

Дана заявка претендує на ефект попередньої заявки №60/251,892 на патент США (поданої 6 грудня 2000р.) під назвою «Гуманізовані антитіла, що розпізнають бета-амілоїдний пептид». Зазначена заявка включена тут в усій її повноті шляхом посилання.

Хвороба Альцгеймера (AD: Alzheimer's disease) являє собою прогресуючу хворобу, наслідком якої стає старече недоумство [Selkoe, TINS 16:403 (1993); Hardy et al., WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53:438 (1994); Duff et al., Nature 373:476 (1995); Games et al., Nature 373:523 (1995)]. У загальному випадку її поділяють на дві категорії: пізнього виникнення, що виникає у похилому віці (65 і більше років) і раннього виникнення, що починає розвиватися задовго до періоду старості (тобто між 35 і 60 роками). Обидва ці типи хвороби мають однакову патологію, але аномалії тяжіють до більш серйозних і поширених у тих випадках, що починаються у більш ранньому віці. Дана хвороба характеризується принаймні двома типами уражень мозку - нейрофібрилярними клубками і сенільними бляшками. Нейрофібрилярні клубки є внутрішньоклітинними відкладеннями зв'язаного з мікротрубочками тау-білка, що складаються з двох ниток, звитих одна з одною у парах. Сенільні (тобто амілоїдні) бляшки являють собою ділянки дезорганізованого нейропіла поперечним розміром до 150мкм із зовнішньоклітинними амілоїдними відкладеннями в центрі, які можна спостерігати під мікроскопом на зрізах мозкової тканини. Накопичення амілоїдних бляшок у мозку пов'язується також із синдромом Дауна та іншими когнітивними розладами.

Головною складовою бляшок є пептид, відомий під назвою Аβ або β-амілоїдного пептиду. Пептид Аβ є 4kDa внутрішнім фрагментом із 39-43 амінокислот більшого за розмірами трансмембранного глікопротеїду, що зветься амілоїдним протеїном-попередником (APP: amyloid precursor protein). Через протеолітичну переробку APP різноманітними секреторними ферментами пептид Аβ спочатку був виявлений як у короткій формі завдовжки 40 амінокислот, так і в довгій формі, що складається із 42-43 амінокислот. Частина гідрофобного трансмембранного домена APP була знайдена на карбоксильному кінці Аβ і, таким чином, може відповідати за здатність Аβ агрегуватися у бляшки, особливо, якщо він має довгу форму. Накопичення амілоїдних бляшок у мозку може призводити до загибелі нейронних клітин. Соматичні симптоми, пов'язані із цим типом нейронної дегенерації, як раз і є характерним проявом хвороби Альцгеймера.

Було встановлене існування кореляції декількох мутацій у протеїні APP з наявністю хвороби Альцгеймера, див., наприклад, [Goate et al., Nature 349:704 (1991) (від валіну⁷¹⁷ до ізолейцину); Chartier Harlin et al., Nature 353:844 (1991) (від валіну⁷¹⁷ до гліцину); Murrell et al., Science 254:97 (1991) (від валіну⁷¹⁷ до фенілаланіну); Mullan et al., Nature Genet. 1:345 (1992) (подвійна мутація, що перетворює лізін⁵⁹⁵ - метіонін⁵⁹⁶ на аспарагін⁵⁹⁵-лейцин⁵⁹⁶)]. Вважається, що такі мутації викликають хворобу Альцгеймера внаслідок збільшеної чи зміненої переробки APP на Аβ і, зокрема, переробки APP на збільшені кількості довгої форми Аβ (тобто Аβ1-42 і Аβ1-43). Мутації в інших, наприклад, презенілінових генах PS1 і PS2, очевидно, непрямым чином впливають на переробку APP з утворенням більших кількостей довгої форми Аβ [Hardy, TINS 20:154(1997)].

Значення амілоїдних бляшок у хворобі Альцгеймера було встановлено в дослідях на мишах [Games et al., див. вище, Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550 (1997)]. Зокрема, коли трансгенним мишам PDAPP (що представляли мутантну форму людського APP і розвинену хворобу Альцгеймера у молодому віці) робилися ін'єкції довгої форми Аβ, вони в обох випадках виказували зростання прогресії хвороби Альцгеймера і збільшення титрів антитіл проти пептиду Аβ [Schenk et al., Nature 400,173 (1999)]. Вищевикладені спостереження свідчать про те, що Аβ, особливо в його довгій формі, являє собою причинний елемент хвороби Альцгеймера.

У патенті EP 526,511 (автор McMichael) пропонується пацієнту з виявленою в нього хворобою Альцгеймера призначати гомеопатичні дози (не більше 10⁻²мг/день) Аβ. У типової людини з 5л плазми навіть верхня межа цієї дози буде викликати концентрацію Аβ не більше 2пг/мл. Нормальна концентрація Аβ в людській плазмі, зазвичай, складає 50-200пг/мл [Seubert et al., Nature 359:325 (1992)]. Оскільки запропонована в EP 526,511 доза навряд чи змінить рівень ендogenousного циркулюючого Аβ і оскільки в EP 526,511 не пропонується застосування ад'юванту як імуностимулятора, малоімовірно одержати від цього будь-який відчутний терапевтичний ефект.

Отже існує необхідність у нових терапевтичних підходах і реагентах для лікування хвороби Альцгеймера і, зокрема, терапевтичних підходах і реагентах, здатних давати терапевтичний ефект при фізіологічних (наприклад, нетоксичних) дозах.

Винаходом пропонуються нові імунологічні реагенти і, зокрема, терапевтичні реагенти на базі антитіл для профілактики і лікування амілоїдогенних хвороб (наприклад, хвороби Альцгеймера). Винахід базується, принаймні частково, на ідентифікації і визначенні характеристик двох моноклональних антитіл, що специфічно зв'язуються з пептидом Аβ і ефективно знижують бляшкове навантаження і/або невритну дистрофію, - пов'язані з амілоїдогенними розладами. Структурний і функціональний аналізи цих антитіл дозволяють відшукати шлях до проектування різноманітних гуманізованих антитіл для профілактичного і/або терапевтичного застосування. Зокрема, винаходом пропонується гуманізація різноманітних ділянок цих антитіл і відповідно до цього - ланцюги гуманізованих імуноглобулінів або антитіл, інтактні гуманізовані імуноглобуліни або антитіла і функціональні фрагменти імуноглобулінів чи антитіл і, зокрема, антиген-зв'язувальні фрагменти запропонованих антитіл.

Розкриваються також поліпептиди, що містять ділянки визначення комплементарності в запропонованих моноклональних антитілах як полінуклеотидні реагенти, вектори і хазяїни, підходящі для кодування зазначених поліпептидів.

Окрім цього, пропонуються способи лікування амілоїдогенних хвороб чи розладів (наприклад, хвороби Альцгеймера) із застосуванням відповідних фармацевтичних композицій і наборів.

Пропонуються також способи ідентифікації залишків у запропонованих моноклональних антитілах, що є важливими для відповідної імунологічної функції і ідентифікації залишків, які піддаються заміщенню при проектуванні гуманізованих антитіл з поліпшеною афінністю зв'язування і/або зниженою імуногенністю при застосуванні як терапевтичних реагентів.

На Fig.1 дано порівняння амінокислотних послідовностей легкого ланцюга 3D6 миші, гуманізованого 3D6, антитіл Kabat ID 109230 і A19 зародкової лінії. CDR-ділянки позначені стрілками. Жирним курсивом

позначені рідкі мишачі залишки. Жирним прямим шрифтом позначені заповнювальні залишки (VH+VL). Затемнення показані канонічні залишки, і залишки що перебувають у CDR-взаємодії. Зірочками позначені залишки, вибрані для зворотної мутації в гуманізованому 3D6 версії 1.

На Фіг.2 подано порівняння амінокислотних послідовностей важкого ланцюга 3D6 миші, гуманізованого 3D6, антитіл Kabat ID 045919 і VH3-23 зародкової лінії. Позначення тут використані такі самі, що й на Фіг.1.

На Фіг.3 наведені графіки властивості зв'язування з Аβ у 3D6, химерному 3D6 і 10D5. На Фіг.3А наведені графіки зв'язування Аβ з химерними 3D6 (PK1614) у порівнянні з мишачим 3D6. На Фіг.3В наведені графіки конкурентного зв'язування з Аβ біотинільованого 3D6 у порівнянні з неміченим 3D6, PK1614 і 10D5.

На Фіг.4 показана гомологічна модель VH і VL мишачого 3D6 із зображенням сліду α-вуглецевого каркасу. VH показаний пунктирними лініями, а VL - суцільними лініями. Ділянки CDR показані у формі стрічок.

На Фіг.5 подані графіки Аβ-зв'язувальності властивості химерного 3D6 і гуманізованого 3D6. На Фіг.5А показані результати твердофазового імуноферментного аналізу (ELISA) зв'язування гуманізованого 3D6v1 і химерного 3D6 з агрегатованим Аβ. На Фіг.5В наведені результати ELISA зв'язування гуманізованого 3D6v1 і гуманізованого 3D6v2 з агрегатованим Аβ.

На Фіг.6 показані графіки кількісної оцінки зв'язування гуманізованого 3D6 і химерного 3D6 з бляшками Аβ зі зрізів мозку мишей PDAPP.

На Фіг.7 у графічній формі подані результати досліджень конкурентного зв'язування з Аβ гуманізованих версій 1 і 2 3D6, химерного 3D6, мишачого 3D6 і 10D5 порівняно з мишачим 3D6.

На Фіг.8 у графічній формі подані результати фагоцитозних досліджень *in vivo*, де проводився аналіз на здатність гуманізованого 3D6v2, химерного 3D6 і людського IgG опосередковувати поглинання Аβ мікрогліальними клітинами.

На Фіг.9 у порівнянні наведені амінокислотні послідовності VL 10D5 і VL 3D6. Жирними шрифтом тут позначені залишки, що точно збігаються з 10D5.

На Фіг.10 у порівнянні наведені амінокислотні послідовності VH 10D5 і VH 3D6. Жирними шрифтом тут позначені залишки, що точно збігаються з 10D5.

