл, по меньшей мере на 50%,
50 предпочтительно по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 65%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 85%-90% или более, по сравнению с соответствующими мономерами амилоидного пептида,

инкубированными в буфере (контроль), при соотношении молярных концентраций антитела и $A\beta_{1-42}$ вплоть до 1:1000, предпочтительно при соотношении молярных концентраций от 1:10 до 1:100, но наиболее предпочтительно при соотношении молярных концентраций 1:10.

5 В конкретном варианте осуществления изобретения антитело, прежде всего гуманизированное антитело, предлагаемое в изобретении, включая любые функциональные эквиваленты антитела или его функциональные фрагменты, ингибирует агрегацию мономеров $A\beta$ и/или растворимых полимеров $A\beta$, содержащих
10 множество указанных мономерных $A\beta$ -звеньев, приводящую к образованию высокомолекулярных полимерных фибрилл, по меньшей мере на 30% при соотношении молярных концентраций антитела и $A\beta_{1-42}$ 1:100.

15 В другом конкретном варианте осуществления изобретения антитело, прежде всего гуманизированное антитело, предлагаемое в изобретении, включая любые функциональные эквиваленты антитела или его функциональные фрагменты, ингибирует агрегацию мономеров $A\beta$ и/или растворимых полимеров $A\beta$, содержащих
множество указанных мономерных $A\beta$ -звеньев, приводящую к образованию высокомолекулярных полимерных фибрилл, по меньшей мере на 80% при
20 соотношении молярных концентраций антитела и $A\beta_{1-42}$ 1:10.

Связывание антител, предлагаемых в изобретении и описанных выше, с амилоидогенными мономерными пептидами и/или полимерными пептидами, но прежде всего с амилоидной формой (1-42), приводит к ингибированию агрегации
25 мономерных и/или полимерных амилоидогенных пептидов, приводящей к образованию высокомолекулярных фибрилл или филаментов. Вследствие ингибирования агрегации амилоидогенных мономерных и/или полимерных пептидов антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, обладают способностью предупреждать или замедлять образование амилоидных бляшек, прежде всего
30 амилоидной формы (1-42), которая, как известно, становится нерастворимой в результате изменения вторичной конформации и представляет собой основную часть амилоидных бляшек в головном мозге больных животных или людей.

Способность антител, предлагаемых в изобретении, ингибировать агрегацию можно определять любым приемлемым методом, известным в данной области, прежде
35 всего ультрацентрифугированием в градиенте плотности с последующим анализом продукта седиментации с использованием ДСН-ПААГ на предварительно созданном градиенте и/или с помощью флуоресцентного анализа с использованием тиофлавина Т (Th-T).

40 Одним из вариантов осуществления изобретения является антитело, прежде всего гуманизированное антитело, описанное в изобретении, включая любые функциональные эквиваленты антитела или его функциональные фрагменты, где антитело при совместной инкубации, прежде всего при соотношении молярных
концентраций от 1:5 до 1:1000, предпочтительно от 1:10 до 1:500, более
45 предпочтительно при соотношении от 1:10 до 1:300, еще более предпочтительно при соотношении от 1:10 до 1:100, с ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами, которые образовались в результате агрегации мономерных $A\beta$ -пептидов, которые имеют по меньшей мере 30,
50 предпочтительно по меньшей мере 35, более предпочтительно по меньшей мере 38, еще более предпочтительно по меньшей мере 40 аминокислотных остатков, но наиболее предпочтительно мономерных $A\beta_{1-42}$ -пептидов, обладает способностью нарушать агрегацию ранее сформированных высокомолекулярных полимерных

фибрилл или филаментов по меньшей мере на 20%, прежде всего по меньшей мере на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 35%, еще более предпочтительно по меньшей мере 40%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 50% или более.

5 В конкретном варианте осуществления изобретения ингибирование антителом агрегации и способность антитела нарушать агрегацию соответственно определяют ультрацентрифугированием в градиенте плотности с последующим анализом продукта седиментации с использованием ДСН-ПААГ на предварительно созданном
10 градиенте.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения ингибирование антителом агрегации и способность антитела нарушать агрегацию соответственно определяют с помощью флуоресцентного анализа с использованием тиофлавина Т (Th-T).

15 В другом конкретном варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, совместно инкубируют с амилоидом в виде ранее сформированных высокомолекулярных полимерных фибрилл или филаментов в течение 12 -36 ч, предпочтительно 18-30 ч, более предпочтительно 24 ч при температуре от 28 до 40°C, предпочтительно от 32 до 38°C, более предпочтительно при 37°C.

В частности, совместную инкубацию с ранее сформированными высокомолекулярными полимерными фибриллами или филаментами осуществляют в течение 24 ч при температуре 37°C.

25 В конкретном варианте осуществления изобретения антитело, прежде всего гуманизированное антитело, предлагаемое в изобретении, включая любые функциональные эквиваленты антитела или его функциональные фрагменты, обладает способностью нарушать агрегацию ранее сформированных полимерных фибрилл или филаментов по меньшей мере на 24% при соотношении молярных
30 концентраций антитела и А β 1-42 1:100.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения антитело, прежде всего гуманизированное антитело, предлагаемое в изобретении, включая любые функциональные эквиваленты антитела или его функциональные фрагменты, обладает способностью нарушать агрегацию ранее сформированных полимерных
35 фибрилл или филаментов по меньшей мере на 32% при соотношении молярных концентраций антитела и А β ₁₋₄₂ 1:10.

Посредством нарушения агрегации амилоидогенных полимерных фибрилл или филаментов антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, обладают
40 способностью предупреждать или замедлять образование амилоидных бляшек, что приводит к облегчению симптомов, ассоциированных с заболеванием, и замедлению или прекращению его развития.

Таким образом, следующим вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего гуманизированное антитело, включая любые функциональные
45 эквиваленты антитела или его функциональные фрагменты, описанные выше, где антитело обладает способностью снижать общее количество А β в головном мозге животного, прежде всего млекопитающего, но предпочтительно человека, страдающего заболеванием или состоянием, которое приводит к повышенной
50 концентрации А β в головном мозге.

Следующим вариантом осуществления изобретения является гуманизированное антитело, предлагаемое в изобретении и описанное выше, где антитело обладает бифункциональностью, что проявляется как в способности ингибировать агрегацию,

так и в способности нарушать агрегацию, прежде всего в сочетании с высоким уровнем конформационной чувствительности.

В частности, изобретение относится к химерному антителу или его фрагменту, либо к гуманизированному антителу или его фрагменту, предлагаемому в изобретении и описанному выше, где антитело при совместной инкубации с амилоидными мономерными и/или полимерными растворимыми амилоидными пептидами, прежде всего с β -амилоидными мономерными пептидами, такими, например, как мономерные A β -пептиды 1-39, 1-40, 1-41 или 1-42, и/или полимерным растворимым β -амилоидным пептидом, содержащим множество указанных мономерных A β -звеньев, но прежде всего с A β ₁₋₄₂-мономерным и/или полимерным растворимым A β -амилоидным пептидом, содержащим множество указанных мономерных A β ₁₋₄₂-звеньев, ингибирует агрегацию A β -мономеров в высокомолекулярные полимерные фибриллы или филаменты и, кроме того, при совместной инкубации с ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами, которые образовались в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов, прежде всего мономерных β -амилоидных пептидов, таких, например, как мономерные A β -пептиды 1-39, 1-40, 1-41 или 1-42, но прежде всего мономерные AR₁₋₄₂-пептиды, обладает способностью нарушать агрегацию ранее сформированных полимерных фибрилл или филаментов.

Другим объектом изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в настоящем изобретении и описанное/описанный выше, где антитело обладает способностью индуцировать переход β -складчатой конформации в конформацию в виде α -спирали и/или произвольной спирали, но прежде всего в конформацию в виде произвольной спирали, еще более предпочтительно в конформацию в виде произвольной спирали в конкретной области молекулы, прежде всего в окрестности Thr 10 и Val 12 A β -белка, что приводит к повышению доли конформации в виде произвольной спирали за счет β -складчатой конформации и повышает солибилизацию ранее сформированных высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов. В частности, происходит снижение доли β -складчатой конформации по меньшей мере на 30%, прежде всего по меньшей мере на 35% и более предпочтительно по меньшей мере на 40% и более по сравнению с соответствующими ранее сформированными амилоидными полимерными фибриллами или филаментами, которые инкубировали в буфере (контроль).

Способность антитела индуцировать конформационный переход вторичной структуры можно определять любым приемлемым методом, известным в данной области, прежде всего с помощью ¹³C-ЯМР-спектроскопии твердого тела, но предпочтительно путем определения интегральных интенсивностей, обусловленных конформациями Thr 10 и Val 12 C β в A β ₁₋₄₂-пептиде.

Следующим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в настоящем изобретении и описанное/описанный выше, которое/который содержит по меньшей мере одну легкую цепь или ее фрагмент или по меньшей мере одну тяжелую цепь или ее фрагмент, где связывание антитела или его фрагмента с A β -мономером характеризуются высокой аффинностью связывания, при этом значение K_D составляет от по меньшей мере примерно 1×10^{-7} М до по меньшей мере примерно 1×10^{-12} М, предпочтительно от по меньшей мере примерно 1×10^{-8} М до по меньшей мере примерно 1×10^{-11} М, более предпочтительно от по меньшей мере

примерно 1×10^{-9} М до по меньшей мере примерно 1×10^{-10} М, еще более предпочтительно от по меньшей мере примерно 1×10^{-8} М до по меньшей мере примерно 2×10^{-8} М, но предпочтительно антитело или его фрагмент не дает какую-либо существенную перекрестную реакцию с амилоидным белком-предшественником (APP).

Еще одним вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в настоящем изобретении и описанное/описанный выше, которое/который содержит по меньшей мере одну легкую цепь или ее фрагмент или по меньшей мере одну тяжелую цепь или ее фрагмент, где связывание антитела или его фрагмента с А β -волоконном, -фибриллой или -филаментом характеризуются высокой аффинностью связывания, при этом значение K_D составляет от по меньшей мере примерно 1×10^{-7} М до по меньшей мере примерно 1×10^{-12} М, предпочтительно от по меньшей мере примерно 1×10^{-8} М до по меньшей мере примерно 1×10^{-11} М, более предпочтительно от по меньшей мере примерно 1×10^{-9} М до по меньшей мере примерно 1×10^{-10} М, еще более предпочтительно от по меньшей мере примерно 2×10^{-9} М до по меньшей мере примерно 5×10^{-9} М, но предпочтительно антитело или его фрагмент не дает какую-либо существенную перекрестную реакцию с амилоидным белком-предшественником (APP).

В другом варианте осуществления изобретения для антитела, предлагаемого в изобретении и описанного выше, или его фрагмента характерна аффинность к связыванию с А β -волоконном, -фибриллой или -филаментом, по меньшей мере в 2 раза, прежде всего по меньшей мере в 4 раза, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз, предпочтительно по меньшей мере в 15 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 20 раз, но наиболее предпочтительно по меньшей мере в 25 раз более высокая, чем аффинность к связыванию с А β -мономером.

Еще одним вариантом осуществления изобретения являются химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, описанное/описанный выше, где антитело характеризуется значительным связыванием с агрегированным А β , включая А β -бляшки, в организме млекопитающих, прежде всего в головном мозге человека, но предпочтительно не дает какую-либо существенную перекрестную реакцию с амилоидным белком-предшественником (APP).

Другим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, описанное/описанный выше, где антитело характеризуется значительным связыванием с растворимым полимерным амилоидом, прежде всего амилоидом β (А β), включая А β -мономеры, в организме млекопитающих, прежде всего в головном мозге человека, но предпочтительно не дает какую-либо существенную перекрестную реакцию с амилоидным белком-предшественником (APP).

Другим вариантом осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в изобретении и описанное/описанный выше, где антитело существенно снижает загрузку А β -бляшками (т.е. относительную площадь поверхности, занятую бляшками) в организме млекопитающего, прежде всего головного мозга человека. Это может происходить либо в результате связывания антитела с бляшкой, либо в результате сдвига равновесия между амилоидом, прежде всего амилоидом β (А β) в его нерастворимом и агрегированном состоянии, в сторону

его растворимой формы в результате нарушения агрегации волокон с образованием растворимых поли- и мономерных форм путем индукции изменения конформации и связывания и стабилизации амилоидных форм с нарушенной агрегацией и солюбилизованных амилоидных форм, прежде всего форм амилоида Р (AR), в ткани и/или жидкости организма, прежде всего в головном мозге. Благодаря активности антитела, предлагаемого в изобретении, происходит главным образом периферический клиренс и катаболизм вместо накопления в ткани и/или жидкости организма, прежде всего в головном мозге. Таким образом, благоприятное действие антитела, предлагаемого в изобретении, можно получать без связывания антитела с бляшкой.

Благодаря его стабилизирующей активности, антитело, предлагаемое в изобретении, обладает способностью нейтрализовать токсические действия полимерного и менее агрегированного растворимого амилоидного белка, прежде всего белка амилоида β ($A\beta$), в ткани и/или жидкости организма. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, может оказывать благоприятное действие без необходимости в связывании агрегированного амилоида бета в головном мозге.

Еще одним объектом изобретения является гуманизованное антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в настоящем изобретении и описанное/описанный выше, которое/который содержит по меньшей мере одну легкую цепь или ее фрагмент или по меньшей мере одну тяжелую цепь или ее фрагмент, в которые встроены по меньшей мере один, предпочтительно два и более предпочтительно три CDR-участка, полученных из мышинового донорского антитела, прежде всего мышинового антитела ACI-01-Ab7C2 (в контексте настоящего описания обозначенное также как «mC2» и «hC2» в случае гуманизованного антитела C2), которое депонировано 01 декабря 2005 г. в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Брауншвейг, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Branuschweig, под регистрационным номером DSM ACC2750, где антитело или его фрагмент обладает аффинностью к антигену $A\beta$, по меньшей мере в 5 раз, предпочтительно по меньшей мере в 8 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 10 раз, но наиболее предпочтительно по меньшей мере в 15 раз более высокой по сравнению с мышинным донорским антителом.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, может представлять собой полное антитело (например, с двумя полноразмерными легкими цепями и двумя полноразмерными тяжелыми цепями) любого изотипа и подтипа (например, IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 и IgA2); но наиболее предпочтительно антитело IgG4-изотипа; в альтернативном варианте в другом варианте осуществления изобретения оно может представлять собой антигенсвязывающий фрагмент (например, Fab, $F(ab')_2$ и Fv) полного антитела.

Таким образом, изобретение относится также к антигенсвязывающим фрагментам антител, представленных в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления изобретения фрагмент выбирают из группы, включающей Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, $F(ab)_2$ -фрагмент и Fv-фрагмент, включая продукты экспрессирующей Fab библиотеки иммуноглобулинов и эпитопсвязывающие фрагменты любого из указанных выше антител и фрагментов.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в изобретении, конъюгируют с полиэтиленгликолем. А другом варианте осуществления изобретения

константную область антитела, предлагаемого в изобретении, модифицируют для снижения по меньшей мере одной опосредуемой константной областью биологической эффекторной функции по сравнению с немодифицированным антителом. В еще одном варианте осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемые в изобретении, содержат Fc-область с измененной эффекторной функцией.

Изобретение относится также к нуклеотидной молекуле, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую химерное антитело или его фрагмент или гуманизированное антитело или фрагмент, предлагаемое(ый) в изобретении и описанные выше.

В частности, изобретение относится к нуклеотидной молекуле, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую состоящий из смежных молекул аминокислот участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:2 и 3 соответственно, или комплементарную последовательность, которые представляют собой гипервариабельные участки (CDR) 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR).

Более конкретно, изобретение относится к нуклеотидной молекуле, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую состоящий из смежных молекул аминокислот участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:4, или комплементарную последовательность, которая представляет собой гипервариабельный участок (CDR) 1 вариабельной области легкой цепи (LCVR).

Другим вариантом осуществления изобретения является нуклеотидная молекула, которая содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:19, или комплементарную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность CDR2 и CDR3 соответственно вариабельной области тяжелой цепи (HCVR).

Следующим вариантом осуществления изобретения является нуклеотидная молекула, которая содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:20, или комплементарную последовательность, кодирующую CDR1 вариабельной области легкой цепи (LCVR).

Еще одним вариантом осуществления изобретения является нуклеотидная молекула, которая содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:21, или комплементарную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи.

Другим вариантом осуществления изобретения является нуклеотидная молекула, которая содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:22, или комплементарную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, включая сигнальные последовательности.

Другим вариантом осуществления изобретения является нуклеотидная молекула, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, которая представлена в SEQ ID NO:22, и константную область легкой цепи, которая представлена в SEQ ID NO:23. Изобретение относится также к комплементарной цепи указанной нуклеотидной молекулы.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является нуклеотидная молекула, которая содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:24, которая кодирует вариабельную область тяжелой цепи. Изобретение относится также к комплементарной цепи указанной нуклеотидной молекулы.

Другим вариантом осуществления изобретения является нуклеотидная молекула,

которая содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, которая кодирует вариабельную область тяжелой цепи, включая сигнальные последовательности. Изобретение относится также к комплементарной цепи указанной нуклеотидной молекулы.

Другим вариантом осуществления изобретения является нуклеотидная молекула, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, которая представлена в SEQ ID NO:25, и константную область тяжелой цепи, которая представлена в SEQ ID NO:26. Изобретение относится также к комплементарной цепи указанной нуклеотидной молекулы.

Настоящее изобретение относится также к нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется с одной из описанных выше кодирующих антитело нуклеотидных последовательностей, предлагаемых в изобретении, прежде всего с ее комплементарной цепью, либо в выделенном состоянии, либо в виде фрагмента более крупной нуклеотидной молекулы.

В частности, изобретение относится к любой нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется в общепринятых условиях гибридизации, прежде всего в строгих условиях гибридизации, с любой нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:18-26 и 29-32, прежде всего с ее комплементарной цепью.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является экспрессионный вектор, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, предлагаемую в изобретении и описанную выше.

Следующим вариантом осуществления изобретения является клетка, которая содержит экспрессионный вектор, включающий нуклеиновую кислоту, предлагаемую в изобретении и описанную выше.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является композиция, которая содержит антитело, предлагаемое в изобретении, но предпочтительно химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в изобретении и описанное/описанный выше, включая любое функционально эквивалентное антитело или любое производное, или функциональные фрагменты, в терапевтически эффективном количестве, в частности композиция, представляющая собой фармацевтическую композицию, которая необязательно содержит также фармацевтически приемлемый носитель.

В другом варианте осуществления изобретения композиция содержит антитело в терапевтически эффективном количестве.

Кроме того, под объем изобретения подпадает смесь, которая содержит антитело, прежде всего моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении, но прежде всего химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в изобретении и описанное/описанный выше, включая любое функционально эквивалентное антитело или любое производное, или функциональные фрагменты, в терапевтически эффективном количестве и необязательно дополнительную биологически активную субстанцию и/или фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель, и/или эксципиент.

В частности, изобретение относится к смеси, в которой дополнительная биологически активная субстанция представляет собой соединение, которое применяют для медикаментозного лечения амилоидоза, группы заболеваний и нарушений, ассоциированных с амилоидом или амилоидоподобным белком, таким как Аβ-белок, включая болезнь Альцгеймера.

В другом варианте осуществления изобретения дополнительная биологически

активная субстанция или соединение может представлять собой также терапевтический агент, который можно использовать для лечения амилоидоза, вызываемого амилоидом β , или можно использовать для медикаментозного лечения других неврологических нарушений.

5 Дополнительная биологически активная субстанция или соединение может обладать биологическим действием, опосредуемым таким же или сходным механизмом, что и антитело, предлагаемое в изобретении, или обладать неродственным механизмом действия или сочетанием родственных и/или
10 неродственных механизмов действия.

 Дополнительная биологически активная субстанция или соединение может представлять собой энхансеры нейтронной трансмиссии, психотерапевтические лекарственные средства, ингибиторы ацетилхолинэстеразы, блокаторы кальциевых
15 каналов, биогенные амины, транквилизаторы на основе бензодиазепинов, усилители синтеза, накопления или высвобождения ацетилхолина, агонисты постсинаптического рецептора ацетилхолина, ингибиторы моноаминоксидазы-А или -В, антагонисты рецептора N-метил-D-аспартатглутамата (NMDA), нестероидные
20 противовоспалительные лекарственные средства, антиоксиданты и антагонисты серотонергического рецептора.

 Более конкретно, смесь, предлагаемая в изобретении, может содержать по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, включающей соединения против окислительного стресса, антиапоптозные соединения, хелаторы металлов, ингибиторы
25 репарации ДНК, такие как пирензепин и метаболиты, 3-амино-1-пропансульфоновую кислоту (3APS), 1,3-пропандисульфонат (1,3PDS), активаторы секретаз, ингибиторы P- и γ -секретаз, tau-белки, нейромедиатор, разрушители [3-складчатой конформации, аттрактанты для клеточных компонентов, участвующих в клиренсе/истощении амилоида бета, ингибиторы укороченного на N-конце амилоида бета, включая
30 пироглутаматированный амилоид бета 3-42, противовоспалительные молекулы или ингибиторы холинэстеразы (ChEI), такие как такрин, ривастигмин, донепезил и/или галантамин, агонисты M1 и другие лекарственные средства, включая любое модифицирующее амилоид или tau-белок лекарственное средство, и пищевые добавки, в сочетании с антителом, предлагаемым в изобретении, и необязательно
35 фармацевтически приемлемым носителем и/или разбавителем, и/или эксципиентом.

 Изобретение относится также к смеси, в которой соединение представляет собой ингибитор холинэстеразы (ChEI), прежде всего, к смеси, в которой соединение представляет собой соединение, выбранное из группы, включающей такрин,
40 ривастигмин, донепезил, галантамин, ниацин и мемантин.

 В следующем варианте осуществления изобретения смеси, предлагаемые в изобретении, содержат ниацин или мемантин в сочетании с антителом, предлагаемым в настоящем изобретении, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель, и/или эксципиент.

45 Еще одним вариантом осуществления изобретения являются смеси, которые содержат «атипичные антипсихотические средства», такие, например, как клозапин, зипрасидон, рисперидон, арипипразол или оланзапин, предназначенные для лечения позитивных или негативных психотических симптомов, включая галлюцинации, бред, нарушения мышления (проявляющиеся в выраженной непоследовательности действий,
50 психическом расстройстве, расстройстве ассоциативного мышления) и эксцентричное или неорганизованное поведение, а также ангедонию, пониженную эмоциональную реакцию, апатию и отказ от общества, в сочетании с антителом, прежде всего

моноклональным антителом, предлагаемым в изобретении, но предпочтительно с химерным антителом или его фрагментом или гуманизированным антителом или его фрагментом, предлагаемыми в изобретении и описанными выше, и необязательно фармацевтически приемлемым носителем и/или разбавителем, и/или эксципиентом.

В конкретных вариантах осуществления изобретения композиции и смеси, предлагаемые в изобретении и описанные выше, содержат антитело, и биологически активную субстанцию соответственно в терапевтически эффективном количестве.

Другие соединения, которые можно применять в смесях в сочетании с антителом, предлагаемым в настоящем изобретении, описаны, например, в WO 2004/058258 (см. прежде всего сс.16 и 17), включая мишени терапевтических лекарственных средств (сс.36-39), алкансульфоновые кислоты и алкансерные кислоты (сс.39-51), ингибиторы холинэстеразы (сс.51-56), антагонисты NMDA-рецептора (сс.56-58), эстрогены (сс.58-59), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (сс.60-61), антиоксиданты (сс.61-62), агонисты рецепторов, активируемых пероксисомальными пролифераторами (PPAR) (сс.63-67), агенты, понижающие уровень холестерина (сс.68-75); ингибиторы амилоида (сс.75-77), ингибиторы образования амилоида (сс.77-78), хелаторы металлов (сс.78-79), антипсихотические средства и антидепрессанты (сс.80-82), пищевые добавки (сс.83-89) и соединения, повышающие доступность биологически активных субстанций в головном мозге (см. сс.89-93) и пролекарства (сс.93 и 94); указанный документ включен в настоящее описание в качестве ссылки.

Другим вариантом осуществления изобретения является смесь, содержащая антитело, прежде всего моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении, но предпочтительно химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в изобретении и описанное/описанный выше, и/или биологически активную субстанцию в терапевтически эффективном количестве.

Изобретение относится также к применению антитела, прежде всего моноклонального антитела, предлагаемого в изобретении, но предпочтительно химерного антитела или его фрагмента, либо гуманизированного антитела или его фрагмента, предлагаемого в изобретении и описанного выше, и/или его функционального фрагменты и/или фармацевтической композиции или смеси, содержащей указанное антитело, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или облегчения воздействий амилоидоза, группы заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь только ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также других заболеваний, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, таких как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельдта-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и других заболеваний, включая дегенерацию желтого пятна.

Настоящее изобретение относится также к способу получения антитела, прежде всего моноклонального антитела, предлагаемого в изобретении, но предпочтительно химерного антитела или его фрагмента, либо гуманизированного антитела или его

фрагмента, предлагаемого в изобретении и описанного выше, и/или его функционального фрагмента, и/или фармацевтической композиции, или смеси, содержащей указанное антитело, предпочтительно в терапевтически эффективном количестве, для использования в способе предупреждения, лечения или облегчения 5 воздействий амилоидоза, группы заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь только ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), деменция, связанная с тельцами 10 Леви, синдром Дауна, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также других заболеваний, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, таких как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS 15 (амиотрофический боковой склероз), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и других заболеваний, включая дегенерацию желтого пятна, заключающемуся в том, что приготавливают препарат антитела, предлагаемого в изобретении, прежде всего моноклонального антитела, 20 предлагаемого в изобретении, но предпочтительно химерного антитела или его фрагмента или гуманизированного антитела или его фрагмента, предлагаемых в изобретении, в виде фармацевтически приемлемой формы.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу предупреждения, лечения или облегчения воздействий амилоидоза, группы заболеваний и нарушений, 25 ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь только ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также 30 других заболеваний, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, таких как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), диабет взрослых; старческий сердечный 35 амилоидоз; эндокринные опухоли и других заболеваний, включая дегенерацию желтого пятна, заключающемуся в том, что вводят антитело и/или его функциональный фрагмент, но предпочтительно гуманизированное антитело и/или его функциональный фрагмент, или композицию, или смесь, содержащую указанное антитело и/или его функциональный фрагмент, животному или человеку, 40 пораженному указанным нарушением, при этом антитело вводят в терапевтически эффективном количестве.

Кроме того, объектом изобретения является способ лечения амилоидоза, группы заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, 45 включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь только ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), прежде всего заболевания или состояния, которое характеризуется утратой когнитивной способности к запоминанию, заключающемуся в том, что 50 вводят животному, прежде всего млекопитающему или человеку, антитело, предпочтительно фармацевтическую композицию, предлагаемую в изобретении и описанную выше.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является способ сохранения

или повышения когнитивной способности к запоминанию, но прежде всего для восстановления когнитивной способности к запоминанию у животного, прежде всего млекопитающего или человека, страдающего нарушением памяти, заключающийся в том, что вводят животному, прежде всего млекопитающему или человеку, антитело, предпочтительно фармацевтическую композицию, предлагаемую в изобретение и описанную выше.

Еще одним объектом изобретения является терапевтическая композиция и способ получения указанной композиции, а также способ лечения амилоидоза, группы заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь только ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), прежде всего заболевания или состояния, которое характеризуется утратой когнитивной способности к запоминанию, с помощью антитела, предлагаемого в изобретении и описанного выше.

В частности, изобретение относится к лечению животного, прежде всего млекопитающего или человека, страдающего ассоциированным с амилоидом состоянием, которое характеризуется утратой когнитивной способности к запоминанию, приводящему к сохранению когнитивной способности к запоминанию.

Изобретение относится также к способу диагностирования ассоциированного с амилоидом заболевания или состояния у пациента, заключающемуся в том, что выявляют иммуноспецифическое связывание антитела или его активного фрагмента с эпитопом амилоидного белка в образце *in situ*, включающему стадии, на которых

(а) приводят в контакт образец или специфическую часть организма или область организма, которая, как ожидается, может содержать амилоидный белок, с антителом, прежде всего с моноклональным антителом, предлагаемым в изобретении, но предпочтительно с химерным антителом или его фрагментом, либо с гуманизированным антителом или его фрагментом, предлагаемым в изобретении и описанным выше, и/или его функциональным фрагментом, где антитело связывается с эпитопом амилоидного белка;

(б) дают возможность антителу и/или его функциональному фрагменту связаться с амилоидным белком с образованием иммунологического комплекса;

(в) выявляют образование иммунологического комплекса; и

(г) устанавливают корреляцию между присутствием или отсутствием иммунологического комплекса и присутствием или отсутствием амилоидного белка в образце или специфической части или области организма.

Кроме того, в изобретении предложен способ определения степени загрузки амилоидогенными бляшками ткани и/или жидкости организма, заключающийся в том, что

а) получают образец, репрезентативный для изучаемой ткани и/или жидкости организма;

б) оценивают присутствие в образце амилоидного белка с помощью антитела, прежде всего моноклонального антитела, предлагаемого в изобретении, но предпочтительно химерного антитела или его фрагмента, либо гуманизированного антитела или его фрагмента, предлагаемого в изобретении и описанного выше, и/или его функционального фрагмента;

в) определяют количество антитела, связанного с белком; и

г) рассчитывают загрузку бляшками ткани и/или жидкости организма.

В частности, изобретение относится к способу определения степени загрузки

амилоидогенными бляшками ткани и/или жидкости организма, в котором образование иммунологического комплекса на стадии в) определяют таким образом, что присутствие или отсутствие иммунологического комплекса коррелирует с присутствием или отсутствием амилоидного белка.

5 Еще одним вариантом осуществления изобретения является тест-набор для выявления и диагностирования ассоциированных с амилоидом заболеваний и состояний, который содержит антитело, прежде всего моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении, но предпочтительно химерное антитело или его
10 фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый изобретении и описанное/описанный выше, и/или его функциональный фрагмент.

В частности изобретение относится к тест-набору для выявления и
15 диагностирования ассоциированных с амилоидом заболеваний и состояний, который содержит контейнер, в котором находится одно или несколько антител, предлагаемых в настоящем изобретении, и/или его/их функциональный фрагмент и инструкции по применению антител для связывания с амилоидным белком с образованием
20 иммунологического комплекса и выявления образования иммунологического комплекса таким образом, что присутствие или отсутствие иммунологического комплекса коррелирует с присутствием или отсутствием амилоидного белка.

Следующим объектом изобретения является антитело, которое содержит
25 переменную область, представленную в SEQ ID NO:27, или ее вариант. Еще одним вариантом осуществления изобретения является клеточная линия, экспрессирующая антитело.

Другим объектом изобретения является ген антитела, которое содержит
30 переменную область, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:29, или ее вариант. Еще одним вариантом осуществления изобретения является клеточная линия, экспрессирующая антитело.

Следующим объектом изобретения является способ нарушения агрегации ранее
сформированных бета-амилоидных волокон, заключающийся в том, что осуществляют взаимодействие антитела hC2 с ранее сформированными бета-амилоидными волокнами.

35 Еще одним объектом изобретения является гуманизированное антитело или его фрагмент по одному из предыдущих пунктов, где антитело или его фрагмент защищают нейроны от индуцируемой Абета деградации.

40 Еще одним объектом изобретения является способ предупреждения индуцируемой Абета деградации нейронов, заключающийся в том, что обрабатывают нейроны взятым в эффективном количестве гуманизированным антителом или его фрагментом, предлагаемым в настоящем изобретении.

45 Еще одним объектом изобретения является применение гуманизированного антитела или его фрагмента, предлагаемого в настоящем изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для предупреждения дегенерации нейронов, связанной с олигомером Абета.

50 Эти и другие объекты, особенности и преимущества настоящего изобретения должны стать очевидными после ознакомления с приведенным ниже подробным описанием вариантов осуществления изобретения и прилагаемой формулы изобретения.

Краткое описание чертежей и последовательностей

На чертежах показано;

на фиг.1 (пример 2) - кассета экспрессии вариабельной области мышиной легкой цепи химерного антитела;

на фиг.2 (пример 2) - кассета экспрессии вариабельной области мышиной тяжелой цепи химерного антитела;

5 на фиг.3 (пример 5.2) - сравнение вариабельной области мышиной тяжелой цепи с наиболее близкой последовательностью мышиной зародышевой линии;

на фиг.4 (пример 8) - активность очищенных гуманизированных антител C2;

на фиг.5 - (пример 9) - активность связывания антител, образовавшихся в результате кратковременной экспрессии конструкций C2 с модифицированным CDRL2, в сочетании с химерной тяжелой цепью C2, по сравнению с химерным антителом C2ChVHAF/ChVK, образовавшимся в результате кратковременной трансфекции, и очищенным антителом;

15 на фиг.6 (пример 11) - результаты иммуногистохимического анализа связывания с химерным антителом AF и гуманизированным антителом H4K1;

на фиг.7 (пример 12) - функциональная активность mC2 в отношении амилоидных волокон;

на фиг.8 (пример 12) - аффинность связывания гуманизированного C2, оцененная с помощью ELISA;

на фиг.9 (пример 14) - конформационная специфичность связывания mC2 с различными классами амилоидного белка. Получение гранул (Pellet) в описании к данному чертежу относится к получению волокон A β ₁₋₄₂, получение супернатанта относится к мономерам амилоида;

25 на фиг.10 - последовательности VK гуманизированного C2 в сравнении с мышиной последовательностью и человеческими акцепторными последовательностями DPK15 и JK1;

на фиг.11 - последовательности VH гуманизированного C2 в сравнении с мышиной последовательностью и человеческими акцепторными последовательностями DP54 и JH6;

на фиг.12 - полная последовательность ДНК и последовательность белка вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела C2, т.е. C2HuVK1;

35 на фиг.13 - полная последовательность ДНК и последовательность белка константной области легкой цепи (человеческая C-каппа цепь) гуманизированного антитела C2;

на фиг.14 - полная последовательность ДНК и последовательность белка константой области тяжелой цепи (человеческий IgG4 ser228-pro) гуманизированного антитела C2;

на фиг.15 (пример 15) - результаты экспериментов по эпитопному картированию;

на фиг.16 (пример 13) - результаты экспериментов по оценке агрегации;

на фиг.17 (пример 13) - результаты экспериментов по оценке нарушения агрегации;

на фиг.18 (пример 16) - результаты экспериментов по оценке нейрозащитного действия гуманизированного антитела C2.

SEQ ID NO:1 Аминокислотная последовательность гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи (CDR1) C2 HuVH AF 4.

50 SEQ ID NO:2 Аминокислотная последовательность гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи (CDR2) C2 HuVH AF 4.

SEQ ID NO:3 Аминокислотная последовательность гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи (CDR3) C2 HuVH AF 4.

SEQ ID NO:4 Аминокислотная последовательность гуманизированной

вариабельной области легкой цепи (CDR1) C2 HuVK 1.

SEQ ID NO:5 Аминокислотная последовательность гуманизированной
вариабельной области легкой цепи (CDR2) C2 HuVK I.

5 SEQ ID NO:6 Аминокислотная последовательность гуманизированной
вариабельной области легкой цепи (CDR3) C2 HuVK I.

SEQ ID NO:7 Аминокислотная последовательность области 2 эпитопа Aβ.

SEQ ID NO:8 Аминокислотная последовательность области 1 эпитопа Aβ.

10 SEQ ID NO:9 Аминокислотная последовательность модифицированной области 2
эпитопа Aβ.

SEQ ID NO:10 Аминокислотная последовательность модифицированной области 1
эпитопа Aβ.

15 SEQ ID NO:11 Аминокислотная последовательность модифицированной полной
области эпитопа.

SEQ ID NO:12 Аминокислотная последовательность гуманизированной
вариабельной области легкой цепи C2 HuVK 1.

SEQ ID NO:13 Аминокислотная последовательность гуманизированной легкой цепи
C2.

20 SEQ ID NO:14 Аминокислотная последовательность константной области легкой
цепи гуманизированного C2.

SEQ ID NO:15 Аминокислотная последовательность гуманизированной
вариабельной области тяжелой цепи C2 HuVH AF 4.

25 SEQ ID NO:16 Аминокислотная последовательность гуманизированной тяжелой
цепи C2.

SEQ ID NO:17 Аминокислотная последовательность модифицированной C-области
гамма-4 цепи IG.

30 SEQ ID NO:18: Нуклеотидная последовательность CDR2 гуманизированной
вариабельной области тяжелой цепи C2 HuVH AF 4,

SEQ ID NO: 19: Нуклеотидная последовательность CDR3 гуманизированной
вариабельной области тяжелой цепи C2 HuVH AF 4.

SEQ ID NO:20: Нуклеотидная последовательность CDR1 гуманизированной
вариабельной области легкой цепи C2 HuVK 1.

35 SEQ ID NO: 21: Нуклеотидная последовательность гуманизированной вариабельной
области легкой цепи C2 HuVK 1.

SEQ ID NO: 22: Нуклеотидная последовательность гуманизированной легкой цепи
C2.

40 SEQ ID NO:23: Нуклеотидная последовательность гуманизированной константной
области легкой цепи C2.

SEQ ID NO:24: Нуклеотидная последовательность гуманизированной вариабельной
области тяжелой цепи C2 HuVH AF 4.

45 SEQ ID NO:25: Нуклеотидная последовательность гуманизированной тяжелой цепи
C2.

SEQ ID NO:26: Нуклеотидная последовательность гуманизированной константной
области тяжелой цепи C2.

50 SEQ ID NO:27: Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой
цепи мышиноного C2.

SEQ ID NO: 28: Аминокислотная последовательность вариабельной области
тяжелой цепи мышиноного C2.

SEQ ID NO: 29: Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой

цепи мышиноного С2.

SEQ ID NO 30: Нуклеотидная последовательность легкой цепи мышиноного С2.

SEQ ID NO:31: Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышиноного С2.

5 SEQ ID NO:32: Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи мышиноного С2.

Определения

Понятия «полипептид», «пептид» и «белок» в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо, и они обозначают биологическую молекулу, состоящую из аминокислот, сцепленных пептидной связью.

10 В контексте настоящего описания упоминание единственного числа может обозначать «один или несколько» и, если не указано иное, то оно включает множественное число.

15 Понятие «заболевания и нарушения, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками» включает (но не ограничиваясь только ими) заболевания и нарушения, обусловленные присутствием или активностью амилоидоподобных белков в мономерном, фибриллярном или полимерном состоянии или в любом сочетании указанных трех состояний. Такие болезни и нарушения 20 включают (но не ограничиваясь только ими) амилоидоз, эндокринные опухоли и дегенерацию желтого пятна.

Понятие «амилоидоз» относится к группе заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая (но не ограничиваясь только ими) вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая такие 25 болезни как (но не ограничиваясь только ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также 30 другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых и старческий сердечный амилоидоз; и различные глазные болезни, включая дегенерацию желтого пятна, связанную с друзами оптическую невропатию и катаракту, связанную с отложением бета-амилоида.

40 Понятия «выявление (обнаружение)» или «выявленный (обнаруженный)» в контексте настоящего описания означает применение известных методик для выявления биологических молекул, таких как иммунохимические или гистологические методы, и относятся к качественному или количественному выявлению присутствия или определению концентрации исследуемой биологической молекулы.

45 Понятие «полимерный растворимый амилоид» относится к множеству агрегированных мономеров амилоидных пептидов или амилоидоподобных пептидов, или модифицированных или укороченных амилоидных пептидов, или других производных амилоидных пептидов, формирующих олигомерные или полимерные 50 структуры, которые являются растворимыми в организме млекопитающего или человека, более предпочтительно в головном мозге, но предпочтительно относится к множеству агрегированных мономеров амилоида β (A β) или модифицированных или укороченных пептидов амилоида β (A β) или их производных, которые являются

растворимыми в организме млекопитающего или человека, более предпочтительно в головном мозге.

Понятие «амилоид β , A β или β -амилоид» имеет значение, известное в данной области, и относится к белкам или пептидам амилоида (3, белку-предшественнику амилоида β (APP), а также к их модификациям, фрагментам и любым функциональным эквивалентам. В частности, под понятие «амилоид β » в контексте настоящего описания подпадает любой фрагмент, полученный протеолитическим расщеплением APP, но прежде всего фрагменты, которые участвуют или которые ассоциированы с амилоидной патологией, включая (но не ограничиваясь только ими) A β_{1-38} , A β_{1-39} , A β_{1-40} , A β_{1-41} , A β_{1-42} и A β_{1-43} .

Структура и последовательности указанных выше пептидов амилоида β хорошо известны специалистам в данной области и методы получения указанных пептидов или их экстракции из головного мозга и других тканей описаны, например, у Glenner и Wong, *Biochem Biophys Res Comm* 129, 1984, сс.885-890. Кроме того, пептиды амилоида β имеются также в продаже в различных формах.

Понятие «выделенный» относится к биологической молекуле, свободной по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми она встречается в естественных условиях.

Понятия «антитело» или «антитела» в контексте настоящего описания имеют известное в данной области значение и относятся к молекулам или активным фрагментам молекул, которые связываются с известными антигенами, прежде всего к молекулам иммуноглобулинов и к иммунологически активным фрагментам молекул иммуноглобулинов, т.е. молекулам, которые содержат сайт связывания, специфически связывающийся с антигеном. Иммуноглобулин представляет собой белок, который содержит один или несколько полипептидов, которые практически кодируются генами каппа- и лямбда-, альфа-, гамма, дельта-, эpsilon- и мю-цепи константной области иммуноглобулина, а также множеством генов вариабельных областей иммуноглобулина. Легкие цепи классифицируются как либо каппа-, либо лямбда-цепь. Тяжелые цепи классифицируются как гамма-, мю-, альфа, дельта- или эpsilon-цепь, которые в свою очередь определяют классы иммуноглобулинов, т.е. IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. Известны также подклассы тяжелых цепей. Например, тяжелые цепи IgG у человека могут относиться к любому из подклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Иммуноглобулины, предлагаемые в изобретении, могут относиться к любому классу (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA и IgY) или подклассу (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) молекулы иммуноглобулина.

В контексте настоящего описания понятие «специфически связывает(ся)» касательно антитела означает, что антитело связывается с его антигеном-мишенью с более высокой аффинностью, чем со структурно отличным(и) антигеном(ами).

Известно, что типичная структурная единица иммуноглобулина представляет собой тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара включает одну «легкую» (примерно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (примерно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи представляет собой вариабельную область, состоящую примерно из 100-110 или большего количества аминокислот, которые прежде всего ответственны за распознавание антигена. Понятия вариабельная область легкой цепи (V_L) и вариабельная область тяжелой цепи (V_H) относятся к этим легким и тяжелым цепям соответственно.

Антитела могут представлять собой полноразмерные интактные антитела или множество хорошо охарактеризованных фрагментов, полученных в результате

расщепления различными пептидазами или химическими агентами. Так, например, пепсин расщепляет антитело ниже дисульфидных связей в шарнирной области с образованием $F(ab')_2$, димера Fab, который сам представляет собой легкую цепь, соединенную с V_H-C_H1 дисульфидным мостиком. $F(ab')_2$ можно восстанавливать в мягких условиях с расщеплением дисульфидной связи в шарнирной области, превращая тем самым димер $F(ab')_2$ в мономер Fab'. Мономер Fab' практически представляет собой Fab-фрагмент с частью шарнирной области (см., *Fundamental Immunology*, под ред. W.E.Paul, изд-во Raven Press, N.Y. 1993, где более подробно описаны другие фрагменты антител). Хотя различные фрагменты антител описывают с позиций расщепления интактного антитела, специалисту в данной области должно быть очевидно, что любые из разнообразных фрагментов антител можно синтезировать de novo либо химически, либо с помощью рекомбинантной ДНК. Таким образом, понятие «антитело» в контексте настоящего описания включают фрагменты антител, либо полученные модификацией полных антител, либо синтезированные de novo, либо антитела и фрагменты, полученные с помощью методов рекомбинантной ДНК.

Согласно настоящему изобретению подразумевается, что к «антителам» относятся моноклональные антитела, поликлональные антитела, химерные, одноцепочечные, биспецифические, симианизированные (включающие участки обезьяньих антител), человеческие и гуманизированные антитела, а также их активные фрагменты. Например, к активным фрагментам молекул, которые связываются с известными антигенами, относятся разделенные легкие и тяжелые цепи, Fab-, Fab/c-, Fv-, Fab'- и $F(ab')_2$ -фрагменты, включая продукты экспрессионной библиотеки Fab-фрагментов иммуноглобулинов и связывающиеся с эпитопом фрагменты любых антител и их указанных фрагментов.

Указанные активные фрагменты можно получать из антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, с помощью многочисленных методик. Например, очищенные моноклональные антитела можно расщеплять ферментом, таким как пепсин, и подвергать ЖХВР-гель-фильтрации. Затем соответствующую фракцию, содержащую Fab-фрагменты, можно собирать и концентрировать с помощью фильтрации через мембрану и т.п. Дополнительное описание общих методик выделения активных фрагментов антител описано, например, у Khaw B.A. и др. *J. Nucl. Med.* 23, 1982, сс.1011-1019; Rousseaux и др., *Methods Enzymology*, 121, изд-во Academic Press, 1986, сс.663-669.

Рекомбинантные антитела могут представлять собой обычные полноразмерные антитела, известные активные фрагменты антител, полученные в результате протеолитического расщепления, одиночные активные фрагменты антител, такие как Fv или одноцепочечные Fv (scFv), антитела с удаленными в результате делеции домена или т.п. Fv-фрагмент антитела имеет размер примерно 50 кДа и содержит переменные области легкой и тяжелой цепи. Полипептид одноцепочечного Fv («scFv») представляет собой ковалентно связанный гетеродимер $VH::VL$, который может экспрессироваться нуклеиновой кислотой, содержащей кодирующие VH- и VL-последовательности либо соединенные непосредственно, либо соединенные с помощью кодирующего пептид линкера (см. Huston и др., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85, 1988, сс.5879-5883). Известно много структур для превращения встречающихся в естественных условиях агрегированных, но химически разделенных полипептидов легких и тяжелых цепей из V-области антитела, в scFv-молекулы, которые складываются в трехмерную структуру, практически сходную со структурой

антигенсвязывающего центра (см., например, US 5091513, 5132405 и 4956778).

Антигенсвязывающий центр обозначает часть молекулы антитела, которая участвует в связывании антигена. Антигенсвязывающий центр образуется аминокислотными остатками N-концевых переменных («V») областей тяжелой («H») и легкой («L») цепей. Переменные области антитела содержат три отличающиеся высокой дивергентностью участка, которые называют «гиперпеременными участками» или «определяющими комплементарность участками» (CDR), которые расположены между более консервативными фланкирующими участками, которые называют «каркасными участками» (FR). В молекуле антитела три гиперпеременных участка легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) и три гиперпеременных участка тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) располагаются относительно друг друга в трехмерном пространстве, образуя антигенсвязывающую поверхность или «карман». Таким образом, антигенсвязывающий центр антитела представлен аминокислотами, которые формируют CDR антитела, и любыми каркасными участками, которые формируют «карман» центра связывания.

Идентичность аминокислотных остатков в конкретном антителе, которые образуют антигенсвязывающий центр, можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области. Например, CDR антитела можно идентифицировать как гиперпеременные участки, определение которых первоначально было дано Кэботом с соавторами (см. «Sequences of Proteins of Immunological Interest», E.Kabat и др., U.S.Department of Health and Human Services; Johnson G и Wu TT, Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Research, 29, 2001, сс.205-206; <http://immuno.bme.nwa.edu>). Положения CDR можно идентифицировать также в виде структур, имеющих форму петель, первоначально описанных Chothia с соавторами (см. Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, с.901, Chothia и др., Nature 342, 1989, с.877 и Tramontane и др., J. Mol. Biol. 215, 1990, с.175). Другие методы включают использование номенклатуры, основанной на применении программы моделирования антител (AbM-номенклатура), которая представляет собой компромисс между номенклатурой Кэбота и Chothia, и ее реализуют с помощью пакета программ Oxford Molecular's AbM antibody modeling (в настоящее время принадлежит компании Accelrys), или определение CDR на основе «анализа контакта», предложенного Macallum с соавторами («Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding topography», J Mol Biol., 11, 262(5), октябрь 1996 г., сс.732-745). Ниже представлены схемы идентификации CDR на основе различных известных определений.

Петля	Кэбот	AbM	Chothia	Контакт
---	-----	-----	-----	-----
L11	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
(номенклатура Кэбота)				
H1	H31--H35	H26--H35	H26--H32	H30--H35
(номенклатура Chothia)				
H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

Ниже приведены общие руководства, с помощью которых можно идентифицировать CDR в антителе только на основе информации о последовательности:

LCDR1:

Начало - приблизительно на остатке 24.

Остаток, расположенный перед участком, всегда представляет собой Cys.

Остаток, расположенный после участка, всегда представляет собой Trp. Как правило, за TRP располагаются TYR-GLN, но также могут располагаться LEU-GLN, PHE-GLN или TYR-LEU.

Длина участка составляет 10-17 остатков.

LCDR2:

Начало - через 16 остатков после конца L1.

Расположенная перед участком последовательность, как правило, представляет собой ILE-TYR, но она может также представлять собой VAL-TYR, ILE-LYS или ILE-PHE.

Длина участка, как правило, составляет 7 остатков.

LCDR3:

Начало - как правило, через 33 остатка после конца L2. Остаток, расположенный перед участком, представляет собой Cys. Расположенная за участком последовательность представляет собой PHE-GLY-X-GLY. Длина участка составляет 7-11 остатков.

HCDR1:

Начало - приблизительно на остатке 26 (через четыре остатка после CYS) [номенклатура Chothia/AbM], согласно номенклатуре Кэбота начало находится на 5 остатков дальше.

Расположенная перед участком последовательность представляет собой CYS-X-X-X.

Последующие остатки - TRP, за которым, как правило, расположен VAL, но также может располагаться ILE или ALA.

Длина участка составляет 10-12 остатков согласно AbM-номенклатуре, в то время как согласно номенклатуре Chothia исключены 4 последних остатка.

HCDR2:

Начало - через 15 остатков после конца CDR-H1 согласно номенклатуре Кэбота/AbM.

Расположенная перед участком последовательность, как правило, представляет собой LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEQ ID NO: 1), но возможен ряд вариантов.

Расположенная за участком последовательность представляет собой LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA

Длина участка составляет 16-19 остатков согласно номенклатуре Кэбота (согласно AbM-номенклатуре участок заканчивается на 7 остатков раньше).

HCDR3:

Начало - через 33 остатка после конца CDR-H2 (через два остатка после CYS).

Расположенная перед участком последовательность представляет собой CYS-X-X (как правило, CYS-ALA-ARG).

Расположенная за участком последовательность представляет собой TRP-GLY-X-GLY.

Длина участка составляет 3-25 остатков.

Идентичность аминокислотных остатков конкретного антитела, которые расположены вне CDR, но тем не менее образуют часть антигенсвязывающего центра благодаря боковой цепи, которая является частью линейной структуры антигенсвязывающего центра (т.е. доступна для связывания через

антигенсвязывающий центр), можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области, таких как молекулярное моделирование и рентгеновская кристаллография (см., например, Riechmann и др., Nature, 332, 1988, сс.323-327).

5 Химерные антитела представляют собой антитела, в которых одна или несколько областей антитела получены из одних видов животных и одна или несколько областей антитела получены из других видов животных. Предпочтительное химерное антитело представляет собой антитело, которое включает области из иммуноглобулина приматов. Считается, что химерное антитело, которое можно применять для лечения
10 человека, как правило, имеет переменные области из антитела животного кроме человека, например, грызуна, а константные области из иммуноглобулина человека. В противоположность этому, в гуманизованном антителе применяют CDR из нечеловеческого антитела, а большинство переменных каркасных участков или все переменные каркасные участки полностью получают из константных областей
15 человеческого иммуноглобулина. Считается, что человеческое химерное антитело, как правило, имеет переменные области из иммуноглобулина грызунов. Типичное человеческое химерное антитело имеет человеческие константные области тяжелых цепей и человеческие константные области легких цепей, а переменные области как
20 тяжелых, так и легких цепей из антитела грызунов. Химерное антитело может нести некоторые замены относительно нативной аминокислотной последовательности человеческих константных областей и нативной последовательности переменной области грызунов. Химерное и гуманизованное антитела можно получать с
25 помощью методов, хорошо известных в данной области, включая подходы, основанные на трансплантации CDR (см., например, US 5843708; 6180370; 5693762; 5585089; 5530101), стратегии, основанные на перестановке цепи (см., например, US 5565332; Rader и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 1998, сс.8910-8915), стратегии молекулярного моделирования (US 5639641) и т.п.

30 Понятие «гуманизованное антитело» в контексте настоящего описания в случае двухцепочечного антитела относится к антителу, в котором по меньшей мере одна цепь является гуманизованной. Цепь гуманизованного антитела имеет переменную область, в которой один или несколько каркасных участков являются человеческими. Гуманизованное антитело, которое имеет одну цепь, представляет
35 собой одноцепочечное антитело, цепь которого имеет переменную область, в которой один или несколько каркасных участков являются человеческими. Нечеловеческие участки переменной области цепи гуманизованного антитела или его фрагмента получают из источника, отличного от человеческого, в частности
40 нечеловеческого антитела, как правило, из антитела грызунов. Вклад нечеловеческого антитела в гуманизованное антитело как правило, представляет собой по меньшей мере один CDR-участок, который находится между каркасными участками, полученными из одного (или нескольких) человеческого(их) иммуноглобулина(ов). Кроме того, можно изменять поддерживающие каркасные остатки для сохранения
45 аффинности к связыванию.

Гуманизованное антитело может содержать также константные области (например, по меньшей мере одну константную область или ее часть, в случае легкой цепи, и предпочтительно три константные области в случае тяжелой цепи).
50 Константные области гуманизованного антитела, если они присутствуют, как правило, являются человеческими.

Методы получения «гуманизованных антител» хорошо известны специалистам в данной области (см., например, Queen и др., Proc. Natl Acad Sci USA, 86, 1989, сс.10029-

10032, Hodgson и др., Bio/Technology, 9, 1991, с.421).

«Гуманизированное антитело» можно получать также с помощью нового подхода генетической инженерии, который позволяет получать напоминающие человеческие поликлональные антитела с созревшей аффинностью в крупных животных, таких, например, как кролики или мыши (см., например, US 6632976).

Понятие «константная область» (CR) в контексте настоящего описания относится к генам константных областей иммуноглобулина. Гены константных областей кодируют участок молекулы антитела, который обуславливает эффекторные функции. Для создания химерных человеческих антител и гуманизированных антител, как правило, нечеловеческие (например, мышинные), константные области заменяют на человеческие константные области. Константные области химерных или гуманизированных антител, предлагаемых в изобретении, как правило, получают из человеческих иммуноглобулинов. Константную область тяжелой цепи можно выбирать из любого из пяти изотипов: альфа, дельта, эпсилон, гамма или мю. Кроме того, различные подклассы тяжелых цепей (такие как тяжелые цепи подклассов IgG) ответственны за разные эффекторные функции и таким образом, путем выбора требуемой константной области тяжелой цепи можно получать антитела с нужной эффекторной функцией. Константные области, которые можно применять согласно настоящему изобретению, представляют собой гамма 1 (IgG1), прежде всего Fc-фрагмент изотипа гамма 1 (IgG1), гамма 3 (IgG3) и наиболее предпочтительно гамма 4 (IgG4). Константная область легкой цепи может быть каппа- или лямбда-типа, предпочтительно каппа-типа. В одном из вариантов осуществления изобретения константная область легкой цепи представляет собой человеческую константную область каппа-цепи (Heiter и др., Cell 22, 1980, сс.197-207), константная область тяжелой цепи представляет собой константную область человеческого IgG4.

Понятие «моноклональное антитело» хорошо известно в данной области и относится к антителу, которое является продуктом одной клонированной клетки, продуцирующей антитело. Моноклональные антитела, как правило, создают путем слияния продуцирующей антитела В-клетки, как правило, с коротким временем жизни, с быстро растущей клеткой, такой как раковая клетка (иногда ее называют «иммортализованной» клеткой). Образовавшаяся гибридная клетка или гибридома быстро размножается, создавая клон, который продуцирует антитело.

Для целей настоящего изобретения к «моноклональному антителу» относят также антитела, полученные с помощью материнского клона, который еще не достиг полной моноклональности.

В контексте настоящего изобретения понятие «функциональный эквивалент антитела» относится к антителу, которое в целом сохраняет по меньшей мере одно из упомянутых выше основных функциональных свойств антитела, в том числе: способность к специфическому связыванию с белком β -амилоида, прежде всего с белком $A\beta_{1-42}$ и более предпочтительно с эпитопной 16-21-областью белка $A\beta_{1-42}$, иммунореактивность *in vitro*, способность к ингибированию агрегации мономеров $A\beta_{1-42}$, приводящей к образованию высокомолекулярных полимерных фибрилл, и/или нарушению агрегации ранее сформированных полимерных фибрилл $A\beta_{1-42}$, и/или нарушению правильности β -складчатой конформации и облегчению воздействий на амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь только ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром

Дауна, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна, при введении с целью профилактики или лечения. Антитела могут принадлежать к любому классу, такому как IgG, IgM или IgA и т.д., или любому подклассу, такому как IgG1, IgG2a и т.д., и другим упомянутым выше или известным в данной области подклассам, но прежде всего к классу IgG4. Кроме того, антитела можно получать с помощью любого метода, такого как фаговая презентация, или получать в любом организме или линии клеток, в том числе в клетках бактерий, насекомых, млекопитающих или другом типе клеток или клеточных линий, которые продуцируют антитела с требуемыми характеристиками, такие как гуманизированные антитела. Антитела можно создавать также путем объединения Fab-фрагмента и Fc-участка из различных видов.

Понятие «гибридизовать» в контексте настоящего описания относится к общепринятым условиям гибридизации, предпочтительно условиям гибридизации, при которых в качестве раствора применяют 5xSSPE, 1% ДСН, 1-кратный (1x) раствор Денхардта и/или гибридизацию проводят при температуре от 35 до 70°C, предпочтительно 65°C. После гибридизации отмывку предпочтительно осуществляют сначала с использованием 2xSSC, 1% ДСН, а затем 0,2xSSC при температуре от 35 до 70°C, предпочтительно 65°C (описание состава SSPE, SSC и раствора Денхардта см. у Sambrook и др., loc. cit). Наиболее предпочтительными являются строгие условия гибридизации, описанные, например, у Sambrook и др. выше. Особенно предпочтительными строгими условиями гибридизации являются, например, условия, при которых гибридизацию и отмывку осуществляют при 65°C, как описано выше. Менее предпочтительной является гибридизация в условиях пониженной жесткости, когда, например, гибридизацию и отмывку осуществляют при 45°C, и еще менее предпочтительно, когда их осуществляют при 35°C.