Даним винаходом пропонуються нові імунологічні реагенти і способи для профілактики і лікування хвороби Альцгеймера та інших амілоїдogenних розладів. Винахід базується, принаймні частково, на визначенні характеристики двох моноклональних імуноглобулінів - 3D6 і 10D5, ефективних у зв'язуванні бета-амілоїдного протеїну (Аβ) (наприклад, у зв'язуванні розчинного і/або агрегатованого Аβ), опосередкуванні фагоцитозу (наприклад, агрегатованого Аβ), зниженні бляшкового навантаження і/або зменшенні невритної дистрофії (наприклад, у пацієнта-людини). Винахід базується також на визначенні і структурному охарактеризуванні первинної і вторинної структури змінних легкого і важкого ланцюгів цих імуноглобулінів і ідентифікації залишків, важливих для активності та імуногенності.

Запропоновані імуноглобуліни включають у себе змінний легкий і/або змінний важкий ланцюг описаних тут кращих моноклональних імуноглобулінів. Запропоновано кращі імуноглобуліни, наприклад, терапевтичні імуноглобуліни, які включають у себе гуманізований змінний легкий і/або гуманізований змінний важкий ланцюг. Кращі змінний легкий і/або змінний важкий ланцюги містять ділянку визначення комплементарності (CDR: complementarity determining region) із моноклонального (наприклад, донорного) імуноглобуліну і змінні каркасні ділянки практично із людського акцепторного імуноглобуліну. Термін "практично із людського акцепторного імуноглобуліну" означає, що головні або ключові каркасні залишки є із людської акцепторної послідовності, але такі, що дозволяють здійснювати заміщення залишків у певних положеннях на залишки, вибрані для поліпшення активності гуманізованого імуноглобуліну (наприклад, змінювати активність так, щоб вона якомога ближче імітувала активність донорного імуноглобуліну) або вибраних для зменшення імуногенності гуманізованого імуноглобуліну.

В одному з варіантів здійснення винаходом розкривається легкий або важкий ланцюг гуманізованого імуноглобуліну, який включає у себе ділянки визначення комплементарності (CDR) змінної ділянки 3D6 (тобто одну, дві чи три CDR-ділянки із послідовності змінної ділянки легкого ланцюга, визначеної як SEQ ID NO:2, або включає у себе одну, дві чи три CDR-ділянки із послідовності змінної ділянки важкого ланцюга, визначеної як SEQ ID NO:4), і містить змінну каркасну ділянку практично із послідовності легкого чи важкого ланцюга людського акцепторного імуноглобуліну, за умови, що принаймні один залишок каркасної ділянки є зворотно мutowаним у відповідний мишачий залишок, де зазначена зворотна мутація практично не впливає на здатність даного ланцюга безпосередньо зв'язуватися з Аβ.

В іншому варіанті здійснення винаходу пропонується легкий або важкий ланцюг гуманізованого імуноглобуліну, який містить ділянки визначення комплементарності (CDR) змінної ділянки антитіла 3D6 (наприклад, одну, дві чи три CDR-ділянки із послідовності змінної ділянки легкого ланцюга, визначеної як SEQ ID NO:2 і/або включає у себе одну, дві чи три CDR-ділянки із послідовності змінної ділянки важкого ланцюга, визначеної як SEQ ID NO:4) і включає змінну каркасну ділянку практично із послідовності легкого чи важкого ланцюга людського акцепторного імуноглобуліну, за умови, що принаймні один каркасний залишок є заміщеним на відповідний амінокислотний залишок із послідовності змінної ділянки легкого чи важкого ланцюга мишачого 3D6, де каркасний залишок вибраний із групи, що складається із: (a) залишку, що нековалентно зв'язується безпосередньо з антигеном; (b) залишку, сусіднього із CDR-ділянкою; (c) залишку, що взаємодіє із CDR-ділянкою (наприклад, ідентифікованого моделюванням легкого чи важкого ланцюга на визначеній структурі відомого гомологічного ланцюга імуноглобуліну); і (d) залишку, що бере участь у VL-VH-інтерфейсі.

У ще одному варіанті здійснення винаходу пропонується легкий або важкий ланцюг гуманізованого імуноглобуліну, який містить CDR-ділянки змінної ділянки антитіла 3D6 і змінні каркасні ділянки із послідовності легкого чи важкого ланцюга людського акцепторного імуноглобуліну за умови, що принаймні один каркасний залишок є заміщеним на відповідний амінокислотний залишок із послідовності змінної ділянки легкого чи важкого ланцюга мишачого 3D6, де цей каркасний залишок є здатним впливати на конформацію або функцію змінної ділянки легкого ланцюга згідно з даними аналізу тримірної моделі цієї змінної ділянки, наприклад: залишок, здатний взаємодіяти з антигеном; залишок, найближчий до місця

зв'язування з антигеном; залишок, здатний взаємодіяти з CDR; залишок, сусідній із CDR; залишок у межах 6Å від CDR-залишку; канонічний залишок; залишок верньєрної зони; міжланцюговий заповнювальний залишок; нетривіальний залишок або залишок сайту глікозилювання на поверхні структурної моделі.

В одному з варіантів здійснення винаходу пропонується легкий ланцюг гуманізованого імуноглобуліну, який містить CDR-ділянки змінної ділянки антитіла 3D6 (наприклад, із послідовності змінної ділянки легкого ланцюга 3D6, визначеної як SEQ ID NO:2) і включає у себе змінну каркасну ділянку людського акцепторного імуноглобуліну за умови, що принаймні один каркасний залишок, вибраний із групи L1, L2, L36 і L46 (угода з нумерації Кабата), є заміщеним на відповідний амінокислотний залишок із послідовності змінної ділянки легкого ланцюга мишачого 3D6. В іншому подібному варіанті здійснення винаходу пропонується важкий ланцюг гуманізованого імуноглобуліну, який містить CDR-ділянки змінної ділянки антитіла 3D6 (наприклад, із послідовності змінної ділянки важкого ланцюга антитіла 3D6, визначеної як SEQ ID NO:4) і включає у себе змінну каркасну ділянку людського акцепторного імуноглобуліну за умови, що принаймні один каркасний залишок, вибраний із групи H49, H93 і H94 (угода з нумерації Кабата), є заміщеним на відповідний амінокислотний залишок із послідовності змінної ділянки важкого ланцюга мишачого 3D6.

Кращі легкі ланцюги містять каркасні ділянки каппа II підтипу каппа II (угода Кабата), наприклад, каркасні ділянки із акцепторного імуноглобуліну Kabat ID 019230, Kabat ID 005131, Kabat ID 005058, Kabat ID 005057, Kabat ID 005059, Kabat ID U21040 і Kabat ID U41645. Кращі важкі ланцюги містять каркасні ділянки підтипу III (угода Кабата), наприклад, каркасні ділянки із акцепторного імуноглобуліну Kabat ID 045919, Kabat ID 000459, Kabat ID 000553, Kabat ID 000386 і Kabat ID M23691.

В іншому варіанті здійснення винаходу пропонується легкий або важкий ланцюг гуманізованого імуноглобуліну, який містить ділянки визначення комплементарності (CDR) змінної ділянки антитіла 10D5 (тобто включає у себе одну, дві чи три CDR-ділянки із послідовності змінної ділянки легкого ланцюга, визначеної як SEQ ID NO:14, або одну, дві чи три CDR-ділянки із послідовності змінної ділянки важкого ланцюга, визначеної як SEQ ID NO:16) і включає змінну каркасну ділянку практично із послідовності легкого чи важкого ланцюга людського акцепторного імуноглобуліну за умови, що принаймні один залишок каркасної ділянки є зворотно мutowаним у відповідний мишачий залишок, де зазначена зворотна мутація практично не впливає на здатність даного ланцюга безпосередньо зв'язуватися з Аβ.

В одному із варіантів здійснення винаходу пропонується легкий або важкий ланцюг гуманізованого імуноглобуліну, який містить ділянки визначення комплементарності (CDR) змінної ділянки антитіла 10D5 (наприклад, включає у себе одну, дві чи три CDR-ділянки із послідовності змінної ділянки легкого ланцюга, визначеної як SEQ ID NO: 14 і/або одну, дві чи три CDR-ділянки із послідовності змінної ділянки важкого ланцюга, визначеної як SEQ ID NO:16) і включає у себе змінну каркасну ділянку практично із послідовності легкого чи важкого ланцюга людського акцепторного імуноглобуліну за умови, що принаймні один каркасний залишок є заміщеним на відповідний амінокислотний залишок із послідовності змінної ділянки легкого чи важкого ланцюга мишачого 3D6, де каркасний залишок вибраний із групи, що складається із: (a) залишку, що нековалентно зв'язується безпосередньо з антигеном; (b) залишку, сусіднього із CDR-ділянкою; (c) залишку, що взаємодіє із CDR-ділянкою (наприклад, ідентифікованого моделюванням легкого чи важкого ланцюга на визначеній структурі відомого гомологічного ланцюга імуноглобуліну); і (d) залишку, що бере участь у VL-VH-інтерфейсі.

У ще одному варіанті здійснення винаходу пропонується легкий або важкий ланцюг гуманізованого імуноглобуліну, який містить CDR-ділянки змінної ділянки антитіла 10D5 і змінні каркасні ділянки із послідовності легкого чи важкого ланцюга людського акцепторного імуноглобуліну за умови, що принаймні один каркасний залишок є заміщеним на відповідний амінокислотний залишок із послідовності змінної ділянки легкого чи важкого ланцюга мишачого 10D5, де цей каркасний залишок є здатним впливати на конформацію або функцію змінної ділянки легкого ланцюга згідно з даними аналізу тримірної моделі цієї змінної ділянки, наприклад: залишок, здатний взаємодіяти з антигеном; залишок, найближчий до місця зв'язування з антигеном; залишок, здатний взаємодіяти з CDR; залишок, сусідній із CDR; залишок у межах 6Å від CDR-залишку; канонічний залишок; залишок верньєрної зони; міжланцюговий заповнювальний залишок; нетривіальний залишок або залишок сайту глікозилювання на поверхні структурної моделі.

В іншому варіанті здійснення винаходу в додаток до заміщень, описаних вище, пропонується заміщення принаймні одного рідкого каркасного залишку людини. Наприклад, рідкий залишок може бути заміщений на амінокислотний залишок, що є спільним для послідовностей людських змінних ланцюгів у цьому положенні. В альтернативному варіанті рідкий залишок може бути заміщений на відповідний амінокислотний залишок із послідовності змінного ланцюга гомологічної зародкової лінії (наприклад, рідкий каркасний залишок легкого ланцюга може бути заміщений на відповідний залишок зародкової лінії послідовності імуноглобуліну зародкової лінії A1, A17, A18, A2 або A19, або ж рідкий каркасний залишок важкого ланцюга може бути заміщений на відповідний залишок зародкової лінії із послідовності імуноглобуліну зародкової лінії VH3-48, VH3-23, VH3-7, VH3-21 або VH3-11).