«Гомологию» между двумя последовательностями определяют по идентичности последовательностей. Если две последовательности, которые требуется сравнить друг с другом, различаются по длине, то понятие «идентичность последовательностей» предпочтительно относится к проценту нуклеотидных остатков в более короткой последовательности, которые идентичны нуклеотидным остаткам более длинной последовательности. Идентичность последовательностей можно определять с помощью общепринятых компьютерных программ, таких как программа Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Программа Bestfit основана на использовании локального алгоритма гомологии Смита и Ватермана (Smith и Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2, 1981, сс.482-489), для поиска сегмента, характеризующегося самой высокой идентичностью последовательности между двумя последовательностями. При использовании Bestfit или другой программы сравнительного анализа первичной структуры последовательностей для определения того, идентична ли конкретная последовательность, например на 95%, последовательности, с которой производят сравнение (референс-последовательность), предлагаемой в настоящем изобретении, параметры предпочтительно регулируют так,

чтобы процент идентичности рассчитывать для всей длины референс-последовательности, и при этом при определении указанного уровня гомологии разрешается введение брешей, количество которых составляет вплоть до 5% от общего количества нуклеотидов в референс-последовательности. Когда используют программу Bestfit, то так называемым необязательным параметрам предпочтительно оставляют ранее установленные («принятые по умолчанию») значения. Отклонения, появляющиеся при сравнении данной последовательности и вышеописанных последовательностей, предлагаемых в изобретении, могут обуславливаться, например, добавлением, делецией, заменой, инсерцией или рекомбинацией. Такое сравнение последовательностей можно предпочтительно осуществлять с помощью программы «fasta20u66» (версия 2.0u66, сентябрь 1998 г., разработанной William R. Pearson и Университетом Виргинии, см. также W.R.Pearson, Methods in Enzymology 183, 1990, сс.63-98, прилагаемые примеры, а также <http://workbench.sdsc.edu/>). Для этой цели можно использовать набор «задаваемых по умолчанию параметров».

Антитело, предлагаемое в изобретении, может представлять собой иммуноглобулин или антитело, для которого установлено, что каждый из его сайтов связывания является идентичным (в случае мультивалентного антитела) или в альтернативном варианте оно может представлять собой «биспецифическое» или «бифункциональное антитело».

«Биспецифическое» или «бифункциональное антитело» представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две различные пары тяжелых/легких цепей и два различных сайта связывания. Биспецифические антитела можно получать различными методами, включая слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов (см., например, Songsivilai и Lachmann, Clin.Exp.Immunol. 79, 1990, сс.315-321; Kostelny и др., J. Immunol. 148, 1992, сс.1547-1553).

Понятие «фрагмент» относится к части или участку антитела или цепи антитела, которая/который содержит меньшее количество аминокислотных остатков, чем интактное или полное антитело или цепь антитела. Фрагменты можно получать путем обработки химическими агентами или ферментами интактного или полного антитела или цепи антитела. Фрагменты можно получать также с помощью рекомбинации. Примерами фрагментов являются Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fabc- и/или Fv-фрагменты. Понятие «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидному фрагменту иммуноглобулина или антитела, который связывает антиген или конкурирует с интактным антителом (т.е. с интактным антителом, из которого он получен) за связывание с антигеном (т.е., характеризуется специфичностью связывания).

Связывающие фрагменты получают методом рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов. Связывающие фрагменты включают Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, одноцепочечные фрагменты и одноцепочечные антитела.

Понятие «фрагмент» относится также к пептиду или полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, которая состоит по меньшей мере из 5 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 10 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 15 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 20 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 25 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 40 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 50 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 60 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 70 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 80 смежных аминокислотных

остатков, по меньшей мере из 90 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 100 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 125 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 150 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 175 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 200 смежных аминокислотных остатков или по меньшей мере из 250 смежных аминокислотных остатков, аминокислотной последовательности другого полипептида. В конкретном варианте осуществления изобретения фрагмент полипептида сохраняет по меньшей мере одну функцию полипептида.

Понятие «антиген» относится к полной субстанции или ее фрагменту, который может связываться с антителом. Понятие «иммуноген» относится к антигену, который может вызывать иммунный ответ в организме, прежде всего животного, более предпочтительно млекопитающего, включая человека. Понятие «антиген» включает области, которые известны как антигенные детерминанты или эпитопы, которые представляют собой часть антигена (которая осуществляет контакт или играет важную роль в поддержании контакта, присущего антигену), ответственную за антигенность, или антигенные детерминанты.

В контексте настоящего описания понятие «растворимый» обозначает частично или полностью растворимый в водном растворе.

В контексте настоящего описания понятие «иммуногенные» относится к субстанциям, которые вызывают или усиливают производство антител, Т-клеток и других реактивных иммунных клеток, направленных против иммуногена антигена.

Иммунный ответ имеет место, когда в организме индивидуума продуцируется достаточное количество антител, Т-клеток и других реактивных иммунных клеток против введенных иммуногенных композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, с целью ослабления или облегчения подлежащего лечению нарушения.

Понятие «иммуногенность» в контексте настоящего описания относится к мере способности антигена вызывать иммунный ответ (гуморальный или клеточный) при введении реципиенту. Настоящее изобретение относится к подходам, которые снижают иммуногенность предлагаемых в изобретении человеческих химерных или гуманизированных антител.

Понятие «гуманизированное антитело с пониженной иммуногенностью» относится к гуманизированному антителу, которое обладает более низкой иммуногенностью по сравнению с родительским антителом, например, мышинным антителом.

Понятие «гуманизированное антитело, практически сохраняющее способность к связыванию родительского антитела» относится к гуманизированному антителу, которое сохраняет способность специфически связывать антиген, распознаваемый родительским антителом, которое применяют для получения указанного гуманизированного антитела. Предпочтительно гуманизированное антитело должно иметь такую же или практически такую же аффинность к связыванию антигена и авидность, что и родительское антитело. В идеальном варианте аффинность антитела должна составлять не менее 10% от аффинности родительского антитела, более предпочтительно не менее чем примерно 30% и наиболее предпочтительно аффинность должна составлять не менее 50% относительно родительского антитела. Методы анализа аффинности к связыванию антигена хорошо известны в данной области и включают анализы связывания, составляющего половину от максимального, конкурентные анализы и анализ Скэтчарда. Приемлемые анализы связывания антигенов представлены в настоящем описании.

«Обратная мутация» представляет собой мутацию, интродуцированную в

нуклеотидную последовательность, которая кодирует гуманизованное антитело, эта мутация приводит к получению аминокислот, соответствующих аминокислотам в родительском антителе (например, в донорском антителе, например, в мышинном антител). Определенные каркасные остатки из родительского антитела можно
5 сохранять в процессе гуманизации антител, предлагаемых в изобретении, для того, чтобы практически сохранять способность к связыванию родительского антитела, минимизируя при этом потенциальную иммуногенность полученного антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения родительское антитело имеет
10 мышинное происхождение. Например, обратная мутация приводит к изменению человеческого каркасного остатка на родительский мышинный остаток. Примерами каркасных остатков, которые можно подвергать обратной мутации, являются (но не ограничиваясь только ими) канонические остатки, упаковывающие остатки поверхности раздела, необычные родительские остатки, которые примыкают к сайту
15 связывания, остатки из «верньер-зоны» (которая образует «платформу» на которой располагаются CDR) (Foote и Winter, J. Mol. Biol. 224, 1992, сс.487-499) и остатки, примыкающие к CDRH3.

В контексте настоящего описания понятие «консервативная замена» относится к
20 изменениям, которые являются практически нейтральными с позиций конформации или антигенности, приводят к минимальным изменениям третичной структуры зрелых полипептидов или приводят к минимальным изменениям антигенных детерминант зрелых полипептидов соответственно, по сравнению с нативным белком. Касательно антител и фрагментов антител, предлагаемых в изобретении, консервативная замена
25 означает аминокислотную замену, которая не приводит к отсутствию способности антитела к связыванию с рецептором-мишенью. Обычные специалисты в данной области могут предсказывать, какие аминокислотные замены можно осуществлять, сохраняя при этом высокую вероятность того, что они будут нейтральной с позиций
30 конформации или антигенности. Указанное руководство представлено, например у Berzofsky, Science 229, 1985, сс.932-940 и Bowie и др. Science, 247, 1990, сс.1306-1310. Факторы, которые, как считается, влияют на вероятность сохранения конформационной и антигенной нейтральности включают (но не ограничиваясь
35 только ими): (а) маловероятно, что замена гидрофобных аминокислот может влиять на антигенность, поскольку маловероятно, что гидрофобные остатки могут быть локализованы внутри белка; (б) маловероятно, что замена сходных по физико-химическим характеристикам аминокислот может влиять на конформацию, поскольку заменяющая аминокислота структурно напоминает нативную аминокислоту; и (в)
40 вероятно, что изменение созданных в результате эволюции консервативных последовательностей может оказывать вредное воздействие на конформацию, поскольку считается, что такая консервативность предполагает, что аминокислотные последовательности могут иметь важное значение. Обычный специалист в данной области может оценивать конформационные изменения белка с помощью хорошо
45 известных анализов, таких как (но не ограничиваясь только ими) методы фиксации микрокомплемента (Wasserman и др., J. Immunol. 87, 1961, сс.290-295; Levine и др., Meth. Enzymol. 11, 1967, сс.928-936) и исследования связывания с использованием зависящих от конформации моноклональных антител (Lewis и др., Biochem. 22, 1983, сс.948-954).
50

Понятие «терапевтически эффективное количество» относится к количеству антитела, которое при введении человеку или животному является достаточным для оказания терапевтического действия на человека или животного. Специалист в данной

области легко может определять эффективное количество с помощью общепринятых процедур.

В контексте настоящего описания понятия «лечить» «предупреждать», «предупреждение» и «профилактика» относятся к предупреждению рецидива или возникновения одного из симптомов нарушения у индивидуума в результате введения профилактического или терапевтического агента.

Конструирование гуманизированных антител

Настоящее изобретение может стать более понятным после ознакомления с подробным описанием конкретных с вариантов осуществления изобретения, приведенным в настоящем описании. Хотя настоящее изобретение описано со ссылкой на конкретные детали определенных вариантов осуществления изобретения, не подразумевается, что такие детали направлены на ограничение объема изобретения.

Настоящее изобретение относится к новым способам и композициям, содержащим высокоспецифические и высокоэффективные антитела, которые обладают способностью специфически распознавать и связываться с эпитопами из широкого разнообразия β -амилоидных антигенов. Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, наиболее целесообразно применять для лечения амилоидоза, группы заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь только ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также других заболеваний, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, таких как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельдта-Якоба, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа), болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и других заболеваний, включая дегенерацию желтого пятна.

Полностью гуманизованную или реконструированную переменную область, предлагаемую в настоящем изобретении, можно создавать согласно изобретению сначала путем конструирования аминокислотной последовательности переменной области, которая содержит нечеловеческие, предпочтительно полученные из антител грызунов CDR, но наиболее предпочтительно CDR, выведенные из мышинового антитела ACI-01-Ab7C2 (которое в контексте настоящего описания обозначают также как «mC2»), которое депонировано в соответствии с требованиями Будапештского договора 01 декабря 2005 г. в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур» (DSMZ), Брауншвейг, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Branschwieg, под регистрационным номером DSM ACC2750), встроенные в полученные из человеческих антител каркасные последовательности. Нечеловеческие, предпочтительно полученные из антител грызунов CDR, которые можно получать из антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, обеспечивают требуемую специфичность. Таким образом, эти остатки следует включать при создании реконструированной переменной области практически в неизменном виде. При этом все модификации должны быть ограничены до минимума и следует тщательно оценивать изменения специфичности и аффинности антитела. С другой стороны, каркасные остатки теоретически можно получать из любой человеческой переменной области.

Для создания реконструированного антитела, которое обладает приемлемой или

даже улучшенной аффинностью, следует отбирать человеческие каркасные последовательности, которые одновременно пригодны для создания реконструированной варибельной области и для сохранения аффинности антитела.

5 Для решения этой задачи была разработана стратегия «наилучшего подбора». Как известно, каркасные последовательности служат для поддержания CDR в их правильной пространственной ориентации для взаимодействия с антигеном, и каркасные остатки могут иногда принимать даже участие в связывании антигена, поэтому данная стратегия направлена на минимизацию изменений, которые могут оказывать отрицательное действие на трехмерную структуру антитела, путем 10 использования человеческой каркасной последовательности для реконструкции антитела из человеческой варибельной области, которая в наибольшей степени гомологична или подобна нечеловеческой, предпочтительно полученной из антител грызунов варибельной области. Это также максимально увеличивает вероятность 15 того, что у реконструированного антитела будет сохраняться аффинность.

В наиболее простом варианте стратегия «наилучшего подбора» включает сравнение донорской V-области грызунов со всеми известными человеческими аминокислотными последовательностями V-области и последующий отбор 20 последовательностей с наибольшей степенью гомологии для получения акцепторных каркасных участков для экспериментов по гуманизации. Фактически известно несколько других факторов, которые следует принимать во внимание и которые могут влиять на окончательный отбор акцепторных каркасных участков. В этой связи прогнозы молекулярного моделирования можно использовать перед любой 25 экспериментальной работой, направленной на увеличение до максимума аффинности образовавшегося реконструированного антитела. Практически задача по моделированию представляет собой предсказание того, какие имеющие решающее значение остатки (если они существуют), наиболее гомологичные остаткам 30 человеческого каркасного участка, следует сохранять в каркасном участке грызунов для получения наиболее высокой аффинности у реконструированного антитела.

В одном из вариантов осуществления изобретения CDR получают из мышинового моноклонального антитела, прежде всего из мышинового моноклонального антитела АС1-01-Ав7С2 (которое в настоящем описании обозначено также как «mC2»), 35 описанного в находящейся в совместном рассмотрении EP 05027092.5 поданной 12.12.2005 г., описание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Клетки гибридомы линии FP-12H3-C2, продуцирующие мышинное моноклональное антитело АС1-01-Ав7С2 (обозначенное в настоящем описании как «mC2» и как «hC2» в 40 случае гуманизированного антитела C2), описанной в находящейся в совместном рассмотрении заявке EP05027092.5, депонированы в соответствии с требованиями Будапештского договора 01 декабря 2005 г. в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Брауншвейг, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Branschwitz, 45 под регистрационным номером DSM ACC2750.

Мышиное антитело может вырабатываться против надмолекулярной антигенной конструкции, которая содержит антигенный пептид, соответствующий аминокислотной последовательности β -амилоидного пептида, прежде всего β -амилоидного пептида $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ и $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, модифицированного с помощью 50 гидрофобного фрагмента, такого, например, как пальмитиновая кислота, или гидрофильного фрагмента, такого, например, как полиэтиленгликоль (ПЭГ), или комбинации обоих указанных агентов, где гидрофобный и гидрофильный фрагмент

соответственно соединяют с помощью ковалентной связи с каждым концом антигенного пептида по меньшей мере через одну, прежде все одну или две аминокислоты, такие, например, как лизин, глутаминовая кислота и цистеин или любая другая приемлемая аминокислота или аналог аминокислоты, который может 5 служить в качестве соединяющего элемента для сшивания гидрофобного и гидрофильного фрагмента с пептидным фрагментом. Когда в качестве гидрофильного фрагмента применяют ПЭГ, то свободные концы ПЭГ ковалентно связывают с фосфатидилэтаноламином или любым другим соединением, которое 10 может функционировать в качестве «заякоривающего» элемента, предназначенного для встраивания антигенной конструкции в бислой липосомы.

В частности, мышинное антитело может вырабатываться против надмолекулярной антигенной конструкции, которая содержит антигенный пептид, соответствующий 15 аминокислотной последовательности β -амилоидного пептида $A\beta_{1-16}$, модифицированного с помощью гидрофильного фрагмента, такого, например, как полиэтиленгликоль (ПЭГ), где гидрофильный фрагмент соединяют с помощью ковалентной связи с каждым концом антигенного пептида по меньшей мере через одну, прежде все одну или две аминокислоты, такие, например, как лизин, 20 глутаминовая кислота и цистеин или любая другая приемлемая аминокислота или аналог аминокислоты, который может служить в качестве соединяющего элемента для сшивания гидрофобного и гидрофильного фрагмента с пептидным фрагментом. Когда в качестве гидрофильного фрагмента применяют ПЭГ, то свободные концы ПЭГ ковалентно связывают с фосфатидилэтаноламином или любым другим 25 соединением, которое может функционировать в качестве «заякоривающего» элемента, предназначенного для встраивания антигенной конструкции в бислой липосомы.

Одним из вариантов осуществления изобретения является химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент, которое/который 30 содержит в вариабельной области по меньшей мере один CDR нечеловеческого происхождения, встроенный в один или несколько полученных из человеческого антитела или антител приматов каркасных участков, и объединенные с константной областью, полученной из человеческого антитела или антитела приматов, при этом 35 химерное антитело или его фрагмент, либо гуманизированное антитело или его фрагмент обладают способностью специфически распознавать и связывать β -амилоидный мономерный пептид.

CDR содержат остатки, которые с наибольшей вероятностью связываются с 40 антигеном и должны сохраняться в реконструированном антителе. CDR идентифицируют по их последовательности согласно номенклатуре Кэбота с соавторами, описанной в: «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5-е изд., изд-во U.S. Department of Health and Human Services, The United States Government Printing Office, 1991. Положения CDR подпадают под канонические классы (Chothia и др., 45 Nature, 342, 1989, сс.877-883), в которых имеющие решающее значение остатки в значительной степени определяют структурную конформацию петли CDR. Эти остатки практически всегда сохраняют в реконструированном антителе.

В процессе получения гуманизированного антитела, предлагаемого в изобретении, 50 аминокислотные последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи (V_H и V_L) антитела C2 сравнивают с последовательностями V_H и V_L антитела грызунов на основе баз данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и Кэбота.

Наиболее близким по совместимости геном мышинной зародышевой линии к $V_K C2$ является bb1, локус MMU231201 (Schable и др., 1999). Сравнение позволило установить, что две аминокислоты, отличные от этой последовательности зародышевой линии, обе локализованы в CDRL1. Были обнаружены зрелые мышинные антитела с подобными, но не идентичными последовательностями. Некоторые антитела имели идентичные CDRL2 и идентичные CDRL3, но CDRL1 C2, по-видимому, является уникальным. Сравнение с последовательностями V_K человеческой зародышевой линии показало, что гены из подгруппы V_{KII} наиболее хорошо совместимы с $V_K C2$ (Сох и др., 1994). Таким образом, $V_K C2$ можно отнести к подгруппе последовательностей MuV_{KII} согласно номенклатуре Кэбота.

DPK15 в сочетании с человеческой J-областью $HuJK1$ можно отбирать для получения акцепторных каркасных последовательностей для гуманизированной V_K .

Были идентифицированы остатки на поверхности раздела переменных областей легкой и тяжелой цепей (Chothia и др., J. Mol. Biol., 186, 1985, сс.651-663). Их, как правило, сохраняют в реконструированном антителе. Phe в положении 87 V_K мышинного C2 не является характерным остатком для поверхности раздела, а Tyr является более распространенным в подгруппе V_{KII} , что свидетельствует о том, что этот каркасный остаток может быть важным для активности антитела. Tyr 87 присутствует в человеческой зародышевой линии и в гуманизированной $V_K C2$.

Таким образом, можно создавать гуманизированные последовательности V_K , такие как C2 $HuVK1$, состоят из мышинного CDR $V_K C2$ с каркасными участками из DPK 15 и человеческой области J_{K1} . В конкретном варианте осуществления изобретения мышинные остатки можно заменять в человеческом каркасном участке в положениях 45 и/или 87. В CDR2-участке, полученном из мышинного моноклонального антитела, прежде всего мышинного антитела ACI-01-Ab7C2, аминокислотные замены можно осуществлять в положениях 50 и/или 53 согласно номенклатуре Кэбота. Остаток 45 может принимать участие в поддержании конформации CDR. Остаток 87 локализован на поверхности раздела V_H - и V_K -областей. Таким образом, эти остатки могут иметь решающее значение для сохранения способности антитела к связыванию.

Наиболее близким по совместимости геном мышинной зародышевой линии к $V_H AF C2$ является VH7183, локус AF120466, (Langdon и др., 2000). Сравнение с последовательностями V_H человеческой зародышевой линии показало, что гены из подгруппы V_{HI} наиболее совместимы с $V_H C2$. $V_H AF C2$ можно отнести к подгруппе MuV_{HIID} согласно номенклатуре Кэбота. Последовательность DP54 в сочетании с человеческой J-областью HuJ_{H6} можно отбирать для получения акцепторных каркасных последовательностей для гуманизированной V_H .

Сравнение позволило установить, что существует девять аминокислотных различий между последовательностями $V_H C2$ и последовательностью DP54 и J_{H6} человеческой акцепторной зародышевой линией, большая часть которых локализована в CDRH2. Обнаружены зрелые мышинные антитела, идентичные или подобные (отличающиеся одним остатком) CDRH1 или подобные CDRH2 (отличающиеся одним остатком), но не обнаружено ни одного антитела, у которого все три CDR были бы идентичны $V_H AF C2$. CDRH3 антитела C2 является необычно коротким, состоит только из трех остатков. Однако в базе данных обнаружены другие антитела, у которых CDRH3 имеет такую же длину. Остаток 47 $V_H C2$ более предпочтительно представляет собой Leu, чем наиболее часто встречающийся в этом положении Trp, а остаток 94 более предпочтительно представляет собой Ser, чем обычно встречающийся Arg, что

свидетельствует о том, что эти каркасные остатки могут быть важными для активности антитела.

Можно создавать различные гуманизированные последовательности V_H . C2HuVH1 состоит из CDR V_H AF C2 с каркасными участками из DP54 и HuJ_H6. В конкретном варианте осуществления изобретения мышинные остатки можно заменять в человеческом каркасном участке в положениях 47 или 94 или в обоих положениях. Остаток 47 в каркасном участке 2 имеет контакт как с CDR, так и с V_K -областью. Остаток 94 может принимать участие в поддержании конформации CDR. Таким образом, эти остатки могут иметь решающее значение для сохранения способности антитела к связыванию.

Можно создавать различные HCVR- и LCVR-области, которые содержат нечеловеческие CDR, полученные из донорского антитела, например, мышиногo антитела, встроенные в нативные или модифицированные полученные из антител человека или приматов каркасные участки. Модификация может, в частности, включать замену одного или нескольких аминокислотных остатков в каркасном участке на нечеловеческие остатки, прежде всего мышинные остатки, наиболее часто встречающиеся в этом положении в соответствующих подгруппах, или на остатки, которые обладают подобными свойствами, что и остатки, наиболее часто встречающиеся в этом положении с соответствующих подгруппах.

Модификация каркасного участка в каркасных последовательностях служит для поддержания CDR в их правильной пространственной ориентации для взаимодействия с антигеном, и эти каркасные остатки могут иногда даже принимать участие в связывании антигена. В одном из вариантов осуществления изобретения принимают меры для дополнительной адаптации выбранных человеческих каркасных последовательностей для придания им наибольшего подобия с последовательностями каркасных участков грызунов для повышения до максимума вероятности того, что реконструированное антитело сохранит свою аффинность.

Так, можно заменять мышинные остатки в человеческом каркасном участке. В частности, мышинные остатки можно заменять человеческим каркасным участком из переменной области тяжелой цепи (HCVR) в положениях 47 или 94 или в обоих положениях и в человеческом каркасном участке переменной области легкой цепи (LCVR) в положениях 45 и/или 87. В CDR2-участке, полученном из мышиногo моноклонального антитела, прежде всего мышиногo антитела ACI-01-Ab7C2, аминокислотные замены можно осуществлять в положениях 50 и/или 53 согласно номенклатуре Кэбота.

Остатки, обнаруженные в указанных выше положениях в человеческом каркасном участке, можно заменять на мышинные остатки, наиболее часто встречающиеся в этом положении в соответствующих подгруппах. В частности, T_{gr} в положении 47 согласно номенклатуре Кэбота в полученном из антитела человека или примата каркасном участке переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO:15, можно заменять на Leu или на аминокислотный остаток с аналогичными свойствами и эта замена приводит к изменениям, которые являются практически нейтральными с позиций конформации или антигенности, приводят к минимальным изменениям третичной структуры мутантных полипептидов или приводят к минимальным изменениям антигенных детерминант. В частности, T_{gr} в положении 47 согласно номенклатуре Кэбота в полученном из антитела человека или примата каркасном участке переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO:15, можно заменять также на аминокислоту, выбранную из группы, включающей норлейцин,

Leu, Val, Met, Ala и Phe, прежде всего Leu. Можно осуществлять другие консервативные замены, которые являются нейтральными с позиций конформации и антигенности.

Arg в положении 94 согласно номенклатуре Кэбота в полученном из антитела человека или приматов каркасном участке варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO:15, можно заменять на Ser или на аминокислотный остаток с аналогичными свойствами, и эта замена приводит к изменениям, которые являются практически нейтральными с позиций конформации или антигенности, приводят к минимальным изменениям третичной структуры мутантных полипептидов или приводят к минимальным изменениям антигенных детерминант. В частности, в другом варианте Arg в положении 94 согласно номенклатуре Кэбота в полученном из антитела человека или приматов каркасном участке варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO:15, можно заменять на Thr.

В другом варианте осуществления изобретения оба остатка можно заменять в гуманизованном антителе.

Gln в положении 45 согласно номенклатуре Кэбота в полученном из антитела человека или приматов каркасном участке варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO:12, можно заменять на Lys или на аминокислотный остаток с аналогичными свойствами, и эта замена приводит к изменениям, которые являются практически нейтральными с позиций конформации или антигенности, приводят к минимальным изменениям третичной структуры мутантных полипептидов или приводят к минимальным изменениям антигенных детерминант. В частности, Gln в положении 45 согласно номенклатуре Кэбота в полученном из антитела человека или приматов каркасном участке варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO:12, можно заменять на аминокислоту, выбранную из группы, включающей Arg, Gln и Asn, предпочтительно Arg.

Leu в положении 50 согласно номенклатуре Кэбота в полученном из антитела человека или приматов каркасном участке варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO:12, можно заменять на Lys или на аминокислотный остаток с аналогичными свойствами, и эта замена приводит к изменениям, которые являются практически нейтральными с позиций конформации или антигенности, приводят к минимальным изменениям третичной структуры мутантных полипептидов или приводят к минимальным изменениям антигенных детерминант. В частности, Leu в положении 50 согласно номенклатуре Кэбота в полученном из антитела человека или приматов каркасном участке варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO:12, можно заменять на аминокислоту, выбранную из группы, включающей Arg, Gln, и Asn, предпочтительно Arg.

Asn в положении 53 согласно номенклатуре Кэбота в полученном из антитела человека или приматов каркасном участке варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO:12, можно заменять на His и Gln или на аминокислотный остаток с аналогичными свойствами, и эта замена приводит к изменениям, которые являются практически нейтральными с позиций конформации или антигенности, приводят к минимальным изменениям третичной структуры мутантных полипептидов или приводят к минимальным изменениям антигенных детерминант. В частности, Asn в положении 53 согласно номенклатуре Кэбота в полученном из антитела человека или приматов каркасном участке варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO:12, можно заменять на аминокислоту, выбранную из группы, включающей Gln, His, Lys и Arg.

Thr в положении 87 согласно номенклатуре Кэбота в полученном из антитела

человека или приматов каркасном участке вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO:12, можно заменять на Phe или на аминокислотный остаток с аналогичными свойствами, и эта замена приводит к изменениям, которые являются практически нейтральными с позиций конформации или антигенности, приводят к минимальным изменениям третичной структуры мутантных полипептидов или приводят к минимальным изменениям антигенных детерминант. В частности, Tug в положении 87 согласно номенклатуре Кэбота в полученном из антитела человека или приматов каркасном участке вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO:12, можно заменять на аминокислоту, выбранную из группы, включающей Leu, Val, Ile и Ala, предпочтительно Leu.

Полученную таким образом вариабельную область, содержащую по меньшей мере один CDR нечеловеческого происхождения, встроенный в один или несколько полученных из антитела человека или приматов каркасных участков, можно затем объединять с константной областью, выведенной из взятого в качестве источника антитела человека или приматов, прежде всего с человеческими константными областями IgG4 или к соответственно. Константная область IgG4 может быть модифицирована, например, заменой серина в положении 228 в шарнирной области на пролин (HuIgG4 Ser-Pro). Эта мутация стабилизирует находящийся между цепями дисульфидный мостик и предупреждает образование «полумолекул», что может происходить в препаратах нативного человеческого IgG4. Константную область IgG4 можно модифицировать также путем делеции концевого Lys в положении 439, что показано в SEQ ID NO:16.

Модифицированные вариабельные области можно конструировать с помощью метода, известного в данной области, например путем перекрывающей ПЦР-рекомбинации. Кассеты экспрессии для химерного антитела C2 CnV_H AF и C2 ChV_K можно использовать в качестве матриц для мутагенеза каркасных участков с получением требуемых последовательностей. Синтезируют наборы пар праймеров для мутагенеза, содержащие области, подлежащие изменению. Полученные кассеты экспрессии гуманизированных V_H и V_K можно клонировать в соответствующих клонирующих векторах, известных в данной области, таких, например, как pUC19. После подтверждения правильности полной последовательности ДНК каждой V_H и V_K гены модифицированных V-областей тяжелой и легкой цепи можно вырезать из клонирующего вектора в виде кассет экспрессии. Затем их можно переносить в соответствующие экспрессионные векторы, такие как pSVgpt и pSVhyg, которые включают константные области IgG4 Ser-Pro или к соответственно.

Экспрессионные векторы

Основой экспрессионного вектора pSVgpt является pSV-igpt (Mulligan и Berg, 1980), и он включает ген, обуславливающий устойчивость к ампициллину, для селекции в бактериальных клетках и ген gpt для селекции в клетках млекопитающих, энхансерную область тяжелой цепи мышинового иммуноглобулина, геномную последовательность, кодирующую ген константной области, и поли-A-последовательности SV40. Для экспрессии вариабельную область тяжелой цепи встраивают в виде HindIII-BamHI-фрагмента.

Экспрессионный вектор pSVhyg включает ген, обуславливающий устойчивость к ампициллину, для селекции в бактериальных клетках, ген hyg для селекции в клетках млекопитающих, энхансерную область тяжелой цепи мышинового иммуноглобулина, геномную последовательность, кодирующую ген константной области каппа-цепи и включает энхансер каппа-цепи и поли-A-последовательности SV40. Для экспрессии

вариабельную область легкой цепи встраивают в виде HindIII-BamHI-фрагмента.

Затем необходимо подтверждать правильность последовательности ДНК гуманизированных V_H и V_K в экспрессионных векторах.

5 Для получения антитела экспрессионные векторы гуманизированной тяжелой и легкой цепи можно интродуцировать в соответствующие клеточные линии-
5 продуценты, известные в данной области, такие, например, как NSO-клетки. Интродукцию экспрессионных векторов можно осуществлять путем котрансфекции с
10 помощью электропорации или с использованием другой приемлемой технологии трансформации, известной в данной области. Продуцирующие антитела клеточные
10 линии можно затем отбирать и размножать и очищать гуманизированные антитела. Затем очищенные антитела можно анализировать с помощью стандартных методов,
10 таких как ДСН-ПААГ.

15 Антитело с улучшенной аффинностью, специфичностью и стабильностью
15 Последовательность CDRL2 («KVSNRFS») мышинового антитела C2 можно подвергать небольшим модификациям без отрицательного воздействия на активность
15 антитела. Можно осуществлять консервативные замены, такие как замена R на K в положении 50 и S на N в положении 53. Таким образом, две другие
20 последовательности CDRL2 представляют собой «RVSNRFS» и «KVSSRFS» соответственно. Их встраивают в мышиную последовательность V_K , в которой
20 отсутствуют другие замены, такую как VK-R C2 и VK-S C2 соответственно.

25 Аффинность, специфичность и стабильность описанного выше антитела, предлагаемого в изобретении, или его фрагмента можно модифицировать путем
25 изменения его профиля или схемы гликозилирования, приводящего к улучшению его терапевтических качеств.

Для изменения схемы гликозилирования можно создавать клетки-хозяева, которые
30 обладают способностью экспрессировать модифицирующую гликопротеин гликозил-трасферазу с предпочтительным уровнем активности, которая повышает уровень
30 комплексных N-связанных олигосахаридов, несущих двухсекционные GlcNAc. Кроме того, можно получать модифицированные гликоформы гликопротеинов, например,
35 антител, включая полные молекулы антител, фрагменты антител или слитые белки, которые включают область, эквивалентную Fc-фрагменту иммуноглобулина,
35 обладающие повышенной Fc-опосредуемой клеточной цитотоксичностью.

Методы получения антител с модифицированной схемой гликозилирования
40 известны специалистам в данной области и описаны, например, в EP 1071700, US 2005272128, у Ferrara и др., J Biol Chem 281(8), 2006, сс.5032-5036; Ferrara и др.,
40 Biotechnology and Bioengineering 93(5), 2006, сс.851-861.

Фармацевтические препараты и их введение

Антитела, предлагаемые в изобретении, но прежде всего моноклональное антитело,
предлагаемое в изобретении, можно получать с помощью известных методов в
45 физиологически приемлемой форме, которая может включать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или эксципиент. Например, антитело,
45 предлагаемое в изобретении и описанное выше, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, прежде всего
45 моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, объединяют с фармацевтически приемлемым
50 носителем, разбавителем и/или эксципиентом с получением терапевтической композиции. Приемлемые фармацевтические носители, разбавители и/или эксципиенты
50 хорошо известны в данной области, и к ним относятся, например, забуференные

фосфатом физиологические растворы, вода, эмульсии, такие как эмульсии типа масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д.

5 Препаративную форму фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении, можно получать с помощью общепринятой методологии, известной специалистам в данной области.

Композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, можно вводить индивидууму в твердой, жидкой форме или в виде аэрозоля, которые содержат приемлемую фармацевтически эффективную дозу. Примерами твердых композиций являются 10 пилюли, кремы и имплантируемые стандартные дозы. Пилюли можно вводить орально. Терапевтические кремы можно наносить местно. Имплантируемые стандартные дозы можно наносить местно, пример, на область опухоли, или можно имплантировать с целью системного высвобождения терапевтической композиции, например, подкожно. Примерами жидких композиций являются препаративные 15 формы, адаптированные для внутримышечной, подкожной, внутривенной, внутриартериальной инъекции, или препаративные формы для местного или внутриглазного нанесения. Примерами препаративных форм в виде аэрозоля являются применяемые путем ингаляции препаративные формы, предназначенные для 20 введения в легкие.

Композиции можно вводить с помощью стандартных путей введения. Как правило, композицию можно вводить с использованием местного, орального, ректального, назального, внутрикожного, внутрибрюшинного или парентерального (например, 25 внутривенного, подкожного или внутримышечного) пути введения. Кроме того, композицию можно включать в обеспечивающие пролонгированное высвобождение матрицы, например, из биоразложимых полимеров, полимеры можно имплантировать в область, в которую требуется осуществлять введение, например, в область опухоли. Метод предусматривает введение однократной дозы, введение повторных доз через 30 предварительно установленные интервалы времени и пролонгированное введение в течение предварительно определенного периода времени.

Применяемая в настоящем изобретении матрица, обеспечивающая пролонгированное высвобождение, представляет собой матрицу, изготовленную из 35 материалов, как правило, полимеров, которые расщепляются путем ферментативного или кислотного/щелочного гидролиза или путем растворения. При внесении в организм матрица подвергается воздействию ферментов и жидкости организма. Матрицу, обеспечивающую пролонгированное высвобождение, следует выбирать из биосовместимых материалов, таких как липосомы, полилактиды (полимолочная 40 кислота), полигликолид (полимер гликолевой кислоты), сополимер полилактида и гликолида (сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты), полиангидриды, сложные поли(орто)эфиры, полипептиды, гиалуроновая кислота, коллаген, хондроитинсульфат, карбоновые кислоты, жирные кислоты, фосфолипиды, 45 полисахариды, нуклеиновые кислоты, полиаминокислоты, аминокислоты, такие как фенилаланин, тирозин, изолейцин, полинуклеотиды, поливинилпропилен, поливинилпирролидон и силикон. Предпочтительная биоразложимая матрица представляет собой матрицу из любого следующего материала: полилактид, полигликолид или сополимер полилактида и гликолида (сополимеры молочной 50 кислоты и гликолевой кислоты).

Как хорошо известно специалистам в данной области, доза композиции должна зависеть от ряда факторов, таких, например, как состояние, подлежащее лечению, конкретная применяемая композиция и другие клинические факторы, такие как вес,

размер, пол и общее состояние здоровья пациента, площадь поверхности тела, конкретное соединение или композиция, подлежащая введению, другие одновременно применяемые лекарственные средства и путь введения.

5 Композицию можно вводить в сочетании с другими композициями, содержащими биологически активную субстанцию или соединение, прежде всего по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, включающей соединения против окислительного стресса, антиапоптозные соединения, хелаторы металлов, ингибиторы репарации ДНК, такие как пирензепин и метаболиты, 3-амино-1-пропансульфоновую 10 кислоту (3APS), 1,3-пропандисульфонат (1,3PDS), активаторы α -секретаз, ингибиторы β - и γ -секретаз, tau-белки, нейромедиатор, разрушители β -складчатой конформации, аттрактанты для клеточных компонентов, участвующих в клиренсе/истощении амилоида бета, ингибиторы укороченного на N-конце амилоида бета, включая пироглутаматированный амилоид бета 3-42, противовоспалительные молекулы, 15 «атипичные антипсихотические средства», такие, например, как клозапин, зипрасидон, рисперидон, арипипразол или оланзапин, или ингибиторы холинэстеразы (ChEI), такие как такрин, ривастигмин, донепезил и/или галантамин, агонисты M1 и другие лекарственные средства, включая любое модифицирующие амилоид или tau-белок 20 лекарственное средство, и пищевые добавки, такие, например, как витамин B12, цистеин, предшественник ацетилхолина, лицитин, холин, Glnkgo biloba, ациэтил-L-карнитин, идебенон, пропентофиллин или производное ксантина, в сочетании с антителом, предлагаемым в настоящем изобретении, и необязательно фармацевтически приемлемым носителем и/или разбавителем, и/или эксципиентом и в 25 сочетании с процедурами, предназначенными для лечения заболеваний.

Белковое фармацевтически активное действующее вещество может присутствовать в количестве от 1 нг до 10 мг на дозу. Как правило, схема применения может 30 предусматривать введение от 0,1 мкг до 10 мг антитела, предлагаемого в изобретении, прежде всего от 1,0 мкг до 1,0 мг и более предпочтительно от 1,0 мкг до 100 мкг, при этом все индивидуальные количества, входящие в указанный диапазон, подпадают под объем изобретения. Если введение осуществляют путем непрерывной инфузии, то более приемлемая доза может составлять от 0,01 мкг до 10 мг на килограмм веса тела в час, при этом все индивидуальные количества, входящие в указанный диапазон, 35 подпадают под объем изобретения.

Введение, как правило, является парентеральным, например, внутривенным. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. К неводным растворителям относятся (но 40 не ограничиваясь только ими) пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные растворители можно выбирать из группы, включающей воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и забуференные среды. Парентеральные наполнители включают раствор 45 хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактированный раствор Рингера или жидкие жиры. Наполнители для внутривенного введения представляют собой добавки для восполнения дефицита жидкости или питательных веществ, электролитные добавки (например, на основе декстрозы Рингера) и другие 50 вещества. Могут присутствовать также консерванты, такие, например, как antimicrobные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и др.

Фармацевтическая композиция может содержать также белковые носители, такие, например, как сывороточный альбумин или иммуноглобулин, в частности

человеческого происхождения. В зависимости от назначения в фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении, могут присутствовать дополнительные биологически активные агенты.

5 Когда мишень для связывания локализована в головном мозге, то конкретными вариантами осуществления изобретения является антитело или его активный фрагмент, которые могут преодолевать гематоэнцефалический барьер. Некоторые нейродегенеративные заболевания ассоциированы с повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера, в результате антитело или его активный фрагмент
10 можно легко интродуцировать в головной мозг. Когда гематоэнцефалический барьер остается интактным, то существует несколько известных в данной области подходов для транспортирования молекул через него, включая (но не ограничиваясь только ими) физические методы, методы, основанные на применении липидов и методы, основанные на применении рецепторов и каналов.

15 Физические методы транспортирования антитела или его активного фрагмента через гематоэнцефалический барьер включают (но не ограничиваясь только ими) проникновение, полностью обходящее гематоэнцефалический барьер, или создание отверстий в гематоэнцефалическом барьере. Методы обхода включают (но не ограничиваясь только ими) непосредственную инъекцию в головной мозг (см., например, Papanastassiou и др., Gene Therapy 9, 2002, сс.398-406) и имплантацию устройства для введения в головной мозг (см., например, Gill и др., Nature Med. 9, 2003, сс.589-595; и Gliadel Wafers™, фирма Guildford Pharmaceutical). Метод создания
20 отверстий в барьере включают (но не ограничиваясь только ими) обработку ультразвуком (см., например публикацию US №2002/0038086), осмотическое давление (например, путем введения гипертонического раствора маннита (Neuwelt E.A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, т.1 и 2, Plenum Press, N.Y., 1989), увеличение проницаемости с помощью, например, брадикинина или агента,
25 увеличивающего проницаемости (permeabilizer A-7) (см., например, US 5112596, 5268164, 5506206 и 5686416), и трансфекцию нейронов, которые присутствуют в гематоэнцефалическом барьере, векторами, которые содержат гены, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (см., например, публикацию патента США №2003/0083299).

30 Методы транспортирования антитела или его активного фрагмента через гематоэнцефалический барьер, основанные на применении липидов, включают (но не ограничиваясь только ими) капсулирование антитела или его активного фрагмента в липосомы, которые сшивают со связывающими фрагментами антитела, которые
40 связываются с рецепторами в сосудистом эпителии гематоэнцефалического барьера (см., например, публикацию патента США №2002/0025313), и нанесение на антитело или его активный фрагмент покрытия из липопротеиновых частиц низкой плотности (см., например, публикацию патента США 2004/0204354) или аполипропротеина E (см., например, публикацию патента США №2004/0131692).

45 Методы транспортирования антитела или его активного фрагмента через гематоэнцефалический барьер, основанные на применении рецепторов и каналов включают (но не ограничиваясь только ими) применение глюкокортикоидных блокаторов для повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера (см.,
50 например, публикации заявок на патент США №№2002/0065259, 2003/0162695 и 2005/0124533); активацию калиевых каналов (см., например, публикацию заявки на патент США №2005/0089473), ингибирование транспортеров лекарственных средств ABC (см., например, публикацию заявки на патент США №2003/0073713); нанесение

на антитела покрытия из трансферрина и модуляцию активности одного или нескольких рецепторов трансферрина (см., например, публикацию заявки на патент США №2003/0129186), и канонизацию антител (см., например, US 5004697).

Выявление/диагностирование

5 Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения являются способы и наборы, предназначенные для выявления и диагностики ассоциированных с амилоидом заболеваний или состояний. Эти методы включают известные иммунологические методы, которые обычно применяют для выявления и

10 количественной оценки субстанций в биологических образцах или в условиях *in situ*.

Диагностирование ассоциированного с амилоидом заболевания или состояния у пациента можно осуществлять путем выявления иммуноспецифического связывания моноклонального антитела или его активного фрагмента с эпитопом амилоидного

15 образец или специфическую часть организма или область организма, которая, как ожидается, может содержать амилоидный белок, с антителом, которое связывается с эпитопом амилоидного белка, дают возможность антителу связаться с амилоидным антигеном с образованием иммунологического комплекса, выявляют формирование

20 иммунологического комплекса и устанавливают корреляцию между присутствием или отсутствием иммунологического комплекса и присутствием или отсутствием амилоидного белка в образце или специфической части или области организма.

Биологические образцы, которые можно применять для диагностирования ассоциированного с амилоидом заболевания или состояния, представляют собой,

25 например, жидкости, такие как сыворотка, плазма, слюна, желудочные секреты, слизистая, спинномозговая жидкость, лимфатическая жидкость и т.п., или образцы клеток или тканей, полученные из организма, такие как нейронная ткань, ткань головного мозга, сердечная или сосудистая ткань. Для выявления присутствия или

30 отсутствия амилоидного белка в образце можно применять любой иммуноанализ, известный обычному специалисту в данной области (см. Harlow и Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, сс. 555-612), такой, например, как анализы, которые применяют в методах выявления с использованием вторичных реагентов для выявления, ELISA и анализы

35 иммунопреципитации и агглютинации. Подробное описание этих анализов представлено, например, в WO 96/13590 на имя Maertens и Stuyver, Zrein и др., 1998 и в WO 96/29605.

Для установления диагноза *in situ* антитело или его любой активный и

40 функциональный фрагмент можно вводить в организм, подлежащий диагностированию, с помощью методов, известных в данной области, таких, например, как внутривенная, интраназальная, внутрибрюшинная, внутричерепная, внутриартериальная инъекция, так, чтобы могло произойти специфическое связывание антитела, предлагаемого в изобретении, с эпитопной

45 областью на амилоидном белке. Комплекс антитело/антиген можно выявлять путем присоединения метки к антителу или его функциональному фрагменту.

Иммуноанализы, применяемые в диагностике, как правило, основаны на использовании меченых антигенов, антител или вторичных реагентов,

50 предназначенных для обнаружения. Эти белки или реагенты можно метить с помощью соединений, как правило, хорошо известных специалистам в данной области, таких как ферменты, радиоактивные изотопы и флуоресцентные, люминесцентные и хромогенные субстанции, включая окрашенные частицы, такие как

коллоидное золото и гранулы из латекса. Среди указанных методов мечение с помощью радиоактивных изотопов можно применять практически во всех типах анализов и с наибольшим количеством вариаций. Конъюгированные с ферментами метки являются особенно предпочтительными, когда требуется избежать применения радиоактивности или когда требуется быстрое получение результатов. Флуорохромы, хотя для их применения требуется дорогостоящее оборудование, обеспечивают очень чувствительный метод обнаружения. Антитела, применяемые в этих анализах, представляют собой моноклональные антитела, поликлональные антитела и поликлональные антитела, очищенные на основе аффинности.

В другом варианте антитело можно метить косвенно путем взаимодействия с мечеными субстанциями, которые обладают аффинностью к иммуноглобулину, такими как протеин А или G или вторичные антитела. Антитело можно конъюгировать с вторичной субстанцией и выявлять с помощью меченой третьей субстанции, которая обладает аффинностью ко второй субстанции, конъюгированной с антителом. Например, антитело можно конъюгировать с биотином и конъюгат антитело-биотин выявлять с помощью мечения авидином или стрептавидином. Аналогично этому антитело можно конъюгировать с гаптенем и конъюгат антитело-гаптен выявлять с помощью меченого антитела к гаптену.

Специалистам в данной области должны быть хорошо известны указанные и другие приемлемые метки, которые можно применять согласно настоящему изобретению. Связывание этих меток с антителами или их фрагментами можно осуществлять с помощью стандартных методов, как правило, известных обычным специалистам в данной области. Общепринятые методики описаны у Kennedy J.H. и др., Clin. Chim. Acta 70, 1976, сс.1-31; и у Schurs A.H.W.M. и др., Clin. Chim Acta 81, 1977, сс.1-40. Упомянутые в последней ссылке методы сочетания представляют собой методы на основе глутарового альдегида, метод на основе перйодата, метод на основе дималеимида и т.д., все они включены в настоящее описание в качестве ссылки.

В современных иммуноанализах применяют метод, основанный на использовании двойных антител, для выявления присутствия анализируемого вещества, при котором антитело метят косвенно путем реактивности со вторым антителом, которое предварительно метят выявляемой меткой. Второе антитело предпочтительно представляет собой антитело, которое связывается с антителами животного, из которого получено моноклональное антитело. Другими словами, если моноклональное антитело представляет собой мышинное антитело, то меченое второе антитело представляет собой антимышиное антитело. Для моноклонального антитела, предназначенного для применения в описанном ниже анализе, эта метка предпочтительно представляет собой сенсibilизированную антителом гранулу, предпочтительно магнитную гранулу. Для поликлонального антитела, предназначенного для применения в иммуноанализах, представленных в настоящем описании, метка предпочтительно представляет собой выявляемую молекулу, такую как радиоактивная, флуоресцентная или электрохемилюминисцентная субстанция.

Согласно настоящему изобретению можно применять также альтернативную систему, основанную на использовании двойных антител, которую часто называют системами быстрого формата, поскольку они адаптированы к быстрому выявлению присутствия анализируемого вещества. Для этой системы требуется высокая аффинность антитела и анализируемого вещества. Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения присутствие амилоидного белка определяют с использованием пары антител, каждое из которых специфично для амилоидного

белка. Одно из указанной пары антител обозначают в контексте настоящего описания как «идентифицирующее антитело», а второе из указанной пары антител обозначают в контексте настоящего описания как «иммобилизованное антитело».

5 Моноклональное антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, можно применять как в качестве иммобилизованного антитела, так и в качестве идентифицирующего антитела. Моноклональное антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, можно применять также в качестве и иммобилизованного, и идентифицирующего антитела в одном анализе. Таким образом, одним из вариантов 10 осуществления настоящего изобретения является применение сэндвич-анализа с использованием двойного антитела для выявления амилоидного белка в образце биологической жидкости. В этом анализе анализируемое вещество (амилоидный белок) помещают посередине между идентифицирующим антителом и иммобилизованным антителом, при этом иммобилизованное антитело необратимо 15 иммобилизовано на твердой подложке. Идентифицирующее антитело должно содержать выявляемую метку, предназначенную для идентификации присутствия сэндвича антитело-анализируемое вещество и, как следствие, присутствия анализируемого вещества.

20 Примерами твердофазных субстанций являются (но не ограничиваясь только ими) титрационные микропланшеты, лабораторные пробирки из полистирола, магнитные, пластиковые или стеклянные гранулы и предметные стекла, которые хорошо известны в области радиоаммуноанализов и иммуноферментных анализов. Методы сочетания антител с твердыми фазами хорошо известны специалистам в данной области. В 25 последние годы в качестве твердых подложек начали применять целый ряд пористых материалов, таких как нейлон, нитроцеллюлоза, ацетат целлюлозы, стеклянные волокна и другие пористые полимеры.

Настоящее изобретение относится также к диагностическому набору, 30 предназначенному для выявления амилоидного белка в биологическом образце, который содержит указанную выше композицию. Кроме того, настоящее изобретение относится к указанному диагностическому набору, который помимо указанной выше композиции содержит также реагент для выявления, описанный выше. Понятие «диагностический набор» относится в целом к любому диагностическому набору, 35 известному в данной области. Более конкретно последнее понятие относится к диагностическому набору, описанному у Zrein и др., 1998.

Еще одним объектом настоящего изобретения являются новые иммунозонды и тест-наборы, предназначенные для выявления и диагностики ассоциированных с 40 амилоидом заболеваний и состояний, которые содержат антитела, предлагаемые в настоящем изобретении. Для получения иммунозондов антитела прямо или косвенно присоединяют к приемлемой репортерной молекуле, например, ферменту или радионуклиду. Тест-набор включает контейнер, который содержит одно или несколько антител, предлагаемых в настоящем изобретении, и инструкции по 45 применению антител для целей связывания с амилоидным белком с получением иммунологического комплекса и выявления формирования иммунологического комплекса, при этом присутствие или отсутствие иммунологического комплекса коррелирует с присутствием или отсутствием амилоидного белка.

50 Примеры

Материалы

Разработка и получение мышинового моноклонального антитела ACI-01-AB7C2 (обозначенное в настоящем описании как «mC2» и «hC2» в случае гуманизированного

антитела) представлены в находящейся в совместном рассмотрении заявке EP 05027092.5, поданной 12.12.2005 г., описание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

5 Клетки гибридомы линии FP-12H3-C2, продуцирующие мышинное моноклональное антитело ACI-01-Ab7C2 (обозначенное в настоящем описании как «mC2» и «hC2» в случае гуманизированного антитела), описание которого представлено в находящейся в совместном рассмотрении заявке EP 05027092.5, в соответствии с требованиями Будапештского договора депонированы 01 декабря 2005 г. в Немецкой коллекции
10 микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Брауншвейг, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Branuschweig, под регистрационным номером DSM ACC2750.

Клетки гибридомы культивировали в модифицированной по методу Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки и
15 антибиотиками (пенициллин/стрептомицин). Оценивали изотип полученного антитела и, как и ожидалось, обнаружено, что оно относится к мышинному IgG2b/Kappa.

Анализ

ELISA, позволяющий оценивать связывание амилоида бета, является приемлемым анализом для определения эффективности антитела C2. В качестве положительных
20 контрольных антител применяли мышинное антитело FP-12H3-C2 (фирма Genovac, лот № АК379/01), и стандартное антитело 1560 фирмы Chemicon (лот №0508008791).

Выбор человеческих константных областей

Рекрутмент иммунной системой является нежелательным для антитела, являющегося кандидатом для клинического применения, поэтому отобранная
25 человеческая константная область тяжелой цепи представляла собой область человеческого IgG4, модифицированную путем замены серина в положении 228 в шарнирной области на пролин (HuIgG4 Ser-Pro). Эта мутация стабилизирует находящийся между цепями дисульфидный мостик и предупреждает образование
30 «полумолекул», что может происходить в препаратах нативного человеческого IgG4. В антителе, экспрессируемом клеточными линиями-продуцентами, также должен быть удален концевой лизин. Последовательности человеческих константных областей HuIgG4 Ser-Pro и человеческой каппа-цепи представлены в SEQ ID NO:17 и 14 соответственно.

35 Пример 1. Клонирование и секвенирование переменных областей антитела

Общую РНК получали из 3×10^6 клеток гибридомы (одна колба T175) с помощью набора Qiagen RNeasy (каталожный №74104). РНК элюировали 50 мкл воды и оценивали на 1,2%-ном агарозном геле. Кондиционированную клеточную среду
40 сохраняли и образец использовали для оценки активности антитела.

Получали кДНК V_H и V_K с помощью обратной транскриптазы с использованием праймеров для константной области мышинного IgG и к-цепи. Первую цепь кДНК амплифицировали с помощью ПЦР, используя большой набор праймеров сигнальных последовательностей. Амплифицированные ДНК очищали на геле и клонировали в
45 векторе pGem[®] T Easy (фирма Promega). Полученные клоны V_H и V_K подвергали скринингу с помощью ПЦР в отношении вставок ожидаемого размера и последовательность ДНК отобранных клонов определяли путем автоматического секвенирования ДНК. Локализацию гипервариабельных участков (CDR) в
50 последовательностях определяли на основе других последовательностей антител (Kabat E.A. и др., 1991). В настоящем описании использовали принятую номенклатуру Кэбота для переменных областей антител; поэтому нумерация остатков может отличаться от точного линейного номера.

Последовательность ДНК и выведенная аминокислотная последовательность V_K mC2 представлены в SEQ ID NO:29 и 27 соответственно. Четыре клона имели идентичную продуктивную последовательность. В некоторых клонах были обнаружены также непродуктивная аберрантная последовательность V_K , полученная от участвующего в слиянии компонента гибридомы.

Выделяли две различные продуктивные последовательности V_H mC2. Последовательность V_H AF mC2 (см. SEQ ID NO:30) обнаружена в целом в 29 клонах, имеющих 14 одиночные замены пар оснований в индивидуальных клонах.

Последовательность V_H B mC2 обнаружена в целом в 8 клонах. Пять из них имели одинаковую последовательность, а в трех остальных клонах обнаружены вариации. Вероятно, указанные подобные последовательности V_H B образуются в качестве артефакта ПЦР-амплификации. Обнаружена также непродуктивная аберрантная V_H в гибридоме C2, и это связано с дефектным сочленением V-D-J

Для выявления V_H mC2 с требуемой («правильной») активностью получали две различные последовательности V_H , т.е. AF и B, объединенные с V_K mC2, для тестирования в отношении требуемой активности антитела.

Пример 2. Конструирование генов химерного антитела

Человеческое химерное антитело в его наиболее общей форме состоит из человеческих константных областей, сцепленных с мышинными (или другими нечеловеческими) переменными областями. Химерное антитело представляет собой очень ценный «инструмент», во-первых, для подтверждения того, что «правильные» переменные области являются идентичными, и, во-вторых, для применения в качестве контрольного антитела в анализах связывания антигенов с одинаковыми эффекторными функциями и при использовании одинаковых вторичных реагентов для выявления, таких как гуманизированное или сконструированное с помощью генной инженерии антитело, и его можно применять также для изучения фармакокинетических и других свойств человеческих константных областей с учетом конкретной мишени для антитела.

Конструировали экспрессионные векторы для двух химерных тяжелых цепей, содержащих переменные области V_H AF mC2 или V_H B mC2, сцепленные с константной областью rHuIgG4 (Ser-Pro) в экспрессионном векторе pSVgpt. Его основой является вектор pSVgpt (Mulligan и Berg, 1980), и он включает ген, обуславливающий устойчивость к ампициллину, для селекции в бактериальных клетках, ген gpt для селекции в клетках млекопитающих, энхансерную область тяжелой цепи мышинового иммуноглобулина, геномную последовательность, кодирующую ген константной области, и полиА-последовательности SV40. Для экспрессии переменную область тяжелой цепи встраивали в виде HindIII-BabHI-фрагмента.

Конструировали вектор химерной легкой цепи, содержащую V_K C2, сцепленную с константной областью человеческой С-каппа, в экспрессионном векторе pSVhyg. (Hieter PA и др., 1980) pSVhyg включает ген, обуславливающий устойчивость к ампициллину, для селекции в бактериальных клетках, ген hyg для селекции в клетках млекопитающих, энхансерную область тяжелой цепи мышинового иммуноглобулина, геномную последовательность, кодирующую константную область каппа-цепи, и включает энхансер каппа-цепи и полиА-последовательности SV40. Для экспрессии переменную область легкой цепи встраивали в виде HindIII-BabHI-фрагмента.

Кассеты экспрессии для мышинных последовательностей V_H и V_K C2 конструировали путем добавления 5'- фланкирующей последовательности,

включающей лидерную последовательность сигнального пептида, лидерную последовательность интрона и промотор мышинового иммуноглобулина, и 3'-фланкирующей последовательности, включающей сайт сплайсинга и интронную последовательность, используя векторы VH-PCR1 и VK-PCR1 в качестве матриц (Riechmann и др., 1988). Правильность последовательности ДНК подтверждали для VH и VK в химерных экспрессионных векторах. ДНК генов и аминокислотные последовательности VH и VK в кассетах экспрессии представлены на фиг.1 и 2.