В іншому варіанті здійснення винаходу пропонується гуманізований імуноглобулін, який містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, як описано вище, або антиген-зв'язувальний фрагмент зазначеного імуноглобуліну. В одному з таких варіантів гуманізований імуноглобулін зв'язується (наприклад, специфічно) з бета-амілоїдним пептидом (Аβ), де афінність зв'язування складає принаймні 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} або 10^9 M^{-1} . В іншому з таких варіантів імуноглобулін або антиген-зв'язувальний фрагмент включає у себе важкий ланцюг, що має ізотип $\gamma 1$. У ще одному з таких варіантів імуноглобулін або антиген-зв'язувальний фрагмент зв'язується (наприклад, специфічно) як з розчинним бета-амілоїдним пептидом (Аβ), так і з агрегованим Аβ. Ще в одному з подібних варіантів здійснення імуноглобулін або антиген-зв'язувальний фрагмент опосередковує фагоцитоз (наприклад, викликає фагоцитоз) бета-амілоїдного пептиду (Аβ). Можливий також варіант здійснення, в якому імуноглобулін або антиген-зв'язувальний фрагмент переходить через гематоенцефалічний бар'єр пацієнта. У ще одному з таких варіантів імуноглобулін або антиген-зв'язувальний фрагмент знижує як бета-амілоїдне пептидне (Аβ) навантаження, так і неритну дистрофію у пацієнта.

В іншому варіанті здійснення винаходу пропонуються химерні імуноглобуліни, які включають у себе

змінні ділянки 3D6 (наприклад, послідовності змінних ділянок, визначені як SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:4). Ще в одному з таких варіантів здійснення винаходу пропонується імуноглобулін або його антиген-зв'язувальний фрагмент, який містить змінну ділянку важкого ланцюга, визначену послідовністю SEQ ID NO:8, і змінну ділянку легкого ланцюга, визначену послідовністю SEQ ID NO:5. Пропонується також варіант здійснення винаходу, в якому імуноглобулін або його антиген-зв'язувальний фрагмент включає змінну ділянку важкого ланцюга, визначену послідовністю SEQ ID NO:12, і змінну ділянку легкого ланцюга, визначену послідовністю SEQ ID NO:11. В іншому варіанті здійснення винаходу пропонуються химерні імуноглобуліни, які включають у себе змінні ділянки 10D5 (наприклад, послідовності змінних ділянок, визначені як SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16). У ще одному з таких варіантів здійснення винаходу імуноглобулін або його антиген-зв'язувальний фрагмент містить також постійні ділянки із IgG1.

Описані тут імуноглобуліни є особливо підходящими для застосування в терапевтичних способах, спрямованих на профілактику або лікування амілоїдогенних хвороб. В одному із варіантів здійснення винаходу пропонується спосіб профілактики або лікування амілоїдогенної хвороби (наприклад, хвороби Альцгеймера), який передбачає введення пацієнту ефективної дози гуманізованого імуноглобуліну згідно з поданим тут описом. В іншому варіанті здійснення винаходу пропонуються фармацевтичні композиції, до яких уходять описаний тут гуманізований імуноглобулін і фармацевтичний носій. Передбачаються також ізольовані нуклеїнокислотні молекули, вектори і клітини-хазяїни для продукування описаних тут імуноглобулінів або фрагментів чи ланцюгів імуноглобулінів, а також способи вироблення таких імуноглобулінів, фрагментів імуноглобулінів або ланцюгів імуноглобулінів.

Винаходом передбачається також спосіб ідентифікації залишків 3D6 або 10D5, що піддаються заміщенню при виробленні гуманізованого імуноглобуліну відповідно 3D6 або 10D5. Наприклад, спосіб ідентифікації залишків змінної каркасної ділянки, що піддаються заміщенню, передбачає моделювання тримірної структури змінної ділянки 3D6 або 10D5 на визначеній гомологічній структурі імуноглобуліну і аналіз цієї моделі на наявність залишків, здатних впливати на конформацію або функцію змінної ділянки імуноглобуліну 3D6 або 10D5, так, що ідентифікуються залишки, які піддаються заміщенню. Винаходом передбачається також застосування послідовності змінної ділянки, визначеної як SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:4, або будь-якої її частини у продукуванні тримірного образу імуноглобуліну 3D6, ланцюга імуноглобуліну 3D6 або його домену. Передбачається також застосування послідовності змінної ділянки, визначеної як SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16, або будь-якої її частини у продукуванні тримірного образу імуноглобуліну 10D5, ланцюга імуноглобуліну 10D5 або його домену.

Перш, ніж розпочати опис винаходу, доцільно для поліпшення його розуміння подати визначення деяких термінів, що в ньому застосовуються.

Терміни "імуноглобулін" або "антитіло" (які в даному описі використовуються як взаємозамінні) означають антиген-зв'язувальний білок, котрий має базову пептидну чотириланцюгову структуру, що складається з двох важких і двох легких ланцюгів, стабілізованих, наприклад, міжланцюговими бісульфідними зв'язками, і який є здатним специфічно зв'язуватися з антигеном. Як важкі, так і легкі ланцюги звиваються в домени. "Доменом" зветься глобулярна ділянка важкого або легкого ланцюга поліпептиду, який містить пептидні петлі (в кількості, наприклад, три-чотири пептидних петлі), стабілізовані, наприклад, складчастим β -листом і/або міжланцюговим бісульфідним зв'язком. Крім того, домени визначаються тут як "постійні" або "змінні", залежно від наявності значних змін у доменах членів різноманітних класів ("змінні" домени) або відносної відсутності змін послідовності в доменах членів різноманітних класів ("постійні" домени). "Постійні" домени на легкому ланцюзі зветься тут "постійними ділянками легкого ланцюга", "постійними домонами легкого ланцюга", "CL"-ділянками або "CL"-домонами. "Постійні" домени на важкому ланцюзі зветься тут "постійними ділянками важкого ланцюга", "постійними домонами важкого ланцюга", "CH"-ділянками або "CH"-домонами. "Змінні" домени на легкому ланцюзі зветься тут "змінними ділянками легкого ланцюга", "змінними домонами легкого ланцюга", "VL"-ділянками або "VL"-домонами. "Змінні" домени на важкому ланцюзі зветься тут "змінними ділянками важкого ланцюга", "змінними домонами важкого ланцюга", "VH"-ділянками або "VH"-домонами.

Термін "ділянка" використовується тут стосовно частини ланцюга антитіла, такої, наприклад, як визначені тут постійні або змінні домени, або інші, більш дискретні частини таких домени. Наприклад, змінними домонами або ділянками легкого ланцюга можуть бути визначені тут "ділянки визначення комплементарності" чи "CDR"-ділянки, розташовані між "каркасними ділянками" або "FR" ("framework regions").

Імуноглобуліни або антитіла можуть існувати в мономерній або полімерній формі. "Антиген-зв'язувальним фрагментом" тут зветься поліпептидний фрагмент імуноглобуліну чи антитіла, що зв'язується з антигеном або конкурує з інтактним антитілом (тобто з інтактним антитілом, із якого ці імуноглобулін або антитіло були отримані) за зв'язування з антигеном (тобто специфічне зв'язування). Терміном "конформація" визначається третинна структура білка або поліпептиду (наприклад, антитіла, ланцюга антитіла, його домену або ділянки). Наприклад, вираз "легколанцюгова (або важколанцюгова) конформація" стосується третинної структури легколанцюгової (або важколанцюгової) змінної ділянки, а вирази "конформація антитіла" або "конформація фрагмента антитіла" стосуються третинної структури антитіла або його фрагмента.

Термін "специфічне зв'язування" антитіла означає, що дане антитіло вказує відчутну афінність до антигена або кращого епітопу і в кращому випадку не вказує суттєвої перехресної реактивності. Під виразом "відчутне" або краще зв'язування розуміється зв'язування з афінністю принаймні 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 або 10^{10} M^{-1} . Кращими є величини афінності більше 10^7 M^{-1} , а найкращими - більше за 10^8 M^{-1} . Проміжні величини афінності також включаються в об'єм даного винаходу, складаючи діапазон кращої афінності зв'язування, наприклад, від 10^6 до 10^{10} M^{-1} , краще, якщо від 10^7 до 10^{10} M^{-1} , і ще краще, якщо від 10^8 до 10^{10} M^{-1} . Антитілом, "яке не вказує суттєвої перехресної активності", є таке антитіло, що не зв'язується відчутно з небажаною речовиною (наприклад, з небажаною білковою речовиною). Наприклад, антитіло, що специфічно зв'язується з А β , буде відчутно зв'язуватися з А β , але несуттєво реагувати з не-А β -білками або пептидами (наприклад, з не-А β -білками або пептидами, що перебувають у бляшках). Антитіло, специфічне

до кращого епітопу, наприклад, не буде у значному ступені перехресно реагувати з віддаленими епітопами на тому самому білку або пептиді. Специфічне зв'язування може бути визначене за допомогою будь-яких загальноприйнятих у даній галузі відповідних засобів. Як кращі серед них можуть бути запропоновані аналіз Скетчарда (Scatchard) і випробування на конкурентне зв'язування.

Зв'язувані фрагменти продукуються за допомогою методів рекомбінантних ДНК або шляхом ферментативного чи хімічного розщеплення інтактних імуноглобулінів. Серед фрагментів зв'язування можна назвати такі: Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, одинарні ланцюги і одноланцюгові антитіла. Окрім "біспецифічних" або "біфункціональних" імуноглобулінів чи антитіл, кожний імуноглобулін або кожне антитіло вважається таким, що має свої ідентичні сайти зв'язування. "Біспецифічним" або "біфункціональним" антитілом є штучне гібридне антитіло, яке має дві різні важко/легко-ланцюгові пари і два різні сайти зв'язування. Біспецифічні антитіла можуть одержуватися у різноманітні способи, включаючи злиття гібридом або зшивання Fab'-фрагментів, див., наприклад, [Songvilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)].