Пример 3. Экспрессия химерных антител

3.1 Экспрессия в стабильных клеточных линиях

Линия клеток-хозяев для экспрессии антитела представляла собой линию NSO, т.е. не продуцирующую иммуноглобулины линию мышинной миеломы, которую получали из Европейской коллекции культур клеток животных, (European Collection of Animal Cell Cultures, Porton UK) (ECACC No 85110503). Экспрессионными векторами для тяжелой и легкой цепи совместно трансфектировали NSO-клетки путем электропорации. Колонии, экспрессирующие ген *gpt*, отбирали в модифицированной по методу Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 0,8 мкг/мл микофенольной кислоты и 250 мкг/мл кантанина. Клоны трансфектированных клеток подвергали скринингу в отношении производства человеческого антитела с помощью ELISA для человеческого IgG. Клеточные линии, секретирующие антитело, размножали и наиболее эффективные продуценты отбирали и замораживали в жидком азоте. Клеточные линии, наиболее эффективно продуцирующие каждое антитело, размножали в указанной выше среде, но дополненной только 5% FBS. Химерные антитела очищали с помощью Prosep®-A (фирма Bioprocessing Ltd). Концентрацию определяли с помощью ELISA для человеческого антитела в виде IgGK. Антитела анализировали также с помощью ДСН-ПААГ.

3.2 Кратковременная экспрессия химерных антител

Для экспресс-оценки различных химерных антител применяли кратковременную экспрессию для быстрого получения небольших количеств клеточных супернатантов, содержащих рекомбинантное антитело, предназначенное для тестирования. Кассеты экспрессии V_H и V_K mC2 переносили в векторы, основой которых являлся pcDNA3.1 (фирма Invitrogen), для кратковременной экспрессии. Вектор для тяжелой цепи включал константную область человеческого IgG. Вектор для легкой цепи включал константную область человеческой каппа-цепи. Клетки почки человеческого эмбриона (НЕК 298) трансфектировали как V_H AF mC2, так и V_H B mC2 в сочетании с V_K mC2 с использованием такого реагента как Lipofectamine 2000 (фирма Invitrogen, каталожный номер 11668), согласно протоколу производителя. Кондиционированную клеточную среду собирали через 3 дня после трансфекции. Количество продуцируемого антитела определяли с помощью ELISA для человеческого антитела в виде IgGK.

Пример 4. Активность химерных антител C2

4.1 Активность химерных антител C2, продуцируемых в результате кратковременной трансфекции

Образцы кондиционированной среды после кратковременной трансфекции, содержащие два различных химерных антитела, оценивали с помощью ELISA в отношении связывания с амилоидом бета. Результаты четко свидетельствуют о том, что V_H AF C2 имеет правильную последовательность. Химерное антитело V_H AF C2 / V_K C2 обладало высокой способностью к связыванию при использовании этого

анализа, но антитело, содержащее V_H В C2 / V_K C2 совсем не обладало способностью к связыванию. Мышиное контрольное антитело Chemicon 1560 обладало высокой способностью к связыванию, но связывание полученного от фирмы-поставщика очищенного мышиного антитела C2 было низким. Следует отметить, что для мышиных антител с мышиными константными областями применяли вторичное антитело, отличное от того, которое применяли в случае химерных антител с человеческими константными областями, поэтому нельзя проводить непосредственное сравнение результатов. Позднее установлено, что в этом анализе был получен хороший результат при использовании кондиционированной среды гибридомы C2.

4.2 Активность очищенных химерных антител C2 Два различных химерных антитела C2 очищали из описанных выше стабильных клеточных линий NSO, как описано выше, и анализировали с помощью ELISA для амилоида бета. Полученные результаты коррелировали с результатами, полученными при использовании антител после кратковременной экспрессии. C2-антитело ChVH AF/ChVK обладало способностью к эффективному связыванию при оценке с помощью ELISA, а C2-антитело ChVH B/ChVK антитело совсем не обладало способностью к связыванию.

Пример 5. Создание генов гуманизированного антитела C2 Сравнивали аминокислотные последовательности V_H и V_K mC2 с последовательностями V_H и V_K антитела грызунов с использованием баз данных NCBI и Кэбота.

5.1 Вариабельная область легкой цепи

Геном мышинной зародышевой линии, наиболее близким по совместимости к V_K mC2, является bbl, локус MMU231201 (Schable и др., 1999). В нем только две аминокислоты отличаются от указанной последовательности зародышевой линии, они обе локализованы в CDRL1. Обнаружены зрелые мышиные антитела с подобной, но не идентичной последовательностью. Некоторые из них имели идентичный CDRL2 и идентичный CDRL3, но CDRL1 mC2, вероятно, является уникальным. V_K mC2 соответствовала подгруппе MuV_KII согласно номенклатуре Кэбота. В положении 87 V_K mC2 предпочтительно присутствует F, а не Y, который является более обычным для этой подгруппы, это свидетельствует о том, что указанный каркасный остаток может быть важным для активности антитела. Сравнение с V_K -последовательностями человеческой зародышевой линии позволило установить, что гены из подгруппы V_KII являются более близкими по совместимости с $YkmC2$ (Cox и др., 1994).

Последовательность DPK15 в сочетании с человеческой J-областью HuJ_K1 отбирали для получения акцепторных каркасных последовательностей для гуманизированной V_K .

Создавали четыре последовательности гуманизированной V_K . C2HuVK1 состоит из CDR V_K mC2 с каркасами из DPK5 и человеческим JK1-участком. В версиях 2, 3 и 4 мышинные остатки заменяли в каркасе в положениях 45 или 87 или в обоих положениях. Остаток 45 может принимать участие в поддержании конформации CDR. Остаток 87 локализован на поверхности раздела V_H - и V_K -областей. Таким образом, эти остатки могут иметь решающее значение для сохранения способности антитела к связыванию.

Положения и замены, которые были осуществлены в каркасных участках легкой цепи, представлены в таблице 6. Проводили сравнения гуманизированных последовательностей с последовательностью V_K mC2 и с DPK15 и человеческим JK1-участком.

5.2 Вариабельная область тяжелой цепи

Геном мышинной зародышевой линии, наиболее близким по совместимости к V_H AF mC2, является VH7183, локус AF 120466 (Langdon и др., 2000). Сравнение представлено на фиг.3. В нем девять аминокислот отличаются от указанной последовательности зародышевой линии, большинство из которых локализовано в CDR2. Обнаружены зрелые мышинные антитела, идентичные или подобные (отличаются одним остатком) CDRH1 или подобные CDRH2 (отличаются одним остатком), но не обнаружено ни одного антитела, у которого все три CDR были бы идентичны V_H AF mC2. CDRH3 антитела mC2 является необычно коротким, он состоит только из трех остатков. Однако в базе данных обнаружены другие антитела, у которых CDR3 имеет такую же длину. V_H AF mC2 соответствовала подгруппе MuV_HIII согласно номенклатуре Кэбота. Остаток 47 V_H mC2 предпочтительно представлял собой L, а не более обычный W, а остаток 94 предпочтительно представлял собой S, а не более обычный R, что свидетельствует о том, что эти каркасные остатки могут быть важными для активности антитела. Сравнение с последовательностями V_H человеческой зародышевой линии показало, что гены подгруппы V_HIII являются наиболее близкими по совместимости с V_H mC2. Последовательность DP 15 в сочетании с человеческой J-областью HuJ_H6 отбирали для получения акцепторных каркасных последовательностей для гуманизированной V_H .

Создавали четыре последовательности гуманизированной V_H C2HuVH1 состоит из CDR V_H AF с каркасами из DP54 и HuJ_H6 . В версиях 2, 3 и 4 мышинные остатки заменяли в каркасе в положениях 47 или 94 или в обоих положениях. Остаток 47 в каркасном участке 2 имеет контакт как с CDR, так и с V_K -областью. Остаток 94 может принимать участие в поддержании конформации CDR. Таким образом, эти остатки могут иметь решающее значение для сохранения способности антитела к связыванию.

Положения и замены, которые были осуществлены в каркасных участках тяжелой цепи, представлены в таблице 7.

Пример 6. Конструирование генов гуманизированных антител

Модифицированные переменные области конструировали с помощью метода перекрывающейся ПЦР-рекомбинации. Кассеты экспрессии для химерного антитела, 2 ChV_H AF C2 и 2 ChV_K C2 использовали для мутагенеза каркасных участков с получением требуемых последовательностей. Синтезировали набор пар праймеров для мутагенеза, содержащих области, подлежащие изменению. Полученные кассеты экспрессии гуманизированных V_H и V_K клонировали в pUC19 и анализировали полную последовательность ДНК для подтверждения правильности каждой V_H и V_K . Модифицированные гены V-области тяжелой и легкой цепи вырезали из pUC19 в виде HindIII-BamHI-кассет экспрессии. Их переносили в экспрессионные векторы pSVgpt и pSVhyg, которые включали человеческие константные области IgG4 Ser-Pro или к-цепи соответственно, таким же образом, как и векторы для химерного антитела. Подтверждали правильность последовательности ДНК для гуманизированных V_H и V_K в экспрессионных векторах.

Пример 7. Экспрессия гуманизированных антител

7.1 Экспрессия в стабильных клеточных линиях

Экспрессионными векторами для гуманизированных тяжелой и легкой цепи совместно трансфектировали NSO-клетки путем электропорации аналогично методу, описанному для экспрессии химерных антител. Отбирали продуцирующие антитела клеточные линии и размножали и очищали гуманизированные антитела полностью аналогично методу, описанному для химерных антител. Очищенные антитела анализировали с помощью ДСН-ПААГ.

7.2 Кратковременная экспрессия гуманизированных антител

Для экспресс-оценки различных конструкций гуманизированных V_H и V_K кассеты экспрессии гуманизированных V_H и V_K C2 также переносили в векторы для кратковременной экспрессии согласно методу, описанном в разделе 3.2. Четырьмя конструкциями гуманизированных V_K C2 трансфектировали совместно с конструкцией V_H химерного C2 клетки линии HEK293. Аналогично этому четырьмя конструкциями гуманизированных V_H C2 трансфектировали совместно с конструкцией V_K химерного C2 клетки линии HEK293. Кондиционированную среду собирали через три дня после трансфекции. Количество продуцируемого антитела определяли с помощью ELISA для человеческого антитела в виде IgGK.

Пример 8. Активность гуманизированных антител C2

8.1 Активность гуманизированных антител C2, полученных с помощью кратковременной трансфекции

Образцы кондиционированной среды, полученной в результате кратковременной трансфекции, тестировали с помощью ELISA для амилоида бета. Полученные результаты ясно свидетельствуют о том, что версии 2 и 4 конструкции гуманизированных V_H C2 HuVH AF являются функциональными, при их объединении с каппа-цепью химерного C2 и сопоставимы в этом анализе по активности с химерным антителом C2. В противоположность этому, антитела, содержащие версии 1 и 3 C2 HuVH AF, объединенные с каппа-цепью химерного C2, совсем не обладали способностью к связыванию в этом анализе. Это свидетельствует о том, что замена мышинового остатка в положении 94 является важной для активности антитела. Антитела, содержащие тяжелую цепь химерного C2, объединенную с четырьмя каппа-цепями гуманизированных C2, все обладали высокой способностью к связыванию, сопоставимой с химерным антителом, при анализе с помощью ELISA.

8.2 Активность очищенных гуманизированных антител C2

Восемь различных гуманизированных антител C2, которые все содержали комбинации двух гуманизированных тяжелых цепей и четырех гуманизированных легких цепей, очищали из стабильных клеточных линий NSO согласно описанному выше методу и тестировали с помощью ELISA для амилоида бета (фиг.4).

Полученные результаты ясно свидетельствуют о том, что антитела C2 HuVH4 обладали более высокими характеристиками в этом анализе, чем антитела C2 HuVH2. Среди антител C2 HuVH2 антитело C2 HuVH2/HuVK3 обладало наиболее высокой активностью связывания, но приблизительно в 2 раза более низкой по сравнению с химерным контрольным антителом C2 ChVHAF/ChVK. Активность C2 HuVH2/HuVK2 была в 4-5 раз ниже по сравнению с активностью контрольного антитела. Активность антител, содержащих C2HuVH4 с четырьмя различными гуманизированными легкими цепями, оказалась сопоставимой. Наиболее высокая активность обнаружена у C2HuVH4/HuVK1, и все четыре антитела оказались близки по активности к контрольному химерному антителу в этом анализе.

Пример 9. Модификации CDRL2

9.1 Создание легкой цепи с модифицированным CDR2

Как отмечалось выше, многие антитела обладают такой же последовательностью CDRL2 («KVSNRFS»), что и антитело C2. Осуществляли тест для решения вопроса о том, можно ли вносить небольшие модификации в CDRL2 без отрицательного воздействия на активность антитела. Были выбраны две консервативные замены: R на K в положении 50 и S на N в положении 53. Таким образом, получали две разные последовательности CDRL2 «RVSNRFS» и «KVSSRFS».

Их встраивали в последовательность мышиной V_K , не имеющую других замен, получая VK-R mC2 и VK-S mC2 соответственно.

9.2 Кратковременная экспрессия антитела с модифицированным CDRL2

Две конструкции легкой цепи C2 с модифицированным CDRL2, описанные в разделе 11.2.1, клонировали в векторе для легкой цепи с целью кратковременной экспрессии. Каждой конструкцией совместно с V_H химерного C2 трансфектировали НЕК293-клетки. Кондиционированную клеточную среду собирали через 3 дня после трансфекции. Количество продуцируемого антитела определяли с помощью ELISA для человеческого антитела в виде IgGK.

9.3 Активность антитела C2 с модифицированным CDRL2

Образцы кондиционированной среды, которые получали в результате кратковременной трансфекции V_K mC2 с модифицированным CDRL2, объединенной с V_H mC2, тестировали с помощью ELISA для амилоида бета (фиг.5). Активность обоих антител VK-R и VK-S оказалась сопоставимой с активностью химерного антитела C2, что свидетельствует о том, что выбранные индивидуальные модификации CDRL2 не оказывали существенного влияния на активность антитела в этом анализе.

Пример 10. Определение аффинности

Для оценки специфичности и аффинности к связыванию мышиного (ACI-01-Ab-7-C2), химерного (AF) и гуманизированного антител (H4K1; H4K4), осуществляли VIACORE.RTM.-анализ с использованием мономеров и волокон амилоида бета 1-42 в качестве антигена, иммобилизованного на CM5-чипе. Технология VIACORE.RTM. основана на изменении показателя преломления в поверхностном слое при связывании антитела с антигеном, иммобилизованном на этом слое. Связывание определяли с помощью резонанса поверхностного плазмона (SPR) света лазера, отражающегося от поверхности. Анализ кинетики сигналов скорости ассоциации и диссоциации позволяет отличать неспецифическое и специфическое взаимодействие. Применяемая концентрация антитела составляла от 0,05 до 1,0 мкМ.

Таблица 1

Специфичность и аффинность связывания мышиного (ACI-01-Ab-7-C2), химерного (AF) и гуманизированного антител (H4K1; H4K4) в отношении мономеров и волокон амилоида бета 1-42

	Мономеры			Волокна		
	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD(М)
Мышиное ACI-01-Ab-7-C2	1.8E+04	2.7E-03	1.5E-07	2.4E+04	9.9E-04	4.1E-08
	Мономеры			Волокна		
	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)
Химерное AF	4,7E+04	9,5E-04	2E-08	5,1E+04	3,3E-04	6,5E-09
Гуманизированное H4K1	5,0E+04	9,5E-04	1,9E-08	4,9E+04	2,3E-04	4,7E-09
Гуманизированное H4K4	2,5E+04	4,4E-04	1,8E-08	1,3E+05	3,0E-04	2,3E-09

Пример 11. Иммунохимический анализ связывания

11.1 Срезы человеческого головного мозга

Головной мозг здоровых людей, пациентов с пре-AD, не сопровождающейся деменцией, и страдающих AD пациентов получали из Университетской клиники Бонна (Universitätsklinik in Bonn) после одобрения Этического комитета. Головной мозг фиксировали в формальдегиде и область гиппокампа обезвоживали, заливали в парафин и с помощью микротомы делали срезы толщиной 5 мкм. Парафиновые срезы хранили при КТ до использования. При использовании свежего материала делали

криосрезы толщиной 5 мкм с помощью криостата и срезы хранили при -80°C до использования.

11.2 Иммуногистохимия

Удаляли парафин парафиновых срезов и повторно гидратировали путем погружения слайдов в ксилол, а затем в 100%-ный этанол, 90%-ный этанол и 70%-ный этанол. Фоновый уровень снижали путем 30-минутной инкубации в 10% H₂O₂, 10%-ном растворе метанола в воде. Для восстановления антигена применяли инкубацию слайдов с 100%-ной муравьиной кислотой в течение 3 мин. После трех отмывок в забуференном Трис физиологическом растворе (TBS, pH 7,5) неспецифическое мечение блокировали путем инкубации слайдов в течение 2 ч в 10% БСА, 0,25% Triton X-100 в TBS. После отмывки (3 отмывки в TBS) осуществляли блокаду эндогенных антител путем добавления немеченого антитела к человеческому IgG (фирма Biomed) и инкубации слайдов в увлажняющих камерах в течение ночи при КТ. После еще 3 отмывок добавляли в слайдам первичное человеческое антитело к амилоиду и инкубировали в течение еще 24 ч при КТ. После отмывки добавляли к слайдам меченное с помощью щелочной фосфатазы вторичное антитело к человеческому IgG (фирма Sigma) и инкубировали в течение 2 ч при КТ. После отмывки слайды окрашивали с помощью жидкого красителя перманентного красного (фирма Dakocytomation), отмывали водой и сушили на воздухе перед погружением в заливочную среду (корбитбальзам).

Криосрезы фиксировали в метаноле в течение 30 мин при -80°C и фоновый уровень снижали путем добавления H₂O₂ к холодному метанолу до конечной концентрации 10% и инкубации в течение 30 мин при КТ. После трех отмывок в забуференном Трис физиологическом растворе (TBS, pH 7,5) неспецифическое мечение блокировали путем инкубации слайдов в течение 2 ч в 10% БСА, 0,25% Triton X-100 в TBS, как описано выше, и осуществляли описанную выше процедуру окрашивания.

Срезы оценивали с помощью микроскопа типа DMLB Leica и фотографировали с помощью фотоаппарата типа Leica DC500, используя программное обеспечение Leica FireCam 1.2.0.

Оба человеческих антитела А и В метили бляшки головного мозга страдающих AD пациентов (фиг.6). Они метили как рассеянные (диффузные), так и централизованные бляшки. Кроме того, с помощью антител А и В можно было выявлять также рассеянные бляшки у пациентов с пре-AD, не сопровождающейся деменцией. Оба антитела метили амилоид при церебральной амилоидной ангиопатии (САА) и в определенной степени окрашивали нейроны, которые могли соответствовать внутриклеточному амилоиду. Не обнаружено мечения контрольных образцов головного мозга здоровых людей. Бляшки можно было выявлять в парафиновых срезах, предварительно обработанных муравьиной кислотой, но бляшки не выявлялись в парафиновых срезах, которые предварительно не обрабатывали муравьиной кислотой, и в криосрезах, которые фиксировали в метаноле. Человеческое антитело Б не выявляло бляшки в парафиновых срезах, а мышинное антитело не окрашивало ни парафиновые срезы, ни криосрезы человеческого головного мозга.

Сокращения:

А = связывающееся химерное антитело AF (IgG4) (mC2ChVNAF).

Б = несвязывающееся химерное антитело Б (IgG4) (mC2VNB).

В = связывающееся гуманизированное антитело H4K1 (IgG4) (HuVH4/HuVK1).

Мышиное = мышинное антитело ACI-01-Ab-C2 (IgG2b).

Пример 12. Функциональная активность mC2 в отношении амилоидных волокон

12.1 Модификация конформации $A\beta_{1-42}$ -волокон и инициация нарушения агрегации после связывания антитела mC2

Для оценки механизма, с помощью которого антитело нарушает агрегацию ранее сформированных бета-амилоидных ($A\beta_{1-42}$) волокон осуществляли прямое сравнение (по типу «лицом к лицу») результатов, полученных с использованием флуоресцентного тиофлавин-Т-(Th-T)-анализа, который проводили для оценки нарушения агрегации, и анализа с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия твердого тела) меченного с помощью U- ^{13}C тирозина 10 и меченного с помощью валина 12 пептида $A\beta_{1-42}$, который применяли для определения вторичной конформации (фиг.7А). Антитело mC2 сольбилизировало 35,4% ранее сформированных $A\beta_{1-42}$ -волокон и в то же время индуцировало сдвиг вторичной конформации от бета-складчатой конформации в сторону конформации в виде произвольных спиралей. Снижение популяции бета-складчатой конформации в сторону конформации в виде произвольной спирали, составляло порядка 35% и, таким образом, хорошо совпадало с результатами, полученными с помощью флуоресцентного Th-T-анализа (фиг.7Б). Эти данные свидетельствуют о том, что связывание антитела mC2 инициировало переход вторичной структуры, что, возможно, вызывало дестабилизацию параллельного межмолекулярного устройства бета-складок, оказывая воздействие, приводящее к расщеплению удлинённых волокон на более мелкие фрагменты.

12.2 Зависящая от конформации аффинность к связыванию антитела mC2

Поскольку из научной литературы хорошо известно, что часть энергии связывания антитело-антиген можно использовать для зависящей от энергии модификации конформации антигена (Blond и Goldberg, 1987), осуществляли сравнительный эксперимент по оценке аффинности связывания антитела mC2 с полным белком $A\beta_{1-42}$ и с более коротким, состоящим из 9 аминокислот пептидом, который содержал эпитоп для антитела (фиг.8). Для этого сравнения аффинности гуманизированного антитела C2 применяли ELISA с использованием биотинилированных пептидов, перекрывающих полную аминокислотную последовательность эпитопа C2 (созданные на фирме Mimotopes и поступающие в продажу от фирмы ANAWA Trading SA), и биотинилированного полного пептида $A\beta_{1-42}$ (фирма Vachem). Анализ осуществляли согласно инструкциям производителя (фирма Mimotopes). Как видно из фиг.8 и таблицы 2, аффинность к связыванию антитела с пептидом, содержащим специфический эпитоп (аминокислоты 13-21 последовательности $A\beta_{1-42}$), оказалась на 38,40% выше по сравнению с аффинностью к связыванию с полным белком $A\beta_{1-42}$. Таким образом, можно предположить, что различие в энергии аффинности связывания использовалось для связанного с поглощением энергии перехода вторичной структуры амилоидного белка для презентации антигена в более доступном положении для связи с антителом. Это объясняет, почему аффинность антитела является более низкой для нативной (полный амилоидный белок), чем для выделенной субъединицы.

Таблица 2		
	О.П	
	Амилоид бета 13-21	Амилоид бета 1-42
hC2	1,225	0,9005
Контрольный IgG	0,171	0,196

Пример 13. Воздействие антиамилоидного антитела hC2 на агрегацию пептида амилоида бета 1-42

Для оценки способности гуманизированного моноклонального антитела к человеческому амилоиду бета hC2 опосредовать антагонизирующее действие в отношении агрегации и нарушать агрегацию амилоида бета (A β) осуществляли спектрофлуоресцентный анализ с использованием тиофлавина Т.

13.1 Анализ ингибирования агрегация

Лиофилизированный порошок A β ₁₋₄₂ восстанавливали в гексафторизопропанол (HFIP) до концентрации 1 мМ. Раствор пептида облучали ультразвуком в течение 15 мин при комнатной температуре, перемешивали в течение ночи и распределяли на аликвоты в несиликонизированные микроцентрифужные пробирки. Затем HFIP выпаривали в потоке аргона. Образовавшуюся пептидную пленку сушили в вакууме в течение 10 мин и хранили при -80°C до использования.

Для оценки обусловленного антителом ингибирования агрегации A β ₁₋₄₂ антитело hC2 предварительно разводили в ЗФР и приготавливали в несиликонизированной пробирке для инкубации раствор для анализа, содержащий следующие компоненты: 3,3 или 0,33 мкМ предварительно разведенное антитело, 10 мкМ тиофлавин Т, 33 мкМ A β ₁₋₄₂ и 8,2% ДМСО. В результате конечные молярные соотношения антитела к A β ₁₋₄₂ составляли 1:10 и 1:100. Приготавливали также соответствующие контрольные растворы. Затем растворы инкубировали в течение 24 ч при 37°C и определяли спектрофлуоресценцию (в относительных флуоресцентных единицах; RFU) в шести повторностях в черных 384-лучночных планшетах (фирма Perkin-Elmer) с помощью спектрофлуориметра фирмы Perkin-Elmer типа FluoroCount. Затем количественно оценивали спектрофлуоресценцию и рассчитывали нарушение агрегации в % согласно описанному ниже методу.

13.2 Анализ нарушения агрегации

Для анализа опосредуемого антителом нарушения агрегации ранее агрегированного A β ₁₋₄₂ приготавливали растворы низкомолекулярного A β ₁₋₄₂ согласно описанному выше методу с концентрацией вплоть до 110 мкМ в 27% ДМСО и 1×ЗФР. Затем этому раствору давали агрегироваться при 37°C в течение 24 ч, после чего добавляли следующие компоненты: 3,3 или 0,33 мкМ предварительно разведенное антитело и 10 мкМ тиофлавин Т. В результате конечные молярные соотношения антитела к A β ₁₋₄₂ составляли 1:10 и 1:100. Этот раствор затем инкубировали в течение еще 24 ч при 37°C. Затем количественно оценивали спектрофлуоресценцию и рассчитывали нарушение агрегации в % согласно описанному ниже методу.

13.3 Расчет

Ингибирование агрегации или нарушение агрегации выражали в виде среднего значения (в %) ингибирования или нарушения агрегации соответственно \pm среднее квадратичное отклонение (СКО) согласно следующему уравнению:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{(\text{RFU для полож. контроля} - \text{RFU для отр. контроля}) - (\text{RFU для образца с A}\beta_{1-42} - \text{RFU для образца с A}\beta_{1-42})}{\text{RFU для образца с A}\beta_{1-42}} \times 100\%$$

13.4 Результаты

13.4.1 Ингибирование агрегации A β ₁₋₄₂

Данные об ингибировании агрегации A β ₁₋₄₂ с помощью антитела hC2 представлены в таблице 3 и на фиг.11. При молярном соотношении антитела и A β ₁₋₄₂ 1:100

Ингибирование составляло примерно 30% (2 независимых эксперимента), а при

молярном соотношении 1:10 ингибирование составляло 80% (2 независимых эксперимента; см. таблицу 3).

Таблица 3		
Опосредуемое hC2 ингибирование агрегации A β ₁₋₄₂ при молярных соотношениях антитела и A β ₁₋₄₂ 1:100 и 1:10		
Антитело	Молярное соотношение (антитело и A β ₁₋₄₂)	
	1:100	1:10
hC2	30,0 \pm 4,1%	80,4 \pm 6,9%

13.4.2 Нарушение агрегации ранее агрегированного A β ₁₋₄₂

Данные о нарушении агрегации ранее агрегированного A β ₁₋₄₂ с помощью антитела hC2 представлены в таблице 4 и на фиг.12. При молярном соотношении антитела и A β ₁₋₄₂ 1:100 нарушение агрегации составляло примерно 24%, а при молярном соотношении 1:10 нарушение агрегации составляло 32% (3 независимых эксперимента; см. таблицу 4).

Таблица 4		
Опосредуемое hC2 нарушение агрегации ранее агрегированного A β ₁₋₄₂ при молярных соотношениях антитела и A β ₁₋₄₂ 1:100 и 1:10		
Антитело	Молярное соотношение (антитело и A β ₁₋₄₂)	
	1:100	1:10
hC2	23,9 \pm 4,4%	31,9 \pm 3,5%

С помощью анализа на основе тиофлавина Т можно продемонстрировать бифункциональные свойства гуманизованного антитела к A β hC2, а именно, способность ингибировать агрегацию A β 1.42 с образованием патогенной протофибриллярной конформации, а также нарушать агрегацию ранее сформированных протофибрилл A β ₁₋₄₂. hC2 ингибировало агрегацию A β ₁₋₄₂ на 80% при молярном соотношении антитела и A β ₁₋₄₂ 1:10. Установлена способность hC2 нарушать агрегацию на 32% ранее агрегированных протофибрилл A β ₁₋₄₂ при молярном соотношении 1:10.

Пример 14. Специфическое для конформации связывание mC2 с различными классами амилоидного белка

Для оценки специфичности mC2 в отношении амилоидного белка на разных стадиях его полимеризации осуществляли анализ мономерных, полимерных растворимых амилоидов и фибриллярного амилоида с использованием планшетов для ELISA, сенсibilизированных полимерным бета-амилоидом на указанных разных стадиях его полимеризации (фиг.9). Мономеры получали согласно методу, являющемуся модификацией ранее опубликованного метода (Klein, 2002), полимерный растворимый амилоид бета получали согласно методу, описанному у Barghorn и др., 2005, а волокна получали инкубацией амилоида (фирма Bachem, Швейцария) с конечной концентрацией 1 мкг/мкл Трис/HCl, pH 7,4 при 37°C в течение 5 дней с последующей стадией центрифугирования (10000 об/мин в течение 5 мин). После этого амилоидными полимерами сенсibilизировали планшеты для ELISA с использованием конечной концентрации 55 мкг/мл, и аффинность к связыванию определяли с помощью ELISA с использованием моноклонального антитела к мышинному IgG (фирма Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), меченного щелочной фосфатазой. Как продемонстрировано в таблице 5, антитело mC2 связывалось с более высокой аффинностью с полимерным растворимым амилоидом бета, чем с волокнами, и с наименьшей аффинностью с мономерами. Эти результаты демонстрируют, что на связывание антитела влияет помимо эпитопа конформация различных амилоидных

агрегатов.

Таблица 5

Специфическое для конформации связывание mC2 с амилоидными мономерами, олигомерами и волокнами			
mC2	О.П.		
Концентрация Ат (мкг/мл)	Олигомер	Волокна	Мономеры
0,625	2,806	1,620	1,155
0,312	1,724	0,989	0,649
0,156	1,036	0,631	0,397
0,078	0,652	0,499	0,333

Пример 14. Картирование эпитопов АС-иммунного моноклонального антитела hC2

Эпитопное картирование гуманизированного моноклонального антитела hC2

осуществляли с помощью ELISA, используя три различные пептидные библиотеки.

Одна библиотека содержала в целом 33 биотинилированных пептида, перекрывающих

полную аминокислотную (ак) последовательность $A\beta_{1-42}$, (созданную на

фирме Mimotopes и поступающую в продажу от фирмы ANAWA Trading SA), вторая

библиотека содержала биотинилированные пептиды, в ней использовали пептид 12

(ак 12-20 $A\beta$) из первой пептидной библиотеки и заменяли каждую ак в

последовательности аланином (см. таблицу 8, ниже), а третья библиотека содержала

биотинилированные пептиды 13, 14 или 15 (ак 13-21, 14-22 или 15-23 $A\beta$) и в ней

заменяли в каждом случае последние аминокислоты на аланин или на глицин как в

случае ак 21, которая уже представляла собой аланин (см. таблицу 9 ниже). В качестве

положительного контроля использовали биотинилированный полный пептид $A\beta$ 1.42

(фирма Bachem). Картирование эпитопов осуществляли согласно инструкциям

производителя (фирма Mimotopes). В целом, метод состоял в следующем:

сенсibilизированные стрептавидином планшеты (фирма NUNC) блокировали 0,1%

БСА в ЗФР в течение ночи при 4°C. После промывки ЗФР-0,05% Твин 20 планшеты

сенсibilизировали в течение 1 ч при КТ различными пептидами из библиотеки,

разведенными в 0,1% БСА, 0,1% азида натрия в ЗФР до конечной концентрации 10

мкМ. После отмывки планшеты инкубировали в течение 1 ч при КТ с антителом hC2

или с несвязывающимся с $A\beta$ химерным антителом в виде IgG4, разведенным до

концентрации 200 мкг/мл в 2% БСА, 0,1% азида натрия в ЗФР. Планшеты вновь

промывали и инкубировали с конъюгированным со щелочной фосфатазой козьим

антителом к человеческому IgG в течение 1 ч при КТ. После окончательной отмывки

планшеты инкубировали с субстратом фосфатазы (pNPP) и считывали при 405 нм с

помощью планшет-ридера для ELISA.

Установлено, что гуманизированное моноклональное антитело hC2 связывалось

специфически с пептидами 12, 13, 14 и 15 из первой пептидной библиотеки. Эти

пептиды содержали ак 12-20, 13-21, 14-22 и 15-23 (QKLVFFAED) $A\beta_{1-42}$ » это позволяло

предположить, что эпитоп находится в области ак 12-23 $A\beta$. Вторую библиотеку,

созданную путем замены на аланин, использовали для определения ак, имеющих

решающее значение для связывания с $A\beta$ 12-20 (VNHQKLVFF). Связывание

антитела hC2 практически полностью элиминировалось при замене аминокислот 16,

17, 19 или 20 на аланин, эти результаты свидетельствуют о том, что эти ак имеют в

высшей степени решающее значение для связывания антитела с $A\beta$. Связывание

антитела hC2 частично снижалось, когда заменяли ак 15 и 18.

Связывание также практически полностью элиминировалось, когда ак 14 заменяли

на аланин, что свидетельствует о том, что ак 14 также очень важна для связывания.

И, наконец, третью библиотеку применяли для выяснения вопроса о том, имеют ли решающее значение для связывания с эпитопом ак 21, 22 или 23. Связывание антитела с ак 15-23 снижалось, когда ак 23 заменяли на аланин, что свидетельствует о важности ак 23 для связывания. Связывание частично снижалось при замене ак 21 на глицин и слегка снижалось при замене ак 22 на аланин.

Пример 16: Нейрозащитное действие антитела hC2

Способность антитела hC2 защищать нейроны от индуцируемой олигомером Абета дегенерации оценивали с помощью анализа *in vitro*. Мышинные кортикальные нейроны эмбрионов возрастом 16,5-17,5 дней выделяли, иссекали и культивировали *in vitro* в среде N3-F12. Клетки выращивали в течение в целом 9 дней и заменяли среду в день 3 и в день добавления олигомера Абета или олигомера Абета плюс антитело к Абета hC2. В день 5 (для опыта - «4 дня с добавленным Абета») или день шесть (для опыта - «3 дня с добавленным Абета») некоторые лунки с клетками обрабатывали либо только 2 мМ олигомером Абета, либо комбинацией, включающей 2 мМ олигомер Абета и 50 мкг/мл антитела к Абета hC2.

Олигомер Абета получали, растворяя Абета 1-42 (рекомбинантный пептид - rPeptide) в HFIP, из которого отбирали аликвоты Абета-пептидов по 10 мкл с концентрацией 1 мг/мл и затем упаривали в вытяжном шкафу в течение 30 мин и пептидные пленки хранили при -80°C до использования. Перед применением пептидную пленку растворяли в 10 мкл ДМСО, затем в 78,6 мкл среды Хэма F12 и раствор Абета-пептида инкубировали при 4°C в течение 24-48 ч (конечная концентрация Абета 25 мкМ).

Для создания контрольных клеток добавляли только среду ДМСО-P12 в таком же объеме, что и Абета-ДМСО в день 5, и клетки культивировали в течение еще 4 дней без дополнительной обработки. В день 9 нейроны, полученные при всех условиях культивирования, фиксировали и окрашивали Tuj 1 (антитело к бета-тубулину), с последующим окрашиванием вторичным антителом, меченным ФИТЦ, для визуализации микротрубок, и таким образом, осуществляли обработку нейронов в целом. Результаты представлены на фиг.13.

Для необработанных мышинных эмбриональных кортикальных нейронов обнаружено обычное морфологическое строение после 9-дневного культивирования (фиг.13, самая левая панель). Обработка клеток олигомером Абета в течение 3 дней индуцировала дегенерацию аксонов и приводила к снижению общего количества аксонов (фиг.13, нижняя центральная панель), и это явление еще более усиливалось к четвертому дню обработки (фиг.13, верхняя центральная панель). В противоположность этому клетки, обработанные комбинацией олигомера Абета и антитела к Абета hC2, выглядели также как контрольные клетки (фиг.13, верхняя и нижняя правые панели). Эти результаты свидетельствуют о том, что антитело к Абета hC2 обладало способностью защищать эмбриональные мышинные кортикальные нейроны от индуцируемой олигомером Абета дегенерации.

Таблица 6				
Положения и изменения, сделанные в каркасных участках легкой цепи гуманизированного C2				
Положение в легкой цепи	45	87	50	53
Мышиная C2V _K	K	F	K	N
Гуманизированная C2HuV _K 1	Q	Y	K	N
Гуманизированная C2HuV _K 2	Q	F	K	N
Гуманизированная C2HuV _K 3	K	Y	K	N
Гуманизированная C2HuV _K 4	k	F	K	N

Человеческая зародышевая линия dpk15	Q	Y	L	N
Мышиная C2VK-R			R	
Мышиная C2VK-S				S

5

Положения и изменения, сделанные в каркасных участках тяжелой цепи гуманизованного C2		
Положение в тяжелой цепи	47	94
Мышиная C2VNAF	L	S
Гуманизованная C2HuVNAF1	W	R
Гуманизованная C2HuVNAF2	W	S
Гуманизованная C2HuVNAF3	L	R
Гуманизованная C2HuVNAF4	L	S
Человеческая зародышевая линия DP-54	W	R

15 Конструировали в общей сложности 8 различных антител с гуманизованными легкими цепями C2HuV_K1, C2HuV_K2, C2HuV_K3, C2HuV_K4 и тяжелыми цепями C2HuVNAF4 и C2HuVNAF2

Таблица 8

20

Обобщенные данные о пептидах, применяемых для второй библиотеки

Ак, важные для связывания выделены курсивом и подчеркнуты, а ак, которые абсолютно необходимы для связывания, выделены курсивом и жирным шрифтом

P12-20	V	H	H	Q	K	L	V	F	F
A12	A	H	H	Q	K	L	V	F	10F
25 A13	V	A	H	Q	K	L	V	F	F
A14	V	H	A	Q	K	L	V	F	F
A15	V	H	H	A	K	L	V	F	F
A16	V	H	H	Q	A	L	V	F	F
A17	V	H	H	Q	K	A	V	F	15F
30 A18	V	H	H	Q	K	L	A	F	F
A19	V	H	H	Q	K	L	V	A	F
A20	V	H	H	Q	K	L	V	F	A
Ак №.	12	13	14	15	16	17	18	19	20
									20

35

Таблица 9

Обобщенные данные о пептидах, применяемых для третьей библиотеки

Ак, важные для связывания выделены курсивом и подчеркнуты, а ак, которые абсолютно необходимы для связывания, выделены курсивом и жирным шрифтом

40 P13-21		H	H	Q	K	L	V	F	F	A		
P13-21	G21	H	H	Q	K	L	V	F	F	G		
P14-22			H	Q	K	L	V	F	F	A	E	
45 P14-22	A22		H	Q	к	L	V	F	F	A	A	
P15-23				Q	к	L	V	F	F	A	E	D
P15-23	A23			Q	к	L	V	F	F	A	E	A
50 Ак №		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

Список литературы

1. Barghorn S., Nimmrich V., Striebinger A., Krantz C., Keller P., Janson B., Bahr M., Schmidt M., Bitner R.S., Harlan J., Barlow E., Ebert U., Hillen H., Globular amiloid beta-peptide oligomer – a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer disease, J. Neurochem., 95, 2005, сс. 834-847
2. Blond and Goldberg, PNAS March 1, 1987, том. 84, № 5, 1987, сс.1147-1151
3. Cox J.P.L., Tomlinson I.M. и Winter G., A directory of human germ-line V κ segments reveals a strong bias in their usage, Eur. J. Immunol., 24, 1994, сс. 827-836
4. Hieter P.A., Max E.E., Seidman J.G., Maizel J.V. Jr., Leder P., Cloned human and mouse kappa immunoglobuline constant and J region genes conserve homology in functional segments, Cell, 22(1 Pt 1), ноябрь 1980, сс. 197-207
5. Kabat E.A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S., Foeller C., Sequences of Proteins of Immunological Interest, изд-во US Department of Health and Human Service, 1991
6. Klein W.L., Abeta toxicity in Alzheimer disease: globular soluble polymeric amiloid beta (ADDLs) as new vaccine and drug targets, Neurochem. Int., 41(5), 2002, сс. 345-352
7. Langdon S.D., Inaioki M., Kelsoe G. и Tedder T.F., Germline sequences of V(H)7183 gene family members in C57BL/6 mice demonstrate natural selection of particular sequences during recent evolution, Immunogenetics, 51, 2000, сс. 241-245
8. Milligan R.C. и Berger P., Expression of a bacterial gene in mammalian cells, Science, 209, 1080, сс. 1422-1427
9. Riechmann L., Clark M., Waldmann H., Winter G., Reshaping human antibodies for therapy, Nature, 332, 1988, сс. 323-327
10. Schable K.F., Thiebe R., Bensch A., Brensing-Kueppers J., Heim V., Kirschbaum T., Lamm R., Ohnrich M., Pourrajabi S., Rosenthaler F., Schwendinger J., Wichelhaus D., Zocher L и Zaxhau H.G., Characteristics of the immunoglobuline V kappa genes, pseudogenes, relics and orphans in the mouse genome, Eur. J. Immunol., 29, 1999, сс. 2082-2086
11. Tomlinson I.M., Walter G., Marks J.D., Llewelyn M.B. и Winter G.J., The repertoire of human germline V H sequences reveals approximately 50 groups of V H segments with different hypervariable loops. J. Mol. Biol., 227, 1992, сс. 776-798.

Формула изобретения

1. Антитело или его фрагмент, способные специфически связываться с β -амилоидным белком, где указанное антитело или его фрагмент содержит:

(a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 96% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13; или

(b) переменную область тяжелой цепи (HCVR), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 96% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15, и переменную область легкой цепи (LCVR), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12, или

(c) (i) LCVR, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12 и (h) HCVR, включающую: CDR1 HCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, CDR2 HCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и CDR3 HCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; или

(d) (i) HCVR, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15 и (ii) LCVR, включающую: CDR1 LCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR2 LCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, RVSNRFS или KVSSRFS; и CDR3 LCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

2. Антитело или его фрагмент по п.1, которое включает CDR1 HCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, CDR2 HCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и CDR3 HCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

3. Антитело или его фрагмент по п.1, которое включает CDR1 LCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4; CDR2 LCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, RVSNRFS или KVSSRFS; и CDR3 LCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

4. Антитело или его фрагмент по п.1, которое включает:

HCVR, включающую CDR1 HCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1; CDR2 HCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2; CDR3 HCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, и CDR1 LCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4; CDR2 LCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 RVSNRFS или KVSSRFS; и CDR3 LCVR, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

5. Антитело или его фрагмент по п.4, в котором CDR2 LCVR включает аминокислотную последовательность RVSNRFS.

6. Антитело или его фрагмент по п.4, в котором CDR2 LCVR включает аминокислотную последовательность KVSSRFS.

7. Антитело или его фрагмент по п.4, в котором CDR2 LCVR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

8. Антитело или его фрагмент по п.4, которое включает HCVR, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15.

9. Антитело или его фрагмент по п.4, в которое включает LCVR, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.

10. Антитело или его фрагмент по п.4, которое включает HCVR, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15, и LCVR включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.
11. Антитело или его фрагмент по п.4, которое включает HCVR, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.
12. Антитело или его фрагмент по п.4, которое включает LCVR, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
13. Антитело или его фрагмент по п.4, которое включает HCVR, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, и LCVR, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.
14. Антитело или его фрагмент по п.4, включающее гуманизованную легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:13.
15. Антитело или его фрагмент по п.4, включающее гуманизованную тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:16 или с последовательностью SEQ ID NO:16, в которой удален С-терминальный Lys.
16. Антитело или его фрагмент по п.4, включающее гуманизованную легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:13 и гуманизованную тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:16 или с последовательностью SEQ ID NO:16, в которой удален С-терминальный Lys.
17. Антитело или его фрагмент по п.16, в котором удален С-терминальный Lys константной области тяжелой цепи.
18. Антитело или его фрагмент по п.15, в котором удален С-терминальный Lys константной области тяжелой цепи.
19. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-18, где антитело представляет собой антитело изотипа IgG4.
20. Антитело или его фрагмент, способные специфически связываться с β -амилоидным белком, где указанное антитело или его фрагмент содержат (i) HCVR, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15, и (ii) LCVR, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.
21. Антитело или его фрагмент по п.20, в котором:
- (a) LCVR включает аминокислоту Lys или Gln в положении 45 по нумерации Kabat;
- или
- (b) LCVR включает аминокислоту Phe или Tyr в положении 87 по нумерации Kabat;
- или
- (c) LCVR включает аминокислоту Lys или Arg в положении 50 по нумерации Kabat;
- или
- (d) LCVR включает аминокислоту Asn или Ser в положении 53 по нумерации Kabat.
22. Антитело или его фрагмент по п.20, в котором:
- (a) HCVR включает аминокислоту Ser в положении 94 по нумерации Kabat;
- или
- (b) HCVR включает аминокислоту Leu в положении 47 по нумерации Kabat.
23. Антитело или его фрагмент, способные специфически связываться с β -амилоидным белком, содержащие HCVR, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15 и LCVR, включающую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:12.

24. Полипептид варибельной области легкой цепи для применения при получении антитела, способного специфически связываться с β -амилоидным белком, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

25. Полипептид варибельной области тяжелой цепи для применения при получении антитела, способного специфически связываться с β -амилоидным белком, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его фрагмент по любому из пп.1-23 в эффективном количестве, для лечения одного или нескольких симптомов амилоидоза.

27. Фармацевтическая композиция по п.26, где амилоидоз представляет собой болезнь Альцгеймера.

28. Тест-набор для выявления и диагностирования ассоциированных с амилоидами заболеваний и состояний, содержащий антитело или его фрагмент по любому из пп.1-23 и инструкцию по применению указанного антитела или его фрагмента.

29. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его фрагмент по любому из пп.1-23.

30. Экспрессионный вектор, содержащий по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты по п.29.

31. Клетка, продуцирующая антитело или его фрагмент по любому из пп.1-23, содержащая экспрессионный вектор по п.30.

32. Клетка по п.31, которая представляет собой клетку млекопитающего.

33. Фармацевтическая композиция для применения в качестве лекарственного средства для лечения или облегчения воздействий амилоидоза, содержащая эффективное количество антитела или его фрагмента по любому из пп.1-23, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или эксципиент.

34. Смесь для применения в качестве лекарственного средства для лечения или облегчения воздействий амилоидоза, содержащая антитело или его фрагмент по любому из пп.1-23, в терапевтически эффективном количестве и биологически активную субстанцию и/или фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель и/или эксципиент.

35. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-23 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или облегчения воздействий амилоидоза.

36. Применение по п.35, где амилоидоз представляет собой вторичный амилоидоз, связанный с возрастом амилоидоз, неврологические нарушения, болезнь Альцгеймера (AD), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа), комплекс деменции Гуама-Паркинсона, прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельдта-Якоба, болезнь Паркинсона, связанную с ВИЧ деменцию, ALS (амиотрофический боковой склероз), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли или дегенерацию желтого пятна.

37. Способ приготовления композиции по п.26 или 27, применяемой в способе лечения или облегчения воздействий амилоидоза, группы заболеваний или нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая заболевания, не ограниченные перечисленными, такими как неврологические нарушения, такие как

болезнь Альцгеймера (AD), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа); комплекс деменции Гуама-Паркинсона; также как и другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие, включая дегенерацию желтого пятна, включающий приготовление препарата антитела по любому из пп.1-22 в фармацевтически приемлемой форме.

38. Способ диагностирования амилоидоза или ассоциированного с амилоидом состояния у пациента *in vitro*, включающий:

(а) приведение в контакт образца, полученного от пациента, который содержит амилоидный белок, с антителом по любому из пп.1-23 в условиях, которые позволяют антителу связываться с амилоидным белком, и

(б) выявление антитела, связанного с белком; при этом присутствие или отсутствие антитела, связанного с амилоидным белком, свидетельствует о присутствии или отсутствии амилоидного белка в образце, или части организма, или области организма.

39. Способ определения степени загрузки амилоидогенными бляшками образца ткани и/или образца жидкости организма, *in vitro*, включающий:

а) оценку присутствия в образце амилоидного белка с помощью антитела по любому из пп.1-23;

б) определение количества антитела, связанного с белком; и

в) расчет загрузки бляшками образца ткани или образца жидкости организма.

40. Способ лечения или облегчения воздействий амилоидоза, включающий введение животному или человеку, подверженному амилоидозу, терапевтически эффективного антитела или его фрагмента по любому из пп.1-23.

41. Способ по п.40, где амилоидоз представляет собой болезнь Альцгеймера.

42. Способ по п.40, где амилоидоз представляет собой вторичный амилоидоз, связанный с возрастом амилоидоз, неврологические нарушения, болезнь Альцгеймера (AD), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа), комплекс деменции Гуама-Паркинсона, прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), диабет взрослых, старческий сердечный амилоидоз, эндокринные опухоли или дегенерацию желтого пятна.

43. Способ получения антитела или его фрагмента, способных специфически связываться с β -амилоидным белком, включающий получение антитела или его фрагмента из клетки по п.31 или 32.

44. Способ получения антитела или его фрагмента, способных специфически связываться с β -амилоидным белком, включающий экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты по п.29 или экспрессионного вектора по п.30.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> АЦ Иммуне СА

<120> Гуманизированное антитело

<130> M1967 EP S3

<160> 32

<170> PatentIn, версия 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> гуманизированная переменная область тяжелой цепи (CDR1) C2 HuVH AF
4

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> гуманизированная переменная область тяжелой цепи (CDR2) C2 HuVH AF
4

<400> 2

Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> гуманизированная переменная область тяжелой цепи (CDR3) C2 HuVH AF
4

<400> 3

Gly Asp Tyr
1

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> гуманизированная переменная область легкой цепи (CDR1) C2 HuVK 1
<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> гуманизованная переменная область легкой цепи (CDR2) C2 HuVK 1
 <400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> гуманизованная переменная область легкой цепи (CDR3) C2 HuVK 1
 <400> 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> эпитоп A β , область 2
 <400> 7

Val Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> эпитоп A β , область 1
 <400> 8

His Gln Lys Leu Val
 1 5

<210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа может обозначать Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe или Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa может обозначать Ala, Val, Leu, Ser или Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa может обозначать Glu или Asp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa может обозначать Glu или Asp

<400> 9

Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa может обозначать His, Asn, Gln Lys или Arg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa может обозначать Asn или Gln

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa может обозначать Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe или Ile

<400> 10

Xaa Xaa Lys Leu Xaa
 1 5

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa может обозначать His, Asn, Gln Lys или Arg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa может обозначать Asn или Gln

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa может обозначать Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe или Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa может обозначать Ala, Val, Leu, Ser или Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa может обозначать Glu или Asp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa может обозначать Glu или Asp

<400> 11

Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> искусственная гуманизированная переменная область легкой цепи C2
 HuVK 1

<400> 12

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 13
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность
 <220>

<223> искусственная гуманизированная легкая цепь C2
 <400> 13

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> искусственная гуманизированная константная область легкой цепи C2

<400> 14

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> искусственная гуманизированная переменная область тяжелой цепи C2
HuVH AF 4

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 16
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> искусственная гуманизированная тяжелая цепь C2

 <400> 16

 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45

 Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 115 120 125

 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140

 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160

 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175

 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 180 185 190

 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205

 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220

 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 275 280 285
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 305 310 315 320
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 340 345 350
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 385 390 395 400
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435
 <210> 17
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> С-область Igгамма-4-цепи, модифицированная
 <400> 17
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 325

<210> 18
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> гуманизированная переменная область тяжелой цепи (CDR2) C2 HuVH AF
 <400> 18

agcatcaata gtaatggtgg tagcacctat tatccagaca gtgtgaaggg c 51

<210> 19
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> гуманизированная переменная область тяжелой цепи (CDR3)
 <400> 19

ggtgactac 9

<210> 20
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> гуманизированная переменная область легкой цепи (CDR1) C2 HuVK 1
 <400> 20

agatctagtc agagccttgt atatagtaat ggagacacct atttacatt 49

<210> 21
 <211> 635
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> искусственная гуманизированная переменная область легкой цепи C2
 Hu VK 1

<400> 21

gatattgtga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctctggtga gcctgcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtffc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300

tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 22
 <211> 657
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> искусственная гуманизированная легкая цепь C2

<400> 22

```

gatattgtga tgaccsaatc tccactctcc ctgcctgtca ctctgggtga gcctgcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gaggcttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg      120
tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt      180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagggg cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttctct      300
tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaaagga ctgtggctgc accatctgtc      360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa      480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      540
agcagcaccs tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa      600
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt      657
    
```

<210> 23
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> искусственная гуманизированная константная область легкой цепи C2

<400> 23

```

aggactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct      60
ggaactgcct ctggtgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag      120
tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac      180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag      240
aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag      300
agcttcaaca ggggagagtg t      321
    
```

<210> 24
 <211> 798
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> искусственная гуманизированная переменная область тяжелой цепи C2
 HuVH AF

<400> 24

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct 120
 ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctca 336

<210> 25

<211> 1317

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> искусственная гуманизированная тяжелая цепь С2

<400> 25

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct 120
 ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc 360
 ttccccctgg cgccctgctc cagatcgacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 420
 gtcaaggact acttccccga accgggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480
 ggcgtgcaca ccttcccggc tgtectacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 540
 gtgaccgtgc cctccagcag cttgggacag aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 600
 cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt gagtccaaat atgggtcccc gtgtccccca 660
 tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca tcagtottoc tgttcccccc aaaacccaag 720
 gacactctca tgatctcccg gaccctgag gtcaagtgcg tgggtggtgga cgtgagccag 780
 gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggagggtgca taatgccaaag 840
 acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgtc 900
 ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc 960
 ccgtctccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacagggtg 1020
 tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgacctg 1080
 gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140
 aacaactaca agaccacgcc tcccgtctc gattccgacg gctccttctt cctctacagc 1200
 aggtaaccg tggacaagag cagggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1260
 catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa 1317

<210> 26
 <211> 981
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> искусственная гуманизированная константная область тяжелой цепи
 C2

<400> 26

```

gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccagatc gacctccgag      60
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg     120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca     180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc     240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc     300
aaatatggtc cccctgtgtcc cccatgcccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc     360
ttctgttcc ccccaaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg     420
tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat     480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac     540
cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag     600
tgcaaggtct ccaacaaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa     660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag     720
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag     780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt cctcgattcc     840
gacggctcct tcttctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg     900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc     960
ctctccctgt ctctgggtaa a                                             981
    
```

<210> 27
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 27

```

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1           5           10           15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20           25           30
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35           40           45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50           55           60
    
```

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 29
<211> 336
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 29

gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gaccccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcagggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctggggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttctc 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa 336

<210> 30
 <211> 417
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 30

 atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgettc cagcagtgat 60
 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttgcagat ctagtcagag ccttgtatat agtaatggag acacctatctt acattgggtac 180
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg 360
 acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta 417

<210> 31
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

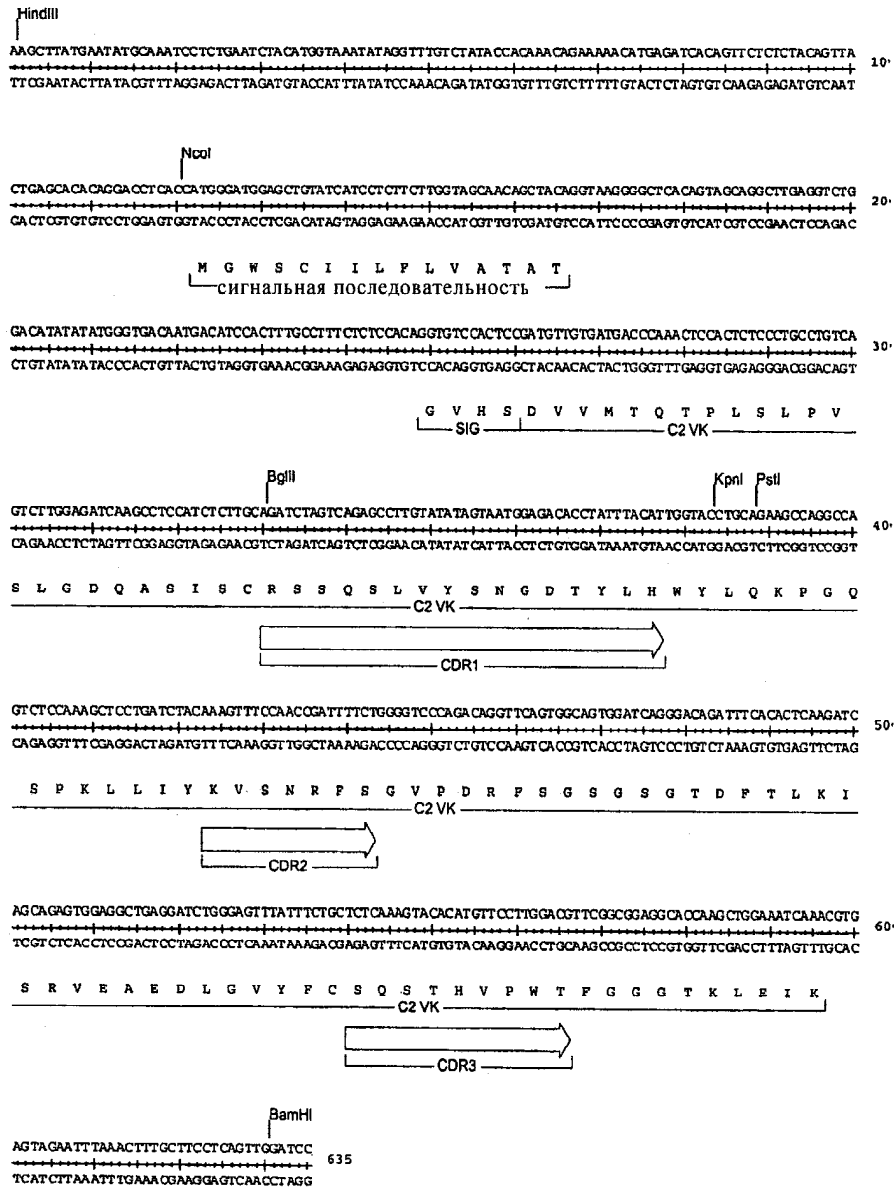
 <400> 31

 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tctca 336

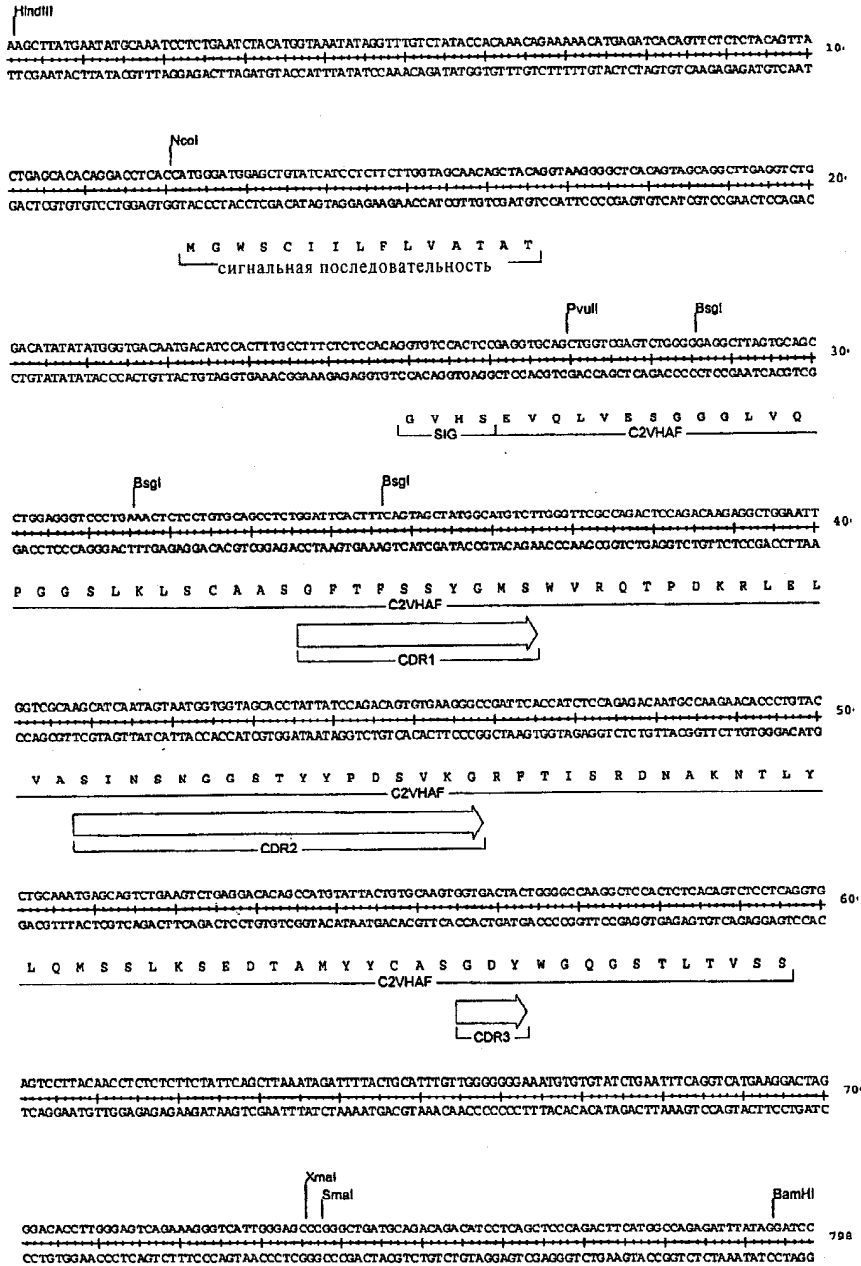
<210> 32
 <211> 408
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 32

 atgrasttsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttattt taaaagggtgt ccaatgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca 180
 gacaagaggc tggaattggt cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca 240
 gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tgggtgactac 360
 tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc 408