Терміни "гуманізований імуноглобулін" або "гуманізоване антитіло" стосуються імуноглобулінів або антитіл, які містять щонайменше один гуманізований ланцюг імуноглобуліну чи антитіла (тобто щонайменше один гуманізований легкий або важкий ланцюг). Терміни "гуманізований ланцюг імуноглобуліну" або "гуманізований ланцюг антитіла" (тобто "гуманізований легкий ланцюг імуноглобуліну" або "гуманізований важкий ланцюг антитіла") стосуються ланцюга імуноглобуліну або антитіла (тобто, відповідно, легкого або важкого ланцюга), який має змінну ділянку, що містить змінну каркасну ділянку практично із людського імуноглобуліну або антитіла і ділянки визначення комплементарності (CDR-ділянки) (наприклад, щонайменше одну CDR-ділянку, краще, якщо дві CDR-ділянки, і ще краще, якщо три CDR-ділянки, практично із нелюдського імуноглобуліну або антитіла, а також, включає у себе постійні ділянки (наприклад, щонайменше одну постійну ділянку або її частину у випадку легкого ланцюга і краще, якщо три постійні ділянки у випадку важкого ланцюга). Терміном "гуманізована змінна ділянка" (наприклад, "гуманізована змінна ділянка легкого ланцюга" або "гуманізована змінна ділянка важкого ланцюга") визначається змінна ділянка, яка містить змінну каркасну ділянку практично із людського імуноглобуліну або антитіла і ділянки визначення комплементарності (CDR-ділянки) практично із нелюдського імуноглобуліну або антитіла.

Вирази "практично із людського імуноглобуліну або антитіла" або "практично людський" означають, що у порівнянні з амінокислотною послідовністю людського імуноглобуліну або антитіла дана ділянка має принаймні 80-90%, у кращому випадку - 90-95%, і ще кращому - 95-99% ідентичність (тобто, локальну ідентичність послідовності) з людською імунокислотною послідовністю каркасу або постійної ділянки, дозволяючи, таким чином, на консервативні заміщення, заміщення в узгоджених послідовностях, заміщення в зародкових лініях, зворотні мутації і под. Застосування консервативних заміщень, заміщень в узгоджених послідовностях, заміщень у зародкових лініях, зворотних мутацій та ін. часто зводяться "оптимізацією" гуманізованого антитіла або ланцюга. Вирази "практично із нелюдського імуноглобуліну або антитіла" або "практично нелюдський" означають, що послідовність даного імуноглобуліну або антитіла є принаймні на 80-95%, краще, якщо на 90-95%, а ще краще, якщо на 96-97%, 98% і 99% ідентичною послідовності нелюдського організму, наприклад, свавця, що не є людиною.

Відповідно до цього, всі ділянки або залишки гуманізованого імуноглобуліну або антитіла, або ж гуманізованого ланцюга імуноглобуліну чи антитіла, за винятком, можливо, CDR-ділянок, є практично ідентичними відповідним ділянкам або залишкам однієї і більше нативних послідовностей імуноглобуліну людини. Вирази "відповідна ділянка" або "відповідний залишок" означають, відповідно, ділянку і залишок на другій амінокислотній або нуклеотидній послідовності, що займають таке саме (тобто, еквівалентне) положення, що й ділянка або залишок на першій амінокислотній чи нуклеотидній послідовності, коли перша і друга послідовності оптимально зіставлені з метою порівняння.

Термінами "гуманізований імуноглобулін" або "гуманізоване антитіло" не охоплюються химерні імуноглобуліни й антитіла, як визначено нижче. Хоча гуманізовані імуноглобуліни чи антитіла є за їхньою конструкцією химерними (тобто, містять ділянки із більш ніж одного виду білка), вони мають додаткові ознаки (тобто змінні ділянки з донорними залишками CDR і акцепторними каркасними залишками), відсутні у химерних імуноглобулінів чи антитіл, як визначено в даному описі.

Термін "суттєва ідентичність" означає, що дві поліпептидні послідовності при оптимальному порівнянні за допомогою, наприклад, програм GAP або BESTFIT із використанням ваги прогалин за умовчанням мають щонайменше 50-60%, краще, якщо 60-70%, а ще краще, якщо 70-80%, ще краще, якщо 80-90%, і навіть ще більш кращу, якщо щонайменше 90-95%, і найкращу, якщо щонайменше 95% ідентичність послідовностей (наприклад, 99% або більше ідентичність послідовностей). Термін "практична ідентичність" означає, що дві поліпептидні послідовності при їх оптимальному порівнянні за допомогою програм GAP або BESTFIT із використанням ваги прогалин за умовчанням мають щонайменше 80-90%, краще, якщо 90-95% і ще краще, якщо принаймні 95% (наприклад, 99% і більше) ідентичність послідовностей. При порівнянні послідовностей одна з послідовностей зазвичай використовується як еталон, з яким проводиться порівняння. При застосуванні алгоритму порівняння послідовностей у комп'ютер вводять послідовність, що аналізується, і еталонну послідовність, у разі необхідності зазначають координати послідовностей і програмні параметри алгоритму порівняння послідовностей. За цими даними алгоритм порівняння послідовностей обчислює відсоток ідентичності послідовностей, тобто послідовності (або послідовностей), що аналізується відносно еталонної послідовності на основі зазначених програмних параметрів. Терміни "ідентичність послідовностей" і "послідовнісна ідентичність" використовуються тут як взаємозамінні.

Оптимальне зіставлення послідовностей для порівняння може здійснюватися, наприклад, за допомогою алгоритму локальної гомології, запропонованого Смітом і Ватерманом [Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)], алгоритму гомологічного зіставлення, запропонованого Нідлменом і Вуншем [Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)], методу пошуку подібності, запропонованого Пірсоном і Ліпманом [Pearson & Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)], комп'ютеризованих форм цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA, і TFASTA у програмному пакеті Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) або шляхом візуальних досліджень, див. [Ausubel et al.,

Current Protocols in Molecular Biology]. Як один із прикладів алгоритму, підходящого для визначення відсотку ідентичності послідовності і подібності послідовностей можна назвати алгоритм BLAST, описаний в [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990)]. Програмне забезпечення для здійснення BLAST-аналізу можна придбати через Національний центр інформації з біотехнології National Center for Biotechnology Information (загальнодоступний через інтернет-сервер NCBI Національних закладів з охорони здоров'я: National Institutes of Health NCBI internet server). Зазвичай для порівняння послідовностей можуть застосовуватися не тільки програмні параметри за умовчанням, але також звичайні параметри. Для порівняння амінокислотних послідовностей програма BLASTP використовує за умовчанням довжину слова (W) 3, очікування (E) 10, і лічильну матрицю BLOSUM62 [Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)].

У кращому варіанті здійснення неідентичні положення залишків розрізняються консервативними заміщеннями амінокислот. Для того щоб поділити заміщення амінокислот на консервативні і неконсервативні, амінокислоти групують таким чином: Група I (гідрофобні бічні ланцюги) - leu, met, ala, val, leu, ile; Група II (нейтральні гідрофільні бічні ланцюги) - cys, ser, thr; Група III (кислотні бічні ланцюги) - asp, glu; Група IV (основні бічні ланцюги) - asn, gin, his, lys, arg; Група V (залишки, що впливають на орієнтацію ланцюгів) - gly, pro; Група VI (ароматичні бічні ланцюги) - trp, tyr, phe. Консервативні заміщення залучають заміщення між амінокислотами одного класу. Неконсервативні заміщення є такими, при яких відбувається заміна члена одного з цих класів на член іншого класу.

У кращому варіанті імунізовані імуноглобуліни або антитіла зв'язуються з антигеном з афінністю, що в три, чотири або п'ять разів перевищує афінність відповідного нелюдського антитіла. Наприклад, якщо нелюдське антитіло має афінність зв'язування 10^9 M^{-1} , то гуманізовані антитіла будуть зв'язуватися з афінністю принаймні $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ або $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Зв'язувальна властивість ланцюга імуноглобуліну або антитіла може розглядатися як здатність цього ланцюга до "зв'язування безпосередньо з антигеном (наприклад, з Аβ)". Ланцюг зветься "зв'язуваним безпосередньо з антигеном", якщо він надає інтактному імуноглобуліну або антитілу (або ж зв'язуваному з антитілом його фрагменту) властивості специфічно зв'язуватися або афінності зв'язування. Мутація (наприклад, зворотна мутація) зветься такою, що практично впливає на здатність легкого чи важкого ланцюга безпосередньо зв'язуватися з антигеном, якщо вона впливає на (наприклад, знижує) афінність зв'язування інтактного імуноглобуліну або антитіла (або зв'язуваного з антигеном його фрагмента), що містить цей ланцюг, принаймні на порядок величини порівняно з афінністю антитіла (або зв'язуваного з антигеном його фрагмента), що містить еквівалентний ланцюг без цієї мутації. Та чи інша мутація зветься такою, що "не впливає суттєво (наприклад, у напрямку зниження)" на здатність ланцюга безпосередньо зв'язуватися з антигеном", якщо вона впливає на (наприклад, знижує) афінність зв'язування інтактного імуноглобуліну або антитіла (або ж зв'язуваного з антигеном його фрагмента), що містить зазначений ланцюг, з коефіцієнтом величиною 2, 3 або 4 порівняно з антитілом (або зв'язуваним з антигеном його фрагментом), що містить еквівалентний ланцюг без цієї мутації.

Термін "химерний імуноглобулін" або "химерне антитіло" стосується імуноглобуліну або антитіла, легкий і важкий ланцюги яких отримані із різних видів. Химерні імуноглобуліни чи антитіла можуть бути сконструйовані, наприклад, за допомогою генної інженерії із сегментів імуноглобулінового гена, що належать різним видам.

"Антиген" є речовиною (наприклад, білковою речовиною або пептидом), з яким специфічно зв'язується антитіло.

"Епітопом" або "антигенною детермінантою" зветься сайт на антигені, з яким специфічно зв'язується імуноглобулін або антитіло (або його антиген-зв'язуваний фрагмент). Епітопи можуть бути утворені як із суміжних амінокислот, так і несуміжних амінокислот, суміщення третинним згортанням структури білка. Епітопи, утворені із суміжних амінокислот, як правило, відкриті дії на них розчинників, що денатурують, у той час як епітопи, утворені третинним згортанням, є зазвичай захищеними від впливу таких розчинників. Епітоп, як правило, містить принаймні 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 амінокислот в унікальній просторовій конформації. Визначити просторову конформацію епітопу можна, наприклад, за допомогою методів рентгенівської кристалографії і двовимірного ядерного магнітного резонансу, див., наприклад, [Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)].

Антитіла, які розпізнають один і той самий епітоп, можуть бути ідентифіковані за допомогою простого імуноаналізу, що показує здатність антитіла блокувати зв'язування іншого антитіла з цільовим антигеном, тобто за допомогою аналізу на конкурентне зв'язування. Конкурентне зв'язування визначається шляхом аналізу, в якому випробуваний імуноглобулін інгібує специфічне зв'язування еталонного антитіла зі спільним антигеном на зразок Аβ. Відомими є численні види аналізу на конкурентне зв'язування, наприклад: твердофазовий прямий і непрямий радіоімуноаналіз (RIA), твердофазовий прямий і непрямий ферментативний імуноаналіз (EIA), конкурентний сендвич-аналіз [Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983)]; твердофазовий біотин-авідиновий EIA [Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)]; твердофазовий прямий аналіз із міченням, твердофазовий прямий сендвич-аналіз із міченням [Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)]; твердофазовий прямий RIA-аналіз із міченням при використанні мітки I-125 [Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7 (1988)]; твердофазовий прямий біотин-авідиновий EIA [Cheung et al., Virology 176:546 (1990)]; прямий RIA-аналіз із міченням [Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990)]. Як правило, в такому аналізі використовується очищений антиген, зв'язаний із твердою поверхнею або клітинами, що несуть як немічений випробуваний імуноглобулін, так і мічений еталонний імуноглобулін. Конкурентне інгібування, вимірюють шляхом визначення кількості мітки, зв'язаної з твердою поверхнею або клітинами у присутності випробуваного імуноглобуліну. Звичайно, випробуваний імуноглобулін є наявним у надлишку. Коли конкурентне антитіло перебуває у надлишку, воно, як правило, буде інгібувати специфічне зв'язування еталонного антитіла зі спільним антигеном принаймні на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% і більше.

Епітоп розпізнається також імунологічними, наприклад, В- і/або Т-клітинами. Клітинне розпізнавання епітопу може визначатися шляхом аналізу *in vitro* з вимірюванням антиген-залежної проліферації із

використанням включення ^3H -тимідину, секреції цитокінів, секреції антитіл або антиген-залежного цитолізу (аналіз цитотоксичних Т-лімфоцитів).

Типові епітопи або антигенні детермінанти можна знайти в людському амілоїдному білку-попереднику (APP: amyloid precursor protein), але краще відшукувати їх в пептиді А β білка APP. Існують численні ізоформи APP, наприклад, APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹, APP⁷⁷⁰. Амінокислотам в APP призначають номери відповідно до послідовності ізоформи APP⁷⁷⁰, див., наприклад, [GenBank, номер доступу P05067, визначений далі також як SEQ ID NO:38]. Пептид А β (який зветься тут також бета-амілоїдним пептидом і А-бета) є ~4kDa внутрішнім фрагментом із 39-43 амінокислот пептиду APP (А β 39, А β 40, А β 42 і А β 43). Наприклад, пептид А β 40 складається із залишків 672-711 пептиду APP, а пептид А β 42 складається із залишків 673-713 пептиду APP. У результаті протеолітичного процесінгу пептиду APP різноманітними ферментами секретази in vivo або in situ А β приймає як "коротку форму" завдовжки 40 амінокислот, так і "довгу форму" завдовжки 42-43 амінокислоти. Кращі епітопи або антигенні детермінанти розташовуються на N-кінці пептиду А β і включають у себе залишки в межах амінокислот 1-10 пептиду А β , а в кращому випадку - залишки 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 і 3-7 пептиду А β 42. Додаткові кращі епітопи або антигенні детермінанти включають у себе залишки 2-4, 5, 6, 7 або 8 пептиду А β , залишки 3-5, 6, 7, 8 і 9 пептиду А β , а також залишки 4-7, 6, 7, 8 і 9 пептиду А β 42.

Термін "амілоїдогенна хвороба" означає будь-яку хворобу, викликану або пов'язану з утворенням чи відкладанням нерозчинних амілоїдних волокон. Серед типових амілоїдогенних хвороб можна назвати, наприклад, системний амілоїдоз, хворобу Альцгеймера, зрілий діабет, хворобу Паркінсона, хворобу Хантінгтона, лобноскроневе недоумство і трансмісивні губчасті види енцефалопатії (куру і хвороба Крейцфельда-Якоба у людей та скреїпі і BSE в овець і великої рогатої худоби, відповідно). Різноманітні амілоїдогенні хвороби визначаються або характеризуються природою поліпептидного компонента волокнистих відкладень. Наприклад, у випадку хвороби Альцгеймера характерним поліпептидним компонентом амілоїдних відкладень у пацієнта є бета-амілоїдний протеїн (наприклад, дикого типу, варіантний або зрізаний). Відповідно до цього, хвороба Альцгеймера може бути прикладом "хвороби, що характеризується відкладеннями А β " або "хвороби, пов'язаної з відкладеннями А β ", наприклад, у мозку пацієнта. Терміни "бета-амілоїдний протеїн", "бета-амілоїдний пептид", "бета-амілоїд", "А β " і "пептид А β " використовуються тут як взаємозамінні.

Терміни "ефективна доза" або "ефективне дозування" означають кількість, достатню для досягнення або, принаймні, часткового досягнення бажаного ефекту. Термін "терапевтично ефективна доза" означає кількість, достатню для лікування або принаймні часткового зупинення хвороби та її ускладнень у пацієнта, який вже страждає на цю хворобу. Кількості, ефективні для цих застосувань, будуть залежати від тяжкості інфікування і загального стану імунної системи пацієнта.

Під терміном "пацієнт" розуміється людина або іншого виду ссавець, що отримує профілактичний або терапевтичний догляд.

Термінами "розчинний" і "дисоційований" А β визначається неагрегований або дезагрегований поліпептид А β . "Розчинним" А β зветься агрегований поліпептид А β , наприклад, А β , утримуваний укупі нековалентними зв'язками. Вважається, що агрегування А β (наприклад, А β 42), принаймні, частково зумовлюється наявністю гідрофобних залишків на С-кінці цього пептиду (частина трансмембранного домену пептиду APP). Один зі способів приготування розчинного А β полягає в розчиненні ліофілізованого пептиду в чистому DMSO в умовах ультразвукового опромінювання. Утворений при цьому розчин піддають центрифугуванню для видалення всіх нерозчинних часток.

І. Імунологічні і терапевтичні реагенти

Імунологічні і терапевтичні реагенти за даним винаходом включають у себе імуногени або антитіла, або їхні функціональні чи антиген-зв'язувальні фрагменти згідно з поданими тут визначеннями. Як відомо, основна структурна одиниця антитіла містить тетрамер із субодиниць. Кожний тетрамер складається з двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, де кожна пара має один "легкий" (приблизно 25kDa) і один "важкий" ланцюг (приблизно 50-70kDa). Амінокінцева частина кожного ланцюга містить змінну ділянку приблизно із 100-110 або більше амінокислот, що є у першу чергу відповідальними за розпізнання антигена. Карбоксикінцева частина кожного ланцюга визначає собою постійну ділянку, що є у першу чергу відповідальною за ефекторну функцію.

Легкі ланцюги поділяються на каппа- і лямбда-ланцюги і мають довжину приблизно 230 залишків. Важкі ланцюги поділяються на гамма (γ), мію (μ), альфа (α), дельта (δ) й епсилон (ϵ) різновиди, мають довжину приблизно 450-600 залишків і визначають ізотип антитіла - IgG, IgM, IgA, IgD і IgE, відповідно. Як важкі, так і легкі ланцюги згортаються в домени. "Доменом" зветься глобулярна ділянка білка, наприклад, імуноглобуліну або антитіла. Домени імуноглобуліну чи антитіла містять, наприклад, три або чотири пептидних петлі, стабілізованих β -складчастим листом і міжланцюговим бісульфідним зв'язком. Інтактні легкі ланцюги мають, наприклад, два домени (VL) і (CL), а інтактні важкі ланцюги мають, наприклад, чотири або п'ять доменів (V_H , C_H1 , C_H2 і C_H3).

У легких і важких ланцюгах змінні і постійні ділянки об'єднуються "J"-ділянкою приблизно із 12 і більше амінокислот, а важкий ланцюг включає у себе також "D"-ділянку завдовжки приблизно 10 і більше амінокислот див. публікацію [Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989), Ch. 7], включену тут у усій її повноті і для всіх цілей шляхом посилання.

Змінні ділянки кожної пари із легкого і важкого ланцюгів утворюють сайт зв'язування з антитілом. Таким чином, інтактне антитіло має два сайти зв'язування. За винятком біфункціональних або біспецифічних антитіл, ці два сайти зв'язування є однаковими. Всі ланцюги виказують однакову загальну структуру відносно консервативних каркасних ділянок (FR: framework regions), об'єднаних трьома гіперзмінними ділянками, що звуться також ділянками визначення комплементарності або CDR-ділянками. Ланцюги природного походження або ланцюги, утворені у рекомбінантні способи, можуть бути експресовані послідовністю-лідером, яка видаляється під час клітинного процесінгу для одержання зрілого ланцюга. Зрілі ланцюги можуть продукуватися також у рекомбінантний спосіб, маючи послідовність-лідера неприродного

походження, наприклад, для підсилення секреції або зміни процесінгу потрібного ланцюга.

CDR-ділянки двох зрілих ланцюгів кожної пари збігаються каркасними ділянками, дозволяючи зв'язування зі специфічним епітопом. Як легкий, так і важкий ланцюг від його N-кінця до C-кінця містить домени FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. Домен "FR4" відомий серед фахівців також під назвою D/J-ділянки змінного важкого ланцюга і J-ділянки змінного легкого ланцюга. Позначення амінокислот у кожному з доменів відповідає визначенням, даним Кабатом [Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)]. Інший варіант структурного визначення був запропонований у публікаціях [Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Nature 342:878 (1989); J. Mol. Biol. 186:651 (1989)], які у подальшому зазначаються під скороченою назвою [Chothia et al.] і включені тут в усій їхній повноті і для всіх цілей шляхом посилання.

А. Антитіла проти Аβ

Терапевтичні агенти за даним винаходом включають у себе антитіла, що специфічно зв'язуються з Аβ або іншим компонентом амілоїдних бляшок. Такі антитіла можуть бути моноклональними або поліклональними. Деякі з таких антитіл специфічно зв'язуються з агрегатованою формою Аβ, не зв'язуючись при цьому з його розчинною формою. Деякі антитіла специфічно зв'язуються з розчинною формою Аβ, не зв'язуючись при цьому з його агрегатованою формою. Деякі антитіла зв'язуються як з агрегатованою формою, так і з розчинною формою цього поліпептиду. Деякі з таких антитіл зв'язуються з короткою формою Аβ природного походження (тобто Аβ39, 40 або 41), не зв'язуючись з довгою формою Аβ природного походження (тобто Аβ42 і Аβ43). Деякі антитіла зв'язуються з довгою формою Аβ, не зв'язуючись з його короткою формою. Існують антитіла, які зв'язуються з Аβ, але не зв'язуються з повнодовжинним амілоїдним білком-попередником. Антитіла, що використовуються в терапевтичних способах лікування, у кращому варіанті мають інтактну постійну ділянку або, принаймні, частину постійної ділянки, достатню для взаємодії з Fc-рецептором. Кращим при цьому є людський ізотип IgG1, оскільки він має найвищу афінність серед людських ізотипів до FcRI-рецептора на фагоцитних клітинах. Можуть використовуватися також біспецифічні Fab-фрагменти, в яких одна гілка антитіла має специфічність до Аβ, а інша - до Fc-рецептора. Кращими є антитіла, що зв'язуються з Аβ з афінністю, не меншою, ніж приблизно 10^6 , 10^7 , 10^8 або 10^{10} M⁻¹ (включаючи проміжні значення).

Поліклональні сироватки, як правило, містять змішані популяції антитіл, що зв'язуються з декількома епітопами по довжині Аβ. Проте, поліклональні сироватки можуть бути специфічними до конкретного сегмента Аβ, такого як Аβ1-10. Моноклональні антитіла зв'язуються зі специфічним епітопом в Аβ, який може бути конформаційним або неконформаційним. Профілактична і терапевтична ефективність антитіл може бути перевірена на піддослідних трансгенних тваринах за методиками, описаними тут у розділі Приклади. Кращі моноклональні антитіла зв'язуються з епітопом у межах залишків 1-10 Аβ (з першим N-кінцевим залишком природного Аβ, позначеним цифрою 1). Деякі з кращих моноклональних антитіл зв'язуються з епітопом у межах амінокислот 1-5, а деякі - з епітопом у межах амінокислот 5-10. Деякі кращі антитіла зв'язуються з епітопами в межах амінокислот 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 або 3-7. Деякі кращі антитіла зв'язуються з епітопами, починаючи із залишків 1-3, і закінчуючи залишками 7-11 пептиду Аβ. До числа менш прийнятних антитіл належать такі, що зв'язуються з епітопами на залишках 10-15, 15-20, 25-30, 10-20, 20, 30 і 10-25 пептиду Аβ. Рекомендовано, що такі антитіла перед їх застосуванням слід добирати за їхньою активністю у випробуваннях на піддослідних мишах, як описано в розділі Приклади. Так, було знайдено, що деякі антитіла до епітопів у межах залишків 10-18, 16-24, 18-21 і 33-42 мають недостатню активність (наприклад, їм недостає здатності зменшувати бляшкове навантаження і/або усунути невритну патологію, пов'язану з хворобою Альцгеймера). У деяких способах використовуються складні моноклональні антитіла, які володіють специфічністю зв'язування з різними епітопами. Такі антитіла можуть вводитися послідовно або одночасно. Можуть використовуватися також антитіла до інших, не-Аβ-амілоїдних компонентів (наприклад, вводитися окремо або разом). Наприклад, антитіла можуть бути спрямовані на зв'язаний з амілоїдом білковий синуклеїн.

Коли про антитіло говориться, що воно зв'язується з епітопом у межах зазначених залишків, наприклад, Аβ1-5, це означає, що дане антитіло специфічно зв'язується з поліпептидом, що містить зазначені залишки (тобто, в даному прикладі Аβ1-5). Таке антитіло не обов'язково контактує з усіма залишками в межах Аβ1-5. Не обов'язково також, щоб кожне заміщення або кожна делеція амінокислоти в Аβ1-5 значно впливали на афінність зв'язування. Епітопна специфічність антитіла може бути визначена, наприклад, шляхом створення бібліотеки відображення фагів, у котрій кожний з членів відображав би свою, відмінну від інших послідовність пептиду Аβ. Після цього із такої бібліотеки відображення фагів добирають члени, що специфічно зв'язуються з випробуваним антитілом. Таким чином виділяють родину послідовностей. Зазвичай, така родина містить загальну стержневу послідовність і фланкувальні послідовності різної довжини у різних членів. Найкоротша стержнева послідовність, що виказує специфічне зв'язування з даним антитілом, визначає епітоп, зв'язуваний з антитілом. Антитіла можна випробувати також на епітопну специфічність шляхом аналізу на конкурентне зв'язування із застосуванням антитіла, епітопна специфічність якого є відомою. Наприклад, антитіла, що конкурують з антитілом 3D6 за зв'язування з Аβ, зв'язуються з тим самим або подібним епітопом, що й 3D6, тобто в межах залишків Аβ1-5. Подібним чином, антитіла, що конкурують з антитілом 10D5, зв'язуються з тим самим або подібним епітопом, тобто в межах залишків Аβ3-7. Скринінг антитіл за епітопною специфічністю дозволяє ефективно передбачати терапевтичну ефективність медикаменту. Наприклад, антитіло, визначене як таке, що зв'язується з епітопом у межах залишків 1-7 пептиду Аβ, очевидно, буде ефективним у профілактиці і лікуванні хвороби Альцгеймера згідно з методологією даного винаходу.

Моноклональні або поліклональні антитіла, що специфічно зв'язуються з кращим сегментом пептиду Аβ, не зв'язуючись при цьому з іншими ділянками Аβ, мають суттєві переваги над моноклональними антитілами, що зв'язуються з іншими ділянками, або поліклональною сироваткою до інтактного Аβ. Перше, за однакових мас дозування дози антитіл, що специфічно зв'язуються з кращими сегментами, містять більші молярні дози антитіл, ефективних у видаленні амілоїдних бляшок. По-друге, антитіла, що

специфічно зв'язуються з кращими сегментами, можуть викликати очищувальну відповідь стосовно амілоїдних відкладень, не викликаючи при цьому очищувальну відповідь проти інтактного поліпептиду APP, зменшуючи тим самим можливі побічні ефекти.

1. Вироблення нелюдських антитіл

Даним винаходом пропонуються нелюдські антитіла, наприклад, антитіла, що мають специфічність до кращих епітопів пептиду A β згідно з винаходом. Такі антитіла можуть використовуватися у складанні різноманітних терапевтичних композицій згідно з даним винаходом або, у кращому варіанті, забезпечують ділянки визначення комплементарності для вироблення гуманізованих або химерних антитіл (що докладно описано нижче). Вироблення нелюдських моноклональних антитіл, наприклад, антитіл миші, морської свинки, людиноподібної мавпи, кролика або щура може здійснюватися, наприклад, шляхом імунізації тварини пептидом A β . Використовуватися може також більш довгий поліпептид, що містить A β , або імуногенний фрагмент A β , або антиідіотипні антитіла до антитіла проти A β [Harlow & Lane, див. вище], включений тут для всіх цілей шляхом посилання. Такий імуноген може бути отриманий із природного джерела шляхом пептидного синтезу або рекомбінантної експresi. У разі необхідності імуноген може вводитися у злитому або іншому комплексному стані з білком-носієм, як описано нижче. У разі необхідності імуноген може вводитися з ад'ювантом. Термін "ад'ювант" стосується сполуки, яка при введенні разом з антигеном збільшує імунну відповідь на антиген, але при відокремленому введенні не створює імунної відповіді на антиген. Ад'юванти можуть збільшувати імунну відповідь за декількома механізмами, включаючи рекрутмент лімфоцитів, стимуляцію B- і/або T-клітин і стимуляцію макрофагів. Як описано нижче, використовуватися можуть декілька типів ад'ювантів. Кращим для імунізації піддослідних тварин є повний ад'ювант Фрейнда, а наступним за ним - неповний ад'ювант Фрейнда.

Для вироблення поліклональних антитіл, зазвичай, використовуються кролі та морські свинки. Типовий спосіб приготування поліклональних антитіл, наприклад, для пасивного захисту здійснюють таким чином. Нетрансгенних мишей у кількості 125 тварин імунізують 100мкг пептиду A β 1-42 плюс ад'ювант CFA/IFA і через 4-5 місяців піддають еутаназії. Від імунізованих мишей збирають кров. Імуноглобулін IgG відділяють від інших компонентів крові. Антитіло, специфічне до даного імуногена, можна частково очистити за допомогою афінної хроматографії. У результаті одержують у середньому приблизно 0,5-1мг імуноген-специфічного антитіла на одну тварину, тобто в цілому 60-120мг.

Мишей, зазвичай, використовують для вироблення моноклональних антитіл. Моноклональні антитіла можуть бути приготовані проти фрагмента шляхом ін'єкції цього фрагмента або більш довгої форми A β миші, приготування гібридом і скринінгу гібридом на антитіло, що специфічно зв'язується з A β . У разі необхідності антитіла піддають скринінгу для зв'язування зі специфічною ділянкою або бажаним фрагментом A β без зв'язування з іншими фрагментами A β , що не перекриваються. Останній з цих скринінгів може виконуватися шляхом визначення зв'язування антитіла з колекцією делеційних мутантів пептиду A β і визначення того, який із делеційних мутантів зв'язується з антитілом. Зв'язування може оцінюватися, наприклад, за допомогою вестерн-блотінгу або твердофазового імуоферментного аналізу ELISA. Найменший фрагмент, який виказує специфічне зв'язування з даним антитілом, визначає епітоп цього антитіла. В альтернативному варіанті епітопна специфічність може визначатися за допомогою конкурентного аналізу, в якому випробуване і еталонне антитіла конкурують між собою за зв'язування з A β . У разі конкуренції випробуваного й еталонного антитіл вони зв'язуються з одним і тим самим епітопом або епітопами, достатньо близькими, так, що зв'язування одного антитіла взаємодіє зі зв'язуванням іншого. Кращим ізотипом для таких антитіл є мишачий ізотип IgG2a або еквівалентний ізотип в інших видах. Мишачий ізотип IgG2a є еквівалентним людському ізотипу IgG1.

2. Химерні та гуманізовані антитіла

Даним винаходом висуваються також химерні і/або гуманізовані антитіла (тобто, химерні і/або гуманізовані імуноглобуліни), специфічні до бета-амілоїдного пептиду. Химерні і/або гуманізовані антитіла мають таку саму або подібну специфічність та афінність зв'язування, що й антитіло миші або інше антитіло "не-людина", яке служить як вихідний матеріал для конструювання химерного або гуманізованого антитіла.

A. Вироблення химерних антитіл

"Химерним" зветься антитіло, легколанцюговий і важколанцюговий гени якого сконструйовані, як правило, за допомогою генної інженери із сегментів імуноглобулінового гена, що належать різним видам. Наприклад, змінні (V) сегменти генів із моноклонального антитіла миші можуть бути об'єднані з постійними (C) сегментами людини, такими як IgG1 і IgG4. Кращим серед них є ізотип IgG1 людини. Отже типовим химерним антитілом є гібридний білок, що складається із V або антиген-зв'язуваного домену із антитіла миші і C або ефекторного домену із антитіла людини.

B. Вироблення гуманізованих антитіл

"Гуманізованим" зветься антитіло, яке містить принаймні один ланцюг, що включає у себе каркасні залишки змінної ділянки практично із ланцюга людського антитіла (який зветься акцепторним імуноглобуліном або антитілом) і принаймні одну ділянку визначення комплементарності, практично із антитіла миші (що зветься донорним імуноглобуліном або антитілом), див. [Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989), US 5,530,101, US 5,585,089, US 5,693,761, US 5,693,762, Selick et al., WO 90/07861, Winter, US 5,225,539], включені тут в усій їхній повноті і для всіх цілей шляхом посилання. Постійні ділянки при їх наявності походять також практично із людського імуноглобуліну.

Результатом заміщення мишачих CDR-ділянок у каркасі змінних доменів людини, з очевидністю, є збереження їхньої правильної просторової орієнтації, якщо каркас змінних доменів людини приймає таку саму або подібну конформацію, що і змінний каркас миші, із якого походять ці CDR-ділянки. Це досягається шляхом одержання змінних доменів людини із людського антитіла, каркасні послідовності якого виказують високий ступінь ідентичності зі змінними каркасними доменами миші, із яких були отримані ці CDR-ділянки. Важколанцюгові та легколанцюгові змінні каркасні ділянки можуть бути одержані із однакових або різних послідовностей людського антитіла. Послідовності людського антитіла можуть бути послідовностями людських антитіл природного походження або ж бути узгодженими послідовностями декількох людських антитіл, див. [Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger et al., Protein Engineering 6:971

(1993); Carter et al., WO 92/22653].

Після ідентифікації ділянок визначення комплементарності мишачого донорного імуноглобуліну і підходящих акцепторних імуноглобулінів людини визначають те, які залишки, якщо взагалі такі є, з цих компонентів повинні бути заміщені для оптимізації властивостей отриманого гуманізованого антитіла. У загальному випадку заміщення амінокислотних залишків людини на мишачі повинно зводитися до мінімуму, оскільки введення мишачих залишків збільшує ризик того, що це викличе реакцію антитіла "людина проти миші" (HAMA: human-anti-mouse-antibody). Для контролю HAMA-відповіді пацієнта або під час клінічних випробувань можуть застосовуватися загальноприйняті методи визначення імунної реакції. У пацієнтів, яким були введені гуманізовані антитіла, може бути проведена оцінка імуногенності на початку і в процесі проведення такої терапії. HAMA-відповідь вимірюють, наприклад, шляхом виявлення антитіл на гуманізований терапевтичний реагент у відібраних у пацієнта зразках сироватки крові, використовуючи для цього добре відомі фахівцям у даній галузі методи і, в тому числі, метод поверхневого плазмонного резонансу (BLACORE) і/або твердофазового аналізу ELISA.

Певні амінокислоти із числа каркасних залишків змінної ділянки людини вибирають для заміщення, виходячи з їх можливого впливу на CDR-конформацію і/або зв'язування з антигеном. Результатом неприродного сусідства мишачих CDR-ділянок зі змінними каркасними ділянками людини можуть бути неприродні конформаційні обмеження, які, якщо вони не скориговані заміщенням певних амінокислотних залишків, призводять до втрати афінності зв'язування.

Добір амінокислотних залишків для заміщення здійснюється частково шляхом моделювання за допомогою комп'ютера. У даному описі надана інформація щодо апаратного і програмного забезпечення для отримання тримірних відображень молекул імуноглобуліну. У загальному випадку молекулярні моделі будуються на основі визначених структур ланцюгів імуноглобуліну або їхніх доменів. Ланцюги, що підлягають моделюванню, порівнюють за подібністю їхньої амінокислотної послідовності з ланцюгами або доменами визначеної тримірної структури, і ланцюги або домени, що вказують найбільшу подібність послідовностей, вибирають як вихідні пункти для конструювання молекулярної моделі. Для моделювання вибираються ланцюги або домени, що мають принаймні 50% ідентичність послідовності, а в кращому варіанті - принаймні 60%, 70%, 80%, 90% і більше ідентичність послідовності. Визначені вихідні структури модифікують так, щоб одержати розбіжності між фактичними амінокислотами в імуноглобулінових ланцюгах або доменах, що моделюються, і тими, що належать вихідній структурі. Після цього модифіковані структури збирають у складний імуноглобулін. Нарешті, модель доводять за принципом енергетичної мінімізації, витримуючи належну відповідність міжатомних відстаней і витримуючи у хімічно припустимих межах довжини і кути зв'язків.

Добір амінокислотних залишків для заміщення може також бути здійснений частково шляхом вивчення характеристик амінокислот у конкретних положеннях або шляхом емпіричних спостережень за ефектами заміщення або мутагенезом конкретних амінокислот. Наприклад, якщо амінокислота каркасного залишку змінної ділянки миші відрізняється від амінокислоти вибраного каркасного залишку змінної ділянки людини, то, зазвичай, каркасну амінокислоту людини слід замінити на еквівалентну каркасну кислоту із антитіла миші за умови, що ця амінокислота, як очікується:

- (1) нековалентно зв'язується безпосередньо з антигеном;
- (2) прилягає до CDR-ділянки;
- (3) іншим чином взаємодіє з CDR-ділянкою (наприклад за результатами моделювання на комп'ютері перебуває в межах 3-6Å від CDR-ділянки); або
- (4) бере участь в інтерфейсі VL-VH.

Залишки, що "нековалентно зв'язуються безпосередньо з антигеном", містять амінокислоти в положеннях каркасних ділянок, які мають добру імовірність безпосередньо взаємодіяти з амінокислотами антигена відповідно до усталених хімічних сил, зумовлених, наприклад, водневим зв'язком, силами Ван-дер-Ваальса, гідрофобними взаємодіями і под.

CDR- і каркасні ділянки є такими, як визначено в роботах [Kabat et al., або Chothia et al., див вище]. Якщо каркасні залишки, як визначено в [Kabat et al., див вище], складають структурні залишки петлі, як визначено в [Chothia et al., див вище], то амінокислоти, наявні в антитілі миші, можуть вибиратися для заміщення в гуманізоване антитіло. Залишки, які "межують з CDR-ділянкою", включають у себе амінокислотні залишки в положеннях, що безпосередньо прилягають до однієї або більше CDR-ділянок у первинній послідовності гуманізованого ланцюга імуноглобуліну, наприклад, у положеннях, суміжних із CDR, як визначено Кабатом, або із CDR, як визначено Чотья, наприклад, в [Chothia and Lesk, JMB 196:901 (1987)]. Ці амінокислоти з особливо великою імовірністю взаємодіють з амінокислотами CDR-ділянок і, якщо вони вибрані із акцептора, порушують донорні CDR-ділянки і знижують афінність. Крім того, суміжні амінокислоти можуть взаємодіяти безпосередньо з антигеном [Amit et al., Science, 233:747 (1986)] (включено тут шляхом посилання), і добір цих амінокислот від донора може бути бажаним для підтримання всіх контактів антигена, що забезпечують афінність в оригінальному антитілі.

До числа залишків, які "взаємодіють іншим чином з CDR-ділянкою" належать такі, що за результатами аналізу вторинної структури мають просторову орієнтацію, достатню для впливу на CDR-ділянку. В одному з варіантів здійснення винаходу залишки, які "іншим чином взаємодіють із CDR-ділянкою", ідентифікуються шляхом аналізу тримірної моделі донорного імуноглобуліну (наприклад, моделі, побудованої за допомогою комп'ютера). Тримірна модель, зазвичай, оригінального донорного антитіла, показує, що певні амінокислоти ззовні CDR-ділянок розташовані близько до них і мають добру можливість взаємодіяти з амінокислотами на CDR-ділянках під-силами водневих зв'язків, силами Ван-дер-Ваальса, гідрофобних взаємодій і под. У цих положеннях амінокислот може вибиратися амінокислота донорного, а не акцепторного імуноглобуліну. Амінокислоти, що відповідають цьому критерію, в загальному випадку будуть мати атом бічного ланцюга на відстані приблизно 3Å від того чи іншого атома на CDR-ділянках і повинні містити атом, який би міг взаємодіяти з атомами CDR-ділянок відповідно до усталених хімічних сил на зразок перелічених вище.

Якщо це є атоми, які можуть утворювати водневі зв'язки, то зазначена відстань 3Å вимірюється між їхніми ядрами. Але якщо ці атоми не утворюють зв'язку, то 3 Å відстань вимірюється між поверхнями Ван-дер-Ваальса. Таким чином, в останньому випадку, де атоми вважаються здатними на взаємодію, їхні ядра

повинні перебувати на відстані приблизно 6Å ($3A + \text{сума вандерваальсових радіусів}$). У багатьох випадках відстань між ядрами складає від 4 або 5 Å до 6Å. При визначенні того, чи може та чи інша амінокислота взаємодіяти з CDR-ділянками, до розгляду не слід приймати останні 8 амінокислот важколанцюгової CDR 2 як частини CDR, оскільки з точки зору структури ці 8 амінокислот у більшій мірі діють як частина каркасу.

Амінокислоти, здатні взаємодіяти з амінокислотами на CDR-ділянках, можуть бути ідентифіковані також іншим чином. Доступну для розчинника площу поверхні кожної каркасної амінокислоти обчислюють двома шляхами: (1) в інтактному антитілі і (2) у гіпотетичній молекулі, що складається із антитіла з видаленими його CDR-ділянками. Суттєва різниця між цими величинами, що складає близько 10 і більше квадратних ангстремів, показує, що доступ каркасної амінокислоти у розчинник принаймні частково блокований CDR-ділянками, а отже ця амінокислота перебуває з останніми в контакті. Доступна для розчинника площа поверхні амінокислоти може бути обчислена на основі тримірної моделі антитіла за допомогою відомих алгоритмів, див., наприклад, [Connolly, J. Appl. Cryst. 16:548 (1983); Lee and Richards, J. Mol. Biol. 55:379 (1971)], включені тут шляхом посилання. Не виключена також можливість непрямої взаємодії каркасних амінокислот з CDR-ділянками внаслідок залучення конформації іншої каркасної амінокислоти, яка, у свою чергу, контактує з CDR-ділянками.

Відомо, що амінокислоти в декількох положеннях каркасу здатні взаємодіяти з CDR-ділянками в багатьох антитілах [Chothia and Lesk, *ibid.* вище; Chothia et al., *ibid.* вище; Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990)], включені тут шляхом посилання. Відомо також, що взаємодіяти з CDR-ділянками в багатьох антитілах особливо здатними є амінокислоти в положеннях 2, 48, 64 і 71 легкого ланцюга і в положеннях 26-30, 71 і 94 важкого ланцюга (нумерація Кабата). Амінокислоти в положеннях 35 легкого ланцюга і 93, 103 важкого ланцюга, очевидно, також взаємодіють із CDR-ділянками. В усіх цих перелічених положеннях краще в гуманізованому імуноглобуліні мати донорну, а не акцепторну амінокислоту (якщо вони різняться). З іншого боку, іноді щоб запобігти втраті афінності в гуманізованому імуноглобуліні, певні залишки, наприклад, перші п'ять амінокислот легкого ланцюга, здатні взаємодіяти з CDR-ділянкою, можуть бути вибрані із акцепторного імуноглобуліну.

До числа залишків, які "беруть участь у VL-VH-інтерфейсі" або у "пакуванні залишків", належать ті, що перебувають на поверхні розділу між VL і VH, як визначено, наприклад, у роботі [Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985) або Chothia et al., *ibid.* вище]. У загальному випадку нетривіальні заповнювальні залишки, якщо вони відрізняються від залишків у людському каркасі, повинні бути збережені в гуманізованому антитілі.

Взагалі, заміщуються одна або більше амінокислот, що задовольняють вищевикладеним критеріям. У деяких варіантах здійснення винаходу заміщуються всі амінокислоти або більшість амінокислот, котрі задовольняють цим критеріям. У випадку неясності того, чи задовольняє та чи інша амінокислота вищевикладеним критеріям, виробляють альтернативний варіант імуноглобулінів, один з яких має дане невизначене заміщення, у той час як інший його не має. Приготований таким чином альтернативний варіант імуноглобулінів можна піддати випробуванням на потрібну активність будь-яким із описаних тут методів і за його результатами вибрати кращий із імуноглобулінів.

Звичайно, CDR-ділянки в гуманізованих антитілах є практично ідентичними, а у більшості випадків - ідентичними відповідним CDR-ділянкам донорного антитіла. Хоча зазвичай це і не бажано, але в деяких випадках можна здійснити одне і більше консервативних заміщень амінокислот CDR-залишків без суттєвого погіршення афінності зв'язування отриманого таким чином гуманізованого імуноглобуліну. Консервативними заміщеннями створюють відповідні комбінації залишків, такі як: gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gin; ser, thr; lys, arg; phe, tyr.

Додатковими кандидатами на заміщення є акцепторні людські каркасні амінокислоти, що є нетривіальними або "рідкими" для людського імуноглобуліну в цьому положенні. Такі амінокислоти можуть заміщуватися на амінокислоти із еквівалентного положення мишачого донорного антитіла або із еквівалентних положень більш типових імуноглобулінів людини. Наприклад, заміщення може бути бажаним, коли амінокислота на каркасній ділянці акцепторного імуноглобуліну людини є для цього положення рідкою, а відповідна амінокислота в донорному імуноглобуліні є загальною для цього положення в послідовностях людського імуноглобуліну, або ж коли амінокислота в акцепторному імуноглобуліні є рідкою для цього положення, а відповідна амінокислота в донорному імуноглобуліні є також рідкою, порівняно з іншими людськими послідовностями. Цей критерій є гарантією того, що атипова амінокислота людського каркасу не зруйнує структури антитіла. Крім того, внаслідок заміщення нетривіальної людської акцепторної амінокислоти на амінокислоту від донорного антитіла, що виявляється типовою для людських антитіл, гуманізоване антитіло може стати менш імуногенним.

Використовуваний тут термін "рідкий" стосується амінокислоти, що з'являється в даному положенні у менш, ніж приблизно 20%, але зазвичай у менш, ніж приблизно 10% послідовностей типового зразка послідовностей, а термін "загальний" стосується амінокислоти, що з'являється у більш, ніж приблизно 25%, а в більшості випадків у більш, ніж приблизно 50% послідовностей типового зразка. Наприклад, усі людські послідовності змінних ділянок легких і важких ланцюгів групуються відповідним чином по "підгрупах" послідовностей, що є особливо гомологічними одна до одної і мають однакові амінокислоти в певних критичних положеннях [Kabat et al., *ibid.* вище]. При визначенні того, чи є та чи інша амінокислота в людській акцепторній послідовності "рідкою" або "загальною" серед людських послідовностей, часто слід розглядати лише ті людські послідовності, які входять в одну і ту саму підгрупу, що й акцепторна послідовність.

Додатковими кандидатами на заміщення є акцепторні людські каркасні амінокислоти, які ідентифікуються як частина CDR-ділянки за альтернативним визначенням, запропонованим у [Chothia et al., *ibid.* вище]. Крім того, додатково можуть заміщуватися акцепторні людські каркасні амінокислоти, які ідентифікуються як частина CDR-ділянки за визначенням AbM і/або контактним визначенням. Особливо слід зауважити, що CDR1 у змінному важкому ланцюзі визначається як така, що включає у себе залишки 26-32.

Кандидатами на заміщення є також акцепторні каркасні залишки, які відповідають рідкому або нетривіальному донорному каркасному залишку. Рідкими або нетривіальними донорними каркасними

залишками є такі залишки, які є рідкими або нетривіальними (згідно з даним тут визначенням) для мишачих антитіл у даному положенні. Для мишачих антитіл підгрупа може бути визначена згідно з угодою Кабата та ідентифікованими положеннями залишків, які відрізняються від цієї угоди. Ці специфічні для донора відмінності можуть вказувати на соматичні мутації в мишачій послідовності, які підсилюють активність. Нетривіальні залишки, котрі згідно з передбаченнями повинні впливати на зв'язування, зберігаються, а залишки, котрі повинні бути неважливими для зв'язування, заміщуються.

Заміщуватися можуть також залишки незародкової лінії, які з'являються на акцепторній каркасній ділянці. Наприклад, якщо при порівняльному аналізі первинної структури акцепторного ланцюга антитіла (тобто, ланцюга людського антитіла, який має значну послідовнісну ідентичність з донорним ланцюгом антитіла) з ланцюгом антитіла зародкової лінії (який подібним чином виказує значну послідовнісну ідентичність з донорним ланцюгом) залишки, що не узгоджуються між каркасом акцепторного ланцюга і каркасом ланцюга зародкової лінії, можуть бути заміщені на відповідні залишки із послідовності зародкової лінії.

Окрім розглянутих вище специфічних амінокислотних заміщень, каркасні ділянки гуманізованих імунoglobulinів є, зазвичай, практично ідентичними, а у більшості випадків - ідентичними каркасним ділянкам людських антитіл, із яких вони були виведені. Зрозуміло, що багато амінокислот на каркасній ділянці робить невеликий або непрямий внесок у специфічність або афінність антитіла. Отже багато індивідуальних консервативних заміщень каркасних залишків можуть бути прийнятними без відчутних змін специфічності або афінності отриманого людського імунoglobulinу. Таким чином, в одному із варіантів здійснення винаходу змінна каркасна ділянка гуманізованого імунoglobulinу має принаймні 85% послідовнісну ідентичність з людською послідовністю змінної каркасної ділянки або узгодженість таких послідовностей. В іншому варіанті здійснення змінна каркасна ділянка гуманізованого імунoglobulinу має, принаймні, 90%, у кращому випадку 95%, у ще кращому - 96%, 97%, 98% або 99% послідовнісну ідентичність з людською послідовністю змінної каркасної ділянки або узгодженість таких послідовностей. Проте, у загальному випадку такі заміщення є небажаними.

У кращому варіанті гуманізовані антитіла виказують афінність специфічного зв'язування з антигеном, принаймні, 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} M^{-1} . Звичайно, верхня межа афінності зв'язування гуманізованих антитіл з антигеном є в три, чотири і п'ять разів вищою, ніж у донорного імунoglobulinу. Часто нижня межа афінності зв'язування також в три, чотири і п'ять разів перевищує таку межу донорного імунoglobulinу. В альтернативному варіанті афінність зв'язування може порівнюватися з афінністю зв'язування гуманізованого антитіла, що не має заміщень (наприклад, антитіла, що має донорні CDR-ділянки й акцепторні FR, але не має FR-заміщень. У цих випадках зв'язування оптимізованого антитіла (із заміщеннями) є, щонайменше, в два-три рази сильнішим або в три-п'ять разів сильнішим, ніж зв'язування незаміщеного антитіла. Для порівняння можна визначити активність різноманітних антитіл, наприклад, за допомогою BIACORE (тобто поверхневого плазмонного резонансу із використанням немічених реагентів) або аналізу конкурентного зв'язування.

С. Вироблення гуманізованих антитіл 3D6

У кращому варіанті здійснення даного винаходу розкривається гуманізоване антитіло до N-кінця пептиду A β , зокрема, для використання в терапії або діагностиці згідно з даним описом. Особливо підходящим вихідним матеріалом для одержання гуманізованих антитіл є 3D6. Антитіло 3D6 є специфічним до N-кінця пептиду A β і виказало свою здатність опосередковувати фагоцитоз (наприклад, індукувати фагоцитоз) амілоїдної бляшки (див. Приклади I-V). Клонування і секвенування кДНК, що кодує змінні ділянки важкого і легкого ланцюга антитіла 3D6, описані у Прикладі VI.

Підходящі послідовності людського акцепторного антитіла ідентифікуються шляхом комп'ютерного порівняння амінокислотних послідовностей змінних ділянок