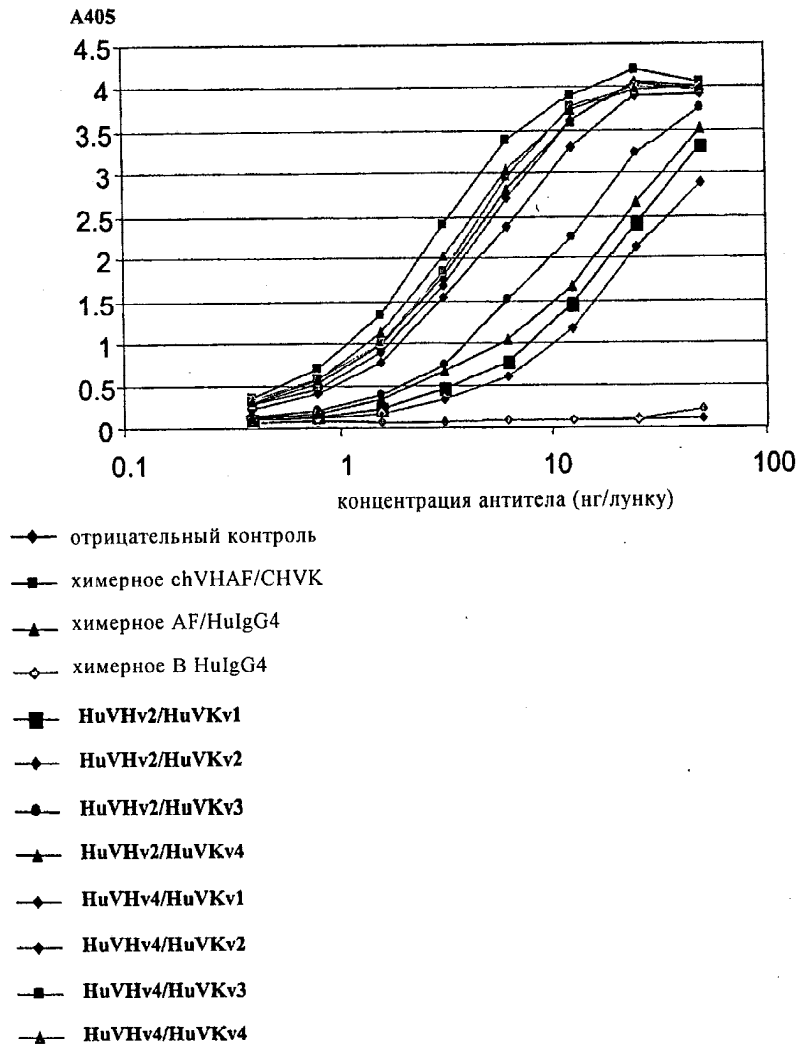
(пример 2)
Фиг. 1



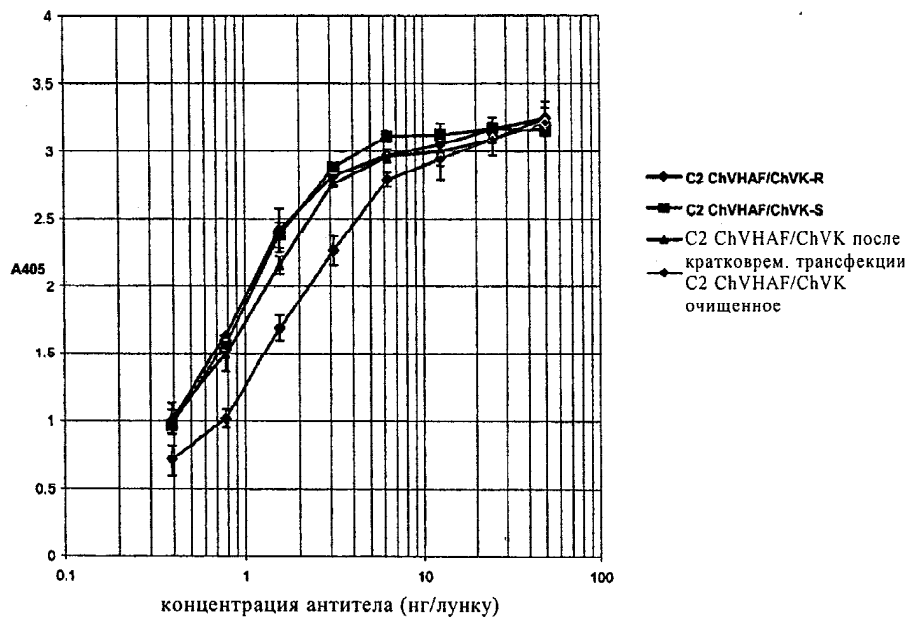
(пример 2)
Фиг. 2

	10	20	30
C2VHAF	E V Q L V E S G G G L V Q P	G G S L K L S C A A S G F T F S	
AF120466	E V K L V E S G G G L V K P	G G S L K L S C A A S G F T F S	
	40	50	60
C2VHAF	S Y G M S W V R Q T P D K R L E L V A S I N S N G G S T Y Y		
AF120466	S Y G M S W V R Q T P D K R L E W V A T I S G d S Y T Y Y		
	70	80	90
C2VHAF	P D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M S S L K S E D		
AF120466	P D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M S S L K S E D		
	100	110	
C2VHAF	T A M Y Y C A S G D Y W G Q G S T L T V S S		
AF120466	T A M Y Y C A R R		

(пример 5.2)
Фиг. 3



(пример 8)
Фиг. 4

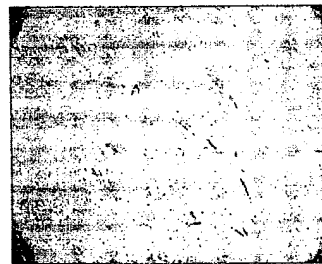
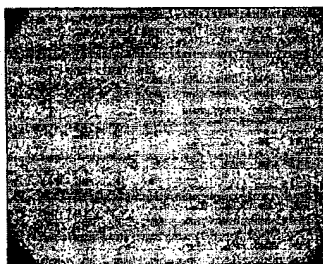


(пример 9)
Фиг. 5

В: антитело hC2

А: химерное антитело

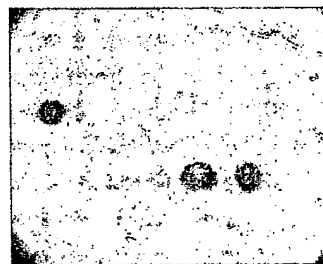
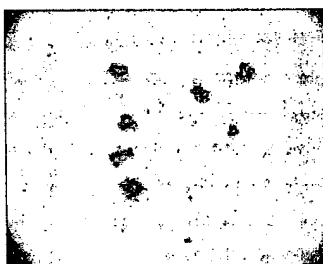
контрольный пациент



височная неокортикальная
область I, 40×

CA4 (область 4 аммонова
рога), 40×

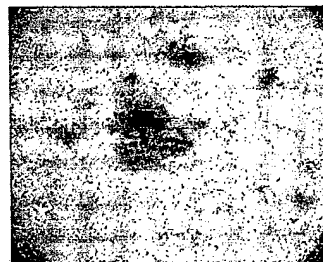
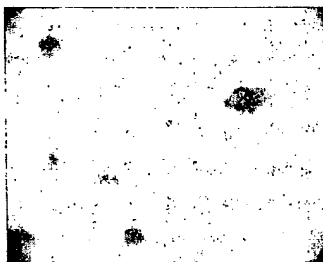
пациент с AD



височная неокортикальная
область I, 40×

височная неокортикальная
область I, 40×

преAD-пациент



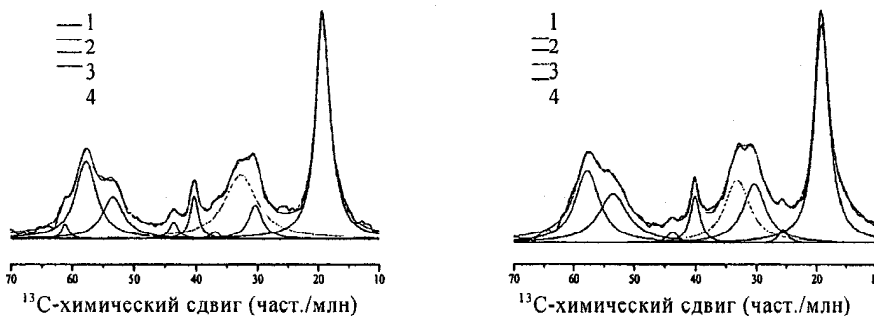
височная неокортикальная
область I, 40×

височная неокортикальная
область I, 40×

(пример 11)

Фиг. 6

А)



Б)

резонанс	ЗФР			мышинный С2		
	δ ISO (част./млн)	FWHM (Гц)	% от сумм. интенсивн.	δ ISO (част./млн)	FWHM (Гц)	% от сумм. интенсивн.
ValCβ-складка	32.60	479	81.7	33.09	366	53.5
ValCβ-пр.спираль	30.27	200	18.3	30.27	340	46.5

А) Сравнение ¹³C CPMAС-спектров и аппроксимирующих кривых для меченных U-¹³C Tyr и Val 12 волокон амилоида β₁₋₄₂, после инкубации с ЗФР (слева, контроль) или AC1-7-C2 (справа) в течение 24 ч и последующей лиофилизации. Аппроксимирующие кривые для двух конформаций Val 12 Cβ показаны зеленым цветом (бета-складчатая конформация) и синим (конформация в виде произвольной спирали). Пик при 33 част./млн соответствует бета-складчатой конформации волокон, а пик при 30 част./млн соответствует конформации в виде произвольной спирали.

Б) Сравнение параметров аппроксимирующих кривых для двух конформаций Val 12 Cβ. Полученные в результате аппроксимации химические сдвиги для двух конформаций довольно близки друг к другу, но суммарные интенсивности существенно различаются, это отражает снижение доли исходной бета-складчатой конформации примерно на 35% (1-(53,5/81,7)). Этот результат очень хорошо согласуется с данными, полученными на основе измерения флуоресценции.

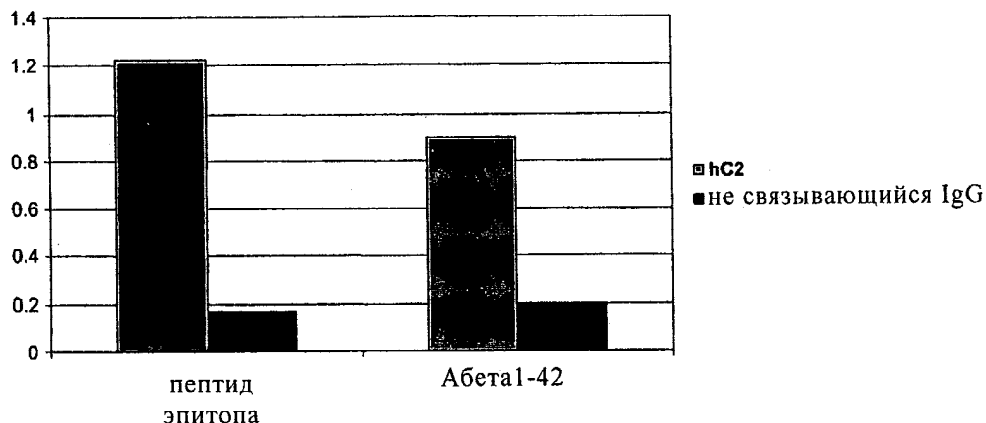
Обозначения на чертеже:

- 1- измеренный спектр;
- 2- сумма аппроксимирующих кривых;
- 3- аппроксимация для Val Cβ (β-складчатая конформация);
- 4- аппроксимация для Val Cβ (конформация в виде произвольной спирали)

(пример 12)

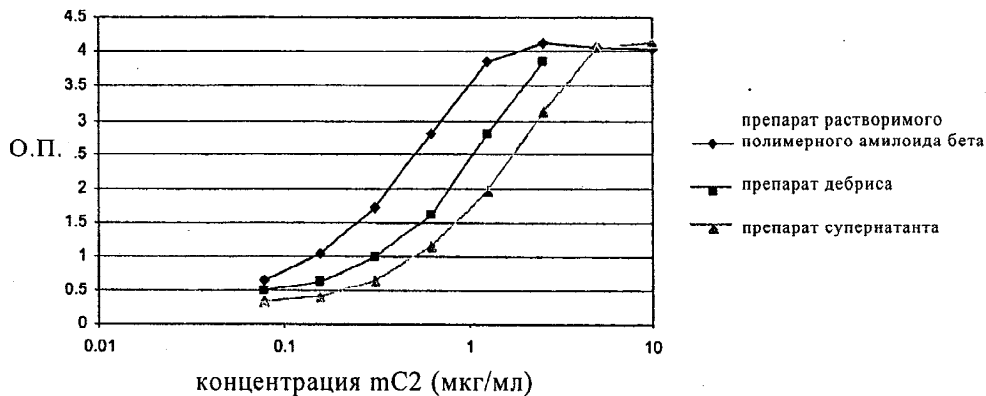
Фиг. 7

О.П. Аффинность к связыванию гуманизованного С2 по данным ELISA



(пример 12)

Фиг. 8



(пример 13)
Фиг. 9

		10	20	30																										
C2VK	D	V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK1	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK2	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK3	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK4	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
dpk15	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

		40	50	60																										
C2VK	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK1	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK2	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK3	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK4	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
dpk15	H	S	N	G	Y	N	Y	L	D	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	L	G	S	N	R	A
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

		70	80	90																										
C2VK	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V
C2HuVK1	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
C2HuVK2	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
C2HuVK3	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
C2HuVK4	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
dpk15	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

		100	110																			
C2VK	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
C2HuVK1	Y	Y	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
C2HuVK2	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
C2HuVK3	Y	Y	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
C2HuVK4	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
dpk15	Y	Y	C	M	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Фиг. 10

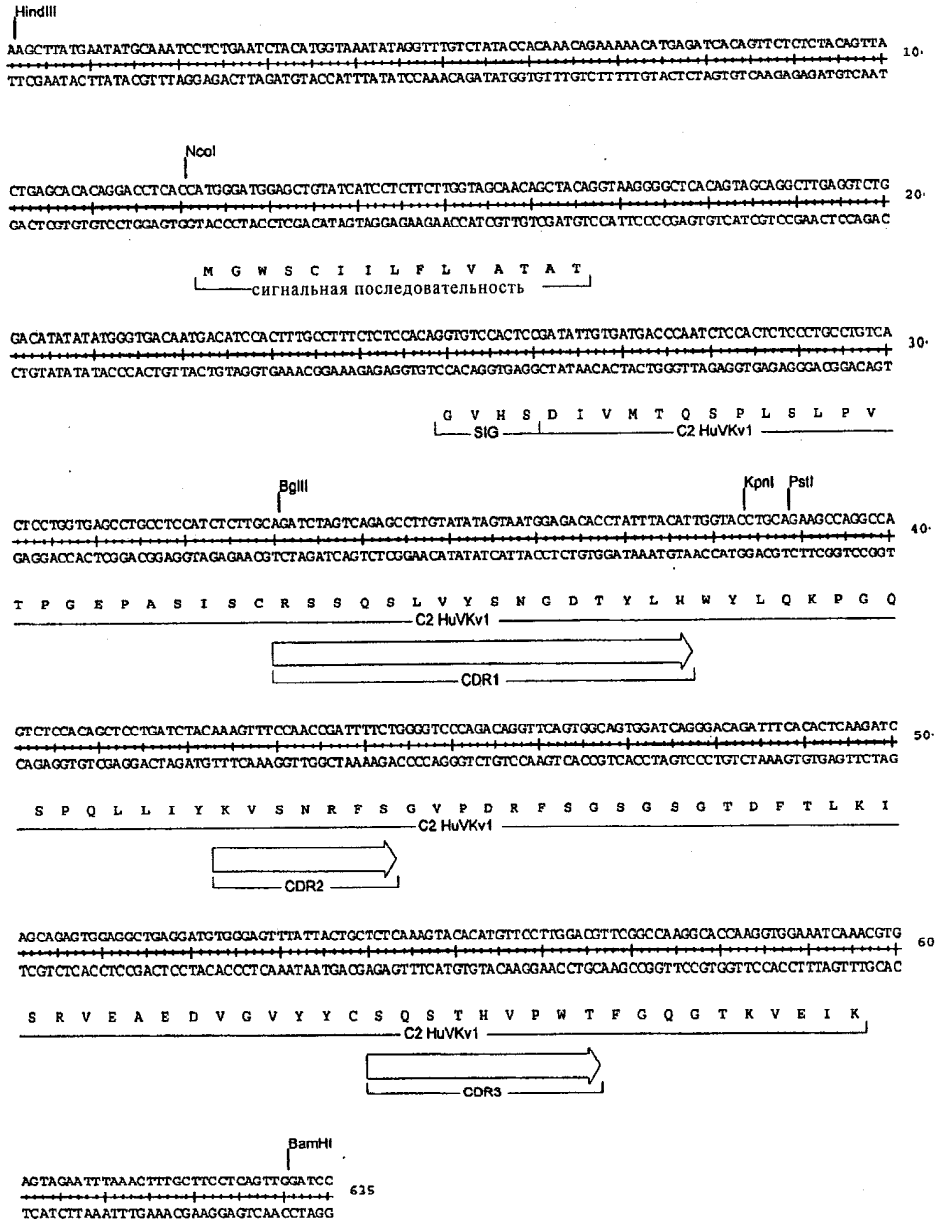
	10	20	30
C2VHAF	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S	G F T F S	
C2HuVHAF1	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
C2HuVHAF2	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
C2HuVHAF3	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
C2HuVHAF4	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
DP-54	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	40	50	60
C2VHAF	S Y G M S W V R Q T P D K R L E L V A S I N S N G G S T Y Y		
C2HuVHAF1	S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A S I N S N G G S T Y Y		
C2HuVHAF2	S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A S I N S N G G S T Y Y		
C2HuVHAF3	S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A S I N S N G G S T Y Y		
C2HuVHAF4	S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A S I N S N G G S T Y Y		
DP-54	S Y W M S W V R Q A P G K G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y		
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - - Y Y

	70	80	90
C2VHAF	P D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M S S L K S E D		
C2HuVHAF1	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
C2HuVHAF2	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
C2HuVHAF3	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
C2HuVHAF4	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
DP-54	V D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	100	110
C2VHAF	T A M Y Y C A S G D Y W G Q G S T L T V S S	
C2HuVHAF1	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF2	T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF3	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF4	T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S	
DP-54	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S	
HUJH6	- - - Y Y Y G M - D V W G Q G T T V T V S S	

Фиг. 11



Фиг. 12

BamHI BglII

GGATCCTGGCAGAGTCTCAGATGCTTCGAGCAACATTTGCTTCAAAAAATGAACCAACACATCCCTAAAGATCTCAGCCACTCCCATGTTTCAT 10C
CCTAGGACCGTCTCAGAGTGTCTACGAAGACTCTGTGTGTAACGAAAGTTTTTACTTGGTGTGTAGGATTTCTAGAGTCGGTGAAGGTTACAAAGTA

TTTATGTTACAGCAAAACATCAACAATTCCTACAGATCACCACCTGCATGTGATCAATAAAATAGTTTTTGCACAAATGGTACTTATGATAATCATC 20C
AAATACAATGTCGTTGTAGTGTGTAGTAAGGATGCTAGTGGTGAAGTACACTAGTTATTTTATCAAAAACGTTGTACCATGAATACTATTAGTAG

TTTTATGTTTACAAACTGCTTTACAATAGTATTCGGTTGCACCTGTCATATTAGATTCCAAATAGCTCACTTAGGAACATAAGTCCCTCGAACAG 30C
AAAATAACAATGTTTATGACGAAATGTTATCAATAAGCCAAGTGCACAAAGTATAATCTAAAGGTAAATCGAGTGAATCCTTGTATTCAGGGAGCTTCTC

CTCAGTCACTTTTTCAATTCCTGTTCTATCCCTACACTCTCTTCCCTTTGCAGACGACTATCTCCTACACTGAAACAGGAAAGCTAGCTTTTTTTTTTC 40C
GAGTCAGTAGAAAAAGTAGGACAAAGATAGGGGATGTAGAGAAAGGAAACGCTGCTGTAGAGGATGTGACTTGTCTTTCGATCGAAAAAAGAAAG

AGTGTATTTAATTTTCAATATCCTCTCATCAATGTATTTAAATAACAAAAGCTCAACCAAAAGAAAGAAATATGTAATCTTTCCAGAGTAAAAAT 50C
TCACGATAAAATAAAGTATAGAGAGTAGTTTACATAAATTTATGTTTTCGAGTGGTTTTCTTTCTTTATACATTAAGAAAGTCTCAATTTTTTA

CACACCCATGACCTGGCCAGTGGGCTTGTCAATTCACCTTGAATTTGGCATTAAATACCATTAGGTATATTAACGTATTTAAAAAAGATATATT 60C
GTGTGGGTACTGGACCGGTACTCCGCACTAGTTAAGTGAACCTAAACCCGTAATTTATGGTAAATCCATATAATGACTAAAAATTTATCTATATAA

CGTGACCATGTTTTAACTTTCAAAAATGTAGCTGCCAGTGTGATTTTATTCAGTGTACAAAATATCTAAACCTATAGCAATGTGATTAATAAAAA 70C
GCACCTGTACAAAATGAAAGTTTTACATCGACGGTCCACACATAAATAAAGTCAACATGTTTTATAGATTGGATATCGTTACACTAATATTTTTT

CTTAAACATATTTCCAGTACCTTAATTCGTGATAGGAAAATTTAATCGAGTATTTAATTTCAATACTCTAAAATAGTTTAAATGTTGTCTATG 80C
GAAATGTATAAAAGTCAATGGAATTAAGCACTATCCTTTAAAATTAGACTCATAAAATTAAGTATTAGAGATTTTCAAAATTAAGCAAGTAACT

PvuII

TGTGCTGTGCTTTACCCAGCTGATCTCAAAGTGATATTAAGGAGATTAATTTGGTCTGCAACAACCTGATAGGACTATTTAGGGCTTTTTAAAG 90C
ACAACGACAGCAAAATGGGGTCGACTAGAGTTTTCACTATAAATTCCTCTAATAAAAACGAGAGTGTGTGAACACTCTCTGATAAAATCCCGGAAAAATTC

CTCTATTAACCTAACTTACAACGATTCAAAATGTTTTAAACTATTTCAAAATGATTTAGAGCCCTTTGAAAACCTTTTAAACACTTTTTAAACTCT 10C
GAGATAATTTGATTGAATGTGCTAAGTTTGCACAAAATTTGATAAAGTTTTACTAAAATCTCGGAAAACCTTTGAGAAAATTTGTGAAAAATTTGAGA

EcoRI

ATTAACAACTAATAAGATAACTGAAATAATTTCAATGTCAAATACATTAAGTGTAAATGTTAAATGCGAGATGAAAAATGTAAGCTATCAAGAAATTC 11C
TAAATTTGATTAATCTATTGAACCTTATTAATAACTACACTTATGTAATGACAAATTAACAAATTAACGGTCTACTTTTTACATTTCCATAGTCTTAAAG

NcoI

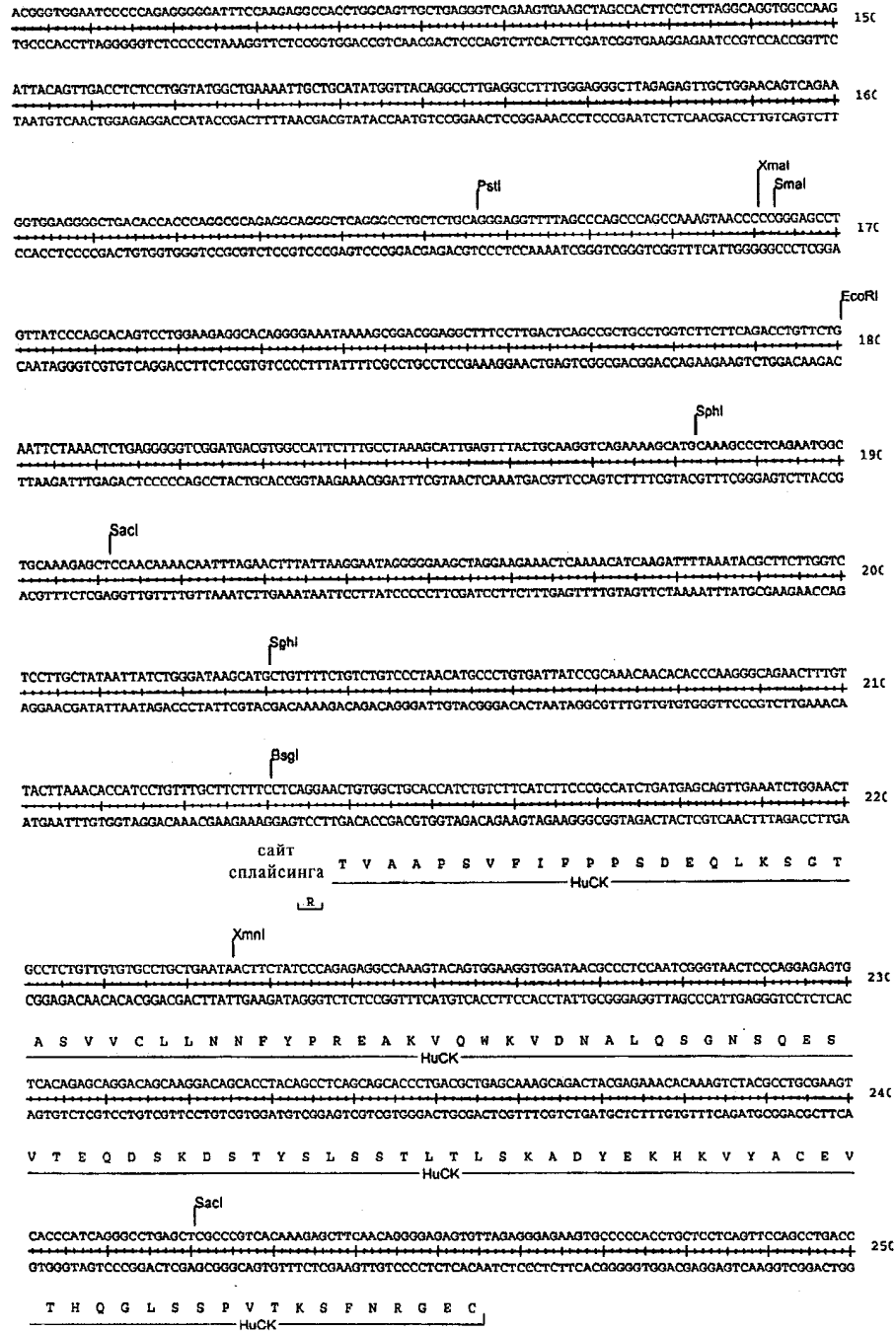
ACCCAGATAGGACTATCTCATAGCATGTTTTCCCTGCTTATTTCCAGTGAATCAGATTAATTTGCTACCATGGTATTTTATACAATATCTGAAAAA 12C
TGGGCTATCTCCTCATAGAGATCTGTACAAAAGGGAGCAATAAAGGTCACTAGTGTAAATAAAGCATGGTACCAATAAATAATGTTAATAGACTTTTT

AATAGTATGAAGATTAAGAGAGAAATAATTAACAATAAGAGATTCAGTCTTTCATGTTGAACCTGCTGGTTAACAGTGAAGTATGTTTTAAAAAA 13C
TTAATCAATACTTCTAATTTCTCTCTTTATAATTTGATTTCTCTAAGTCAAGAAAGTACAACCTGACGAAACCAATTTGCTCACTCAATCAAAATTTTT

PvuII

AAAAAAAATATTTCTGTTATCAGTGAATCTCCCTATCTGTGACTTCTCCGACAAAAGATCTTATTTTACATTTAACTACTGCTCCCAACCA 14C
TTTTTTTGAATAAGACAATAGTGCAGTGAAGAGGATAGACAACTGAAGAGGTCCTTTTCTAAGAATAAAATGAAAAATGATGACGAGAGGGTGGGT

Фиг. 13-1



Фиг. 13-2

CCTCCCATCTTTGGCCTCTGACCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATGGGGTCTCCAGCTCATCTTTCACCTCAACCCCTCCTCCTCTGG
 GGGAGGTAGGAAACCGGAGACTGGGAAAAGGTGTCCCTGGATGGGATAACGCCAGGAGGTCAGTAGAAAAGTGGAGTGGGGGAGGAGGAAACC 26C
 CTTAATATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAGTGAATCTTGCACCTGTGGTTCTCTCTTTCCTCATTTAATAAATATATCTGTGTTT
 GAAATTAATACGATTACAACCTCCTCTTACTTATTTATTTCACTTAGAAAACGTGGACACCAAGAGAGAAAGGAGTAAATTTAATAATAGACAAACAAA 27C
 TACCAACTACTCAATTTCTTTATAAGGGACTAAAATATGTAGTCACTCTAAGGCGCATAACCAATTTATAAAAATCATCCTTCATCTATTTTACCCTATC 28C
 ATGGTTGATGAGTTAAGAGAAATTTCCCTGATTTATACATCAGTAGGATTCGCGTATTTGGTAAATTTTTTAGTAGGAAGTAAGATAAAAATGGGATAG
 ATCCTCTGCAAGACAGTCTCCCTCAAACCCACAAGCCTTCTGTCTCACAGTCCCTGGGCCATGGTAGGAGAGACTTGCCTCTGTGTTTCCCTCCT 29C
 TAGGAGACGTCTGTACAGGAGGAGTTGGGTGTTGGAAGACAGGAGTGTACAGGGACCCGTAACCATCTCTCTGAACGAAGGAACAAAAGGGAGGA
 CAGCAAGCCCTCATAGTCTTTTAAAGGGTGACAGGCTTACAGTCAATATCCTTTGATCAATTCCTGGAATCAACCAAGCAAAATTTTCAAAAG 30C
 GTCTTCGGAGTATCAGGAAAATTTCCACTGTCCAGAATGTCAAGTATAGGAAAACCTAAGTTAAGGGACTCTAGTTGTTTGGTTAAAAGTTTTC
 AAGAAACCTGCTATAAGAGAAATCAATCATTGCAACATGATATAAAAATAACACACAATAAAGCAATTAATAAACAACAATAGGGAAATGTTAAGT 31C
 TTCTTTGGACGATTTCTCTTAGTAGTAACGTTGACTATATTTATTTGTTGTTTATTTGTTAATTTATTTGTTTGTATCCCTTACAAAATCA
 TCATCATGCTACTTAGACTTAAAGGATGTCATGCCTTATTTACATTTTAAACAGGTAAGGAGACTCTGTCTGCCAAGGGCCGATTTAGTACTTT 32C
 AGTAGTACCAATGAATCTGAATACCTTACAGTACGGAATAAATGTAATAAATTTGTCCATGACTCCCTGAGGACAGCGTTCCCGGCATAACTCATGAAA
 CCACAACTAATTTAATCCACACTATACTGTGAGATTAATAAATTCATTAATAATGTCAAAGGTTCTATAAAGCTGAGAGACAATAATATCTATAAC 33C
 GGTGTTGGATTAATTAGGTGTGATATGACACTCAATTTTGTAGTAAATTTACAACGTTTCCAGATATTCGACTCTGTGTTATATAAGATATGG
 TCAGCAATCCCACTTCTAGATGACTGAGTGTCCCAACCCACCAAAAACTATGCAAGAATGTTCAAAAGCAGCTTTATTTACAAAAGCCAAAAATGGAAA 34C
 AGTCGTTAGGGTGAAGATCTACTGACTCACAGGGTGGTGGTTTTTGTATACGTTCTTACAAGTTTCGTCGAAATAAATGTTTCGGTTTTTAAACCTTT
 TAGCCCGATGTTCCAACAATAGAATGAGTTATTAACCTGTGGTATGTTTATACATTAGAATACCCAATGAGGAGAAATTAACAAGCTACAATACTATAC 35C
 ATCGGGCTAACAGGTTGTTACTCAATAATTTGACACCATACAAAATATGTAATCTTATGGGTTACTCCTCTAATGTTGATGTTGATATGGATG
 TCACACAGATGATCTCATAAAAATAATGTTACATAAGAGAAACTCAATGCAAAAGATATGTTCTGTATGTTTTCATCCATATAAAGTTCAAAAACAGGT 36C
 AGTGTGCTACTTAGAGTATTTTATACAAATGTAATCTCTTTGAGTACGTTTCTATACAGACATACAAAAGTAGGTATTTCAAGTTTGTCTCA
 AAAATAAAGTTAGAAAATTTGGATGAAAATTAATCTTAGCTGGGGTGGCCAGTACTGCTGGGAGAAGCAAGAAGGGGCTCTGGGGTCTTTGGTAA 37C
 TTTTATTTCAATCTTAAACCTACTTTAATGAGAATCAACCCCAACCCGCTCAATCAGGACCCCTCTCTGTTCTTCCCGAAGACCACAGAACCATT
 TGTCTGTCTCGTGTGGGTGTGCAAGTTATGATCTGTGCACTGTTCTGTATACACATTATGCTTCAAAATAACTTACATAAAGAACATCTTATACC 38C
 ACAAGCAAGGAGCACACCCCAACGTCATACTAGACAGTGAACAAGACATATGTTAATACGAAGTTTATTTGAAGTATTTCTGTGAGATATGG
 CAGTTAATAGATAGAAGAGAAATAAGTAATAGGTCAGACCATGCACTGGTAAGTGGGGGGCCCTGGGATCAAAATAGCTACCTGCCTAATCTGCCCCTC 39C
 GTCAATATCTATCTCTCTTATTCATTATCCAGTCTGTACGTGACCATTCACCCCCCGGACCTAGTTTATCGATGGACGATTAGGACGGGAG

Фиг. 13-3

TTGAGCCCTGAATGAGTCTGCCTCCAGGGCTCAAGGTGCTCAACAAAAACAAGGCTGCTATTTCTGGCATCTGGCCCTGTTGGCTAGCTAGGA 40C
AACTCGGACTTACTCAGACGGAAGTCCCGAGTTCACGAGTGTGTTTGTTCGAGACGATAAAAGGACCGTAGACACGGCAAAAACCGATCGATCCT

GCACACATACATAGAAATTAATGAAACAGACCTTCAGCAAGGGACAGAGGACAGAAATTAACCTGGCCAGACACTGGAAAACCAATGTATGAACACTCA 41C
CGTGTGTATGTATCTTAAATTAATTTGCTGGAAGTCGTTCCCTGTCCTGCTTAATGGAAAGGGCTGTGACCTTGGGTACACTCTGTGAGT

CATGTTGGGAAGGGGAAGGCACATGTAATGAGGACTCTCTCATCTATGGGGCACTTGGCCCTGCCCCTCTCAGCTACTCATCCATCCAACAC 42C
GTACAAACCTTCCCCTTCCCGTACATTTACTCCTGAGAAGGATAGATACCCCGTGAGACCGGACCGGGAGAGTGTGATGATAGGTAGGTTGTG

XmnI

ACCTTCTAAGTACCTCTCTCGCTACACTCTGAAGGGTTCAGGAGTAACTAACACAGCATCCCTTCCCTCAAATGACTGACCATCCCTTTGCTCTGC 43C
TGGAAAGATTCTAGGAGAGAGCGGATGTGAGACTTCCCAAGTCTCATTTGATGTGTCTAGGGAAGGGAGTTTACTGACTGGTAGGAAAACGGAGG

TTGTTTTTCTTCCAGTCACTACTGGAAAGTGGGAAGGACAGTCAAGAAAACTACATAAGGAAGCACCTTGGCCCTCTGCCTCTGAGAAATGTG 44C
AAACAAAAAGAAAGTCACTGACCCCTTCCCTGTCAGTACCTTTTGATGATTTCCCTGTTGAAACGGGAAGACGGAGAATCTTACAAC

ATGAGTATCAAATCTTCAAACCTTTGGAGGTTGAGTAGGGGTGAGACTCAGTAAATGTCCTTCCAATGACATGAACTTGTCTACTCATCCCTGGGGCC 45C
TACTCATAGTTTGAAGGTTGAAACCTCAAACCTCATCCCACTCTGAGTCAATACAGGAAGGTTACTGTACTTGAACGAGTGTAGTGGGACCCCGG

EcoRI

AAATGAACAATCAAGGCAGGCATAATCCAGTTATGAAATCAAACCTTCTCTCAGAAGATAACTCTGAAGGGAAACCCACCATAACCTAAGCAAG 46C
TTTAACTTGTAGTTCCGTCGATTAAGTCAATACCTAAAGTTTGAAGAAAGATCTTCTATTTGAGACTTCCCTTGGTGGTATGGATTCGCTC

PstI

TGAAGACAGGTGCTCAGGTGGAATGTGTCTTCAAAAAGGTATGCTCAACTCCTTGTCTTGGTACTCATAAATGGGTACATAAATGTGACTTTAT 47C
ACTTCTGTCCACGATCCACTTAAACACAGGAAGTTTTCATACGAGTTGAGGAAACGAGAACCATGAGTATTTACCCAGTGTATTTACACTGAAATAA

TGAAATAGCGTCTTGCAGAGTAACTAAGTCAAAATAGTCTCAACTCCTTGTCTTGGTACTCATAAATGGGTACATAAATGTGACTTTAT 48C
ACCTTATCCCAAGGATCCACTTAAACACAGGAAGTTTTCATACGAGTTGAGGAAACGAGAACCATGAGTATTTACCCAGTGTATTTACACTGAAATAA

XbaI

GGATATAAAGGGTATAGCTACTCTAGAAAATAGTTGTCAAGTTTCTTGAAAAATAAACAAGACACCTACCATATGACCCAGGAATGTACTCCTTG 49C
CCTTATATTTCCCATATGATGAGACTTTTATCAACAGTCAAGAACTTTTGTATTGTTTCTGTGGATGTATACTGGGCTTAAACATGAGGAAC

GGAAATTAACCCAGGAATAAAAACTTATGTCCACACAGAACCCATACATGATTTGTCCACAGCAGCTTATTTGTTGTAGCCAAAGCTACAAAGAGCCA 50C
CCTTAAATGGGGTCCCTTATTTGAAATACAGGTGTGTCTTGGGTATGACTAACAGTGTCTGTGAAATAAACAACATCGGTTTGTATCTTCTCGGT

ACCCATCCCTCAATAGGCACTAGCCTAACAAATGTAAATATATCCATGCCATAGAATGCTATGAGGCAATAAAAGGAACGAAGTGTGATACAGAGAA 51C
TGGTAGGGAGTTATCCGTTGATCGGATTTAACATATATAGGTACGGTATCTTAGATATCCGTTATTTTCTGTCTTCAACAATAGTCTCTT

CTGGAGTATCTGAAGGACTTCTACTGAGTGA AAAAGCCAATCTGAAAGGTCACATACCATGTGATTCCTTTTATGTAACATTTGTAAGTGAACA 52C
GACCTCACTAAGACTTCTGAAAGATGACTCACTTTTTCGTTAGACTTCCCAAGTGTATGGTACACTAAGGAAATAACATTTGTAACAATCTCACTGTT

XmnI

AAATATAGGATAGAGAACAGATTCGTTGCCAGGGTTAGGGTGGTGGAGAAAGAGTAGGCGAAACTATAAAGGGAGATCTTTGTGATCATGGGA 53C
TTAATATCCCTATCTTGTCTAAGACCAACGGTCCCAATCCCAACCTCTTCTTCTCATCCGCTTGTATTTCCCTTAGAACAACACTAGTACCCT

XbaI

TAAATCTGTATCTGATTCAGTGGTAGTTGCAAGCATCTAGACATGTGATAAATGACATAGAACTGTACACACTTATTTATCAATGCAAAATCTTG 54C
ATTTAGACATAGAACTAACGTCACCATCAACGTCGGTAGTCTGTACACTATTTTACTGTATCTTGCATGTGAAATAAATAGTTACAGTTTAAGAAC

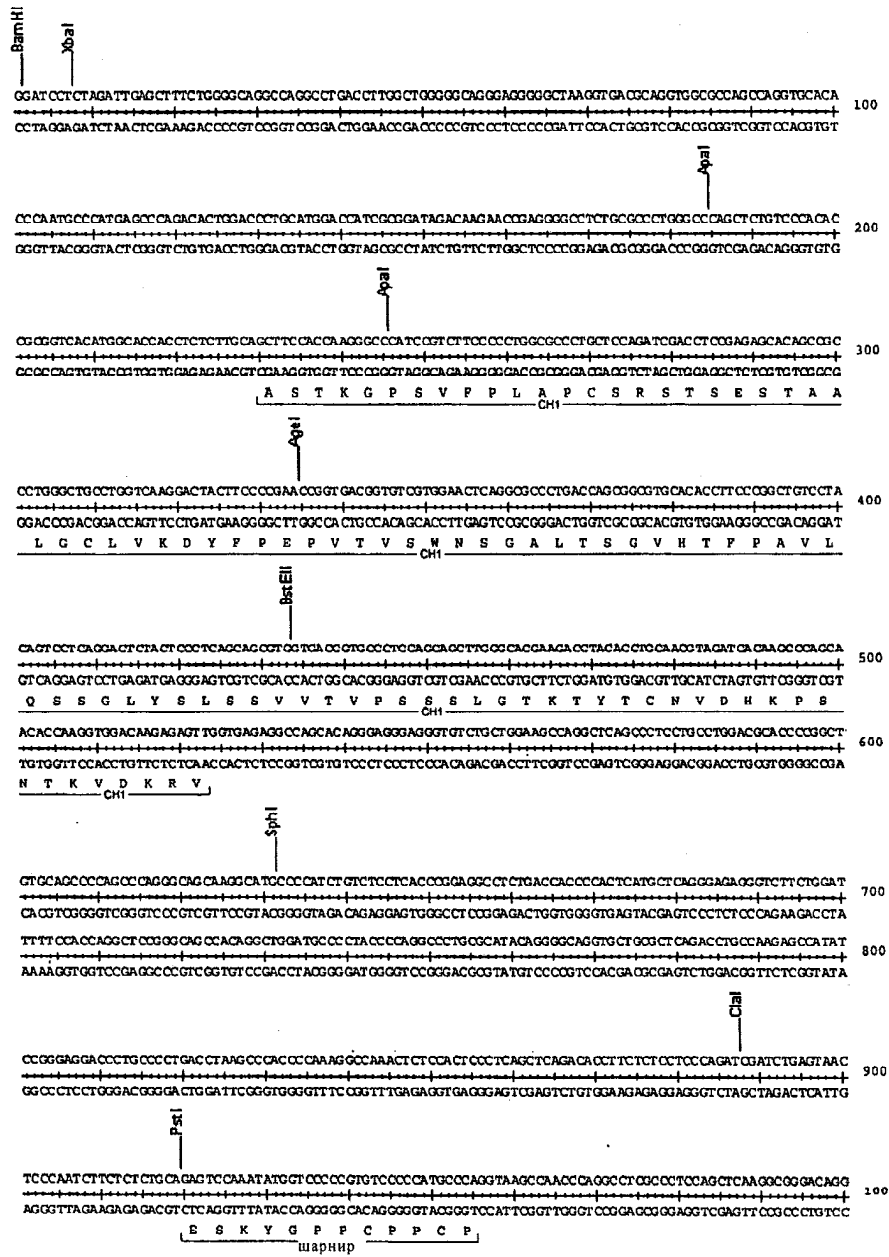
BglI

GTTTAAATCTGACTGTAATTAAGTAAGTAACCAACAGGAGAACTGGTGCAGGACATCAGACCTCTGTGCTTATATCTGTCTTTGCTACT 55C
CAAAAATATAGCATGACATTAATGCATCTTCAITGGTTGTCCTCTTGAACCACTCTGTGTAGTCTGGAGACAGAAATAAGGACGAAACGATGA

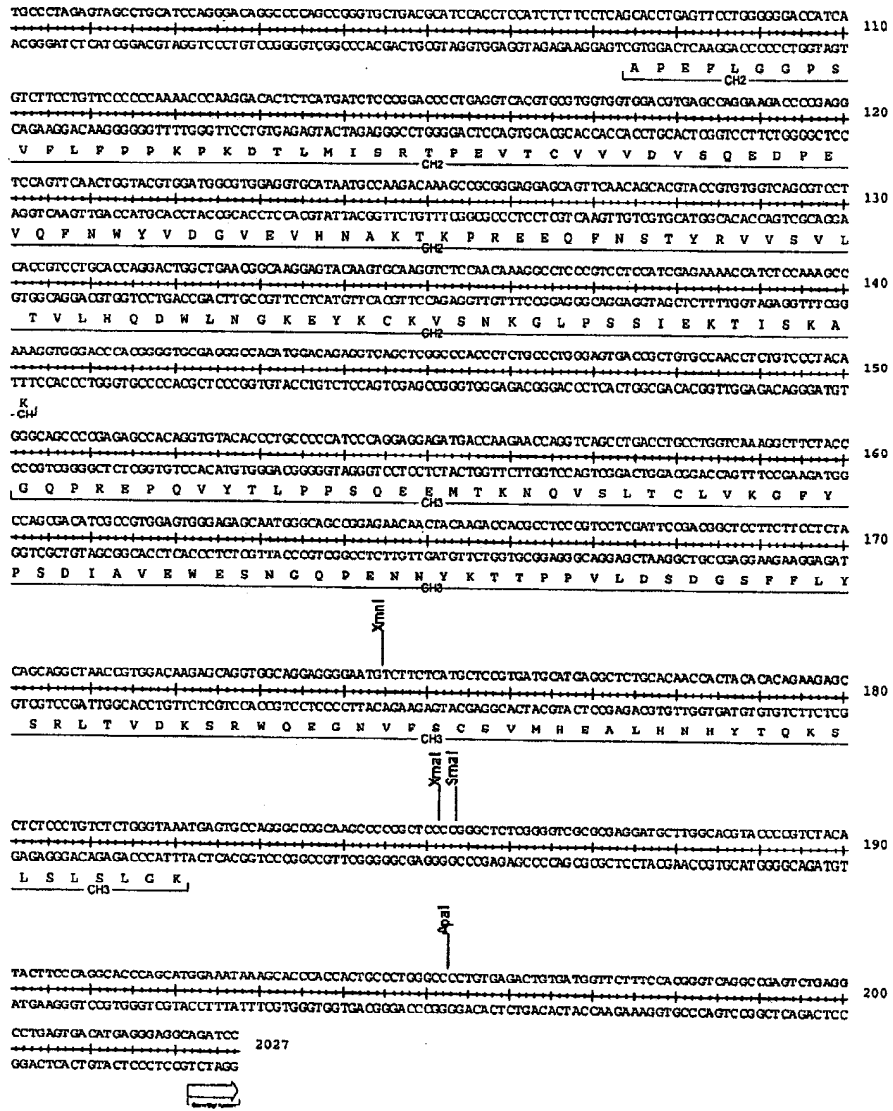
TTCTGTGAATCTATAATTTCCAAATAATTTTTTAACTTTTTTTTATGCTGGATCG 5561
AAGACACTTAGATATTAATAAGGTTTATTAATAAATTTGAAAAAATAACGACCTAGC

Фиг. 13-4

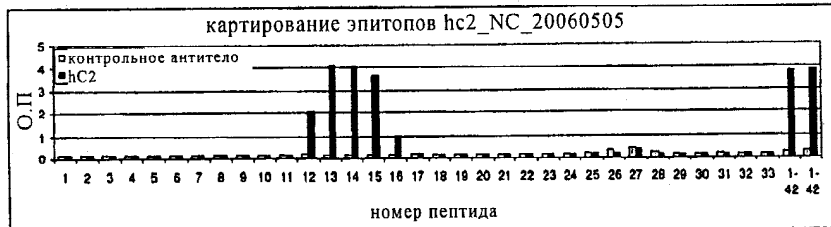
Фиг. 13-5



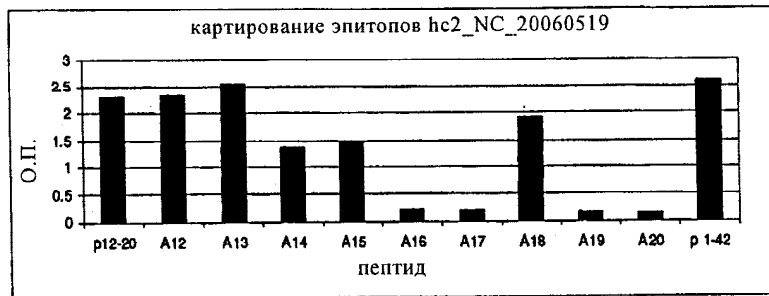
Фиг. 14-1



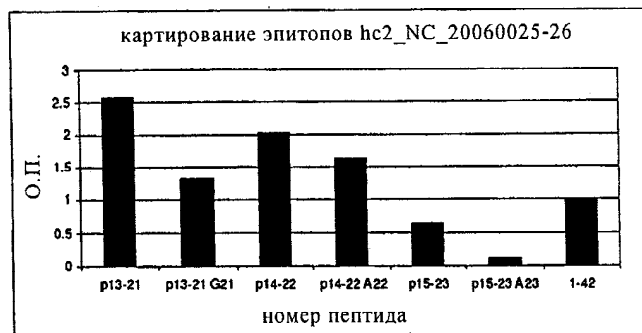
Фиг. 14-2



hc2 связывается с пептидами 12, 13, 14, 15 и 16 из пептидной библиотеки $A\beta_{1-42}$. Связывание hc2 с перекрывающимися пептидами $A\beta_{1-42}$ анализировали с помощью ELISA. Связывание с полным $A\beta_{1-42}$ и связывание с несвязывающимся химерным антителом (контрольное антитело) использовали в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно. Номер пептида соответствует номеру аминокислоты в последовательности $A\beta_{1-42}$, с которой начинается пептид. Результаты выражены в виде значений О.П.

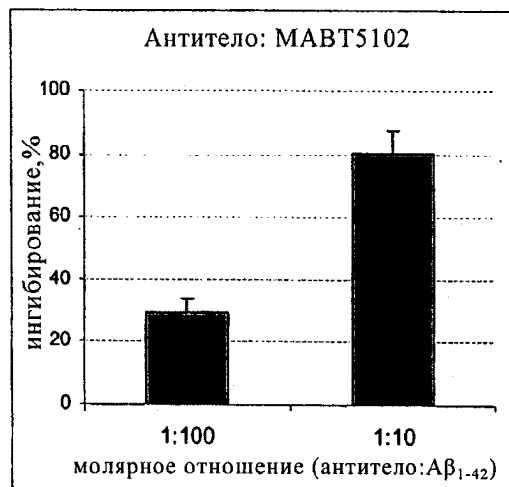


Связывание hc2 с $A\beta_{12-20}$ полностью зависит от ак 16, 17, 19 и 20 и частично зависит от ак 14, 15 и 18. Связывание hc2 с $A\beta_{12-20}$ и с замещенным аланином $A\beta_{12-20}$ анализировали с помощью ELISA. Связывание с полным $A\beta_{1-42}$ использовали в качестве положительного контроля. Номер соответствует номеру ак, которая замещена аланином. Результаты выражены в виде значений О.П.

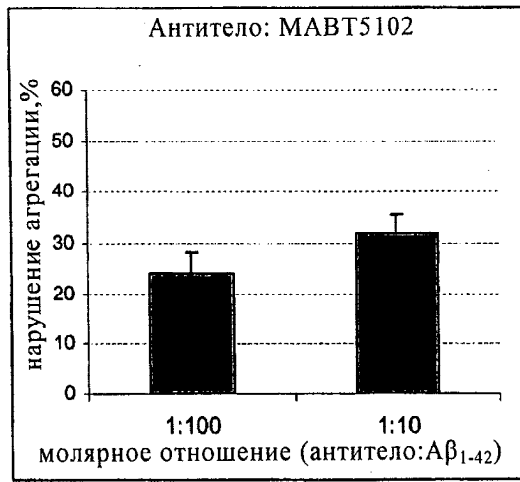


Связывание hc2 с $A\beta_{15-23}$ зависит от ак 23 и частично зависит от ак 21 и в небольшой степени зависит от ак 22. Связывание hc2 с $A\beta_{13-21}$, $A\beta_{14-22}$ или $A\beta_{15-23}$ и с $A\beta_{13-21G21}$, $A\beta_{14-22A22}$ или $A\beta_{15-23A23}$ анализировали с помощью ELISA. Связывание с полным $A\beta_{1-42}$ использовали в качестве положительного контроля. Результаты выражены в виде значений О.П.

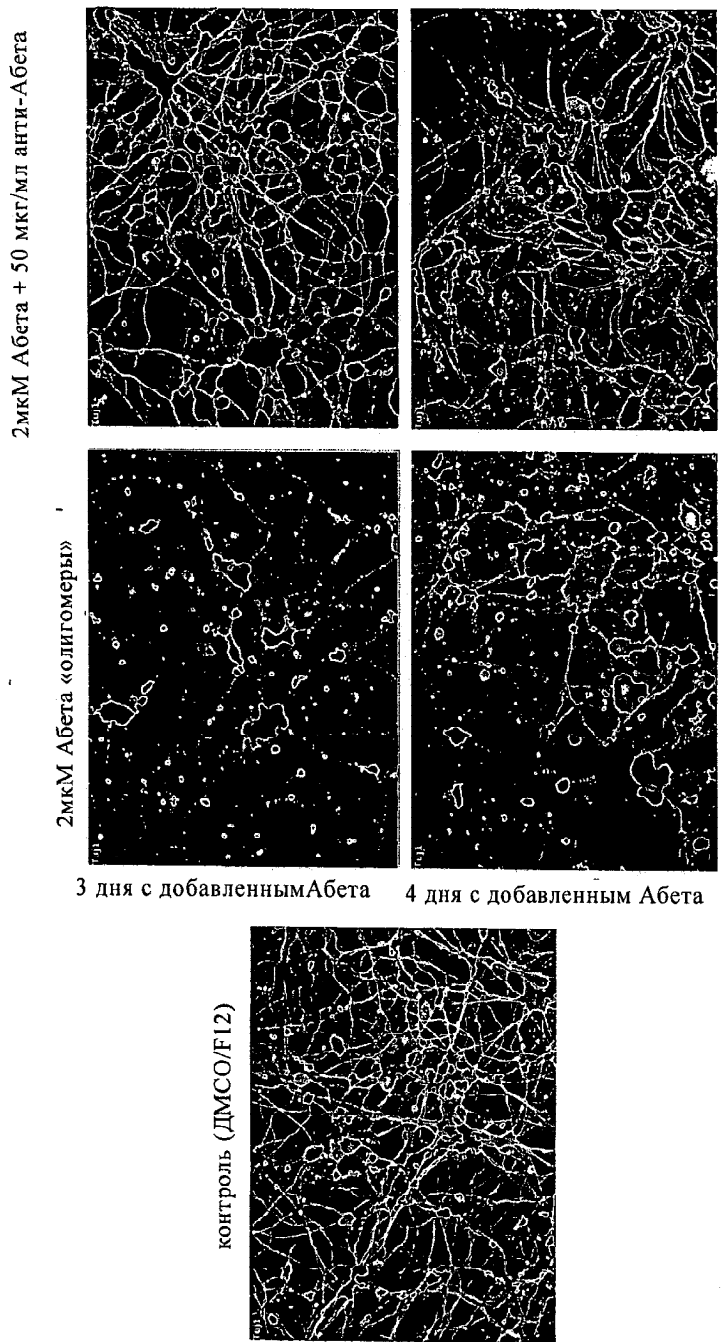
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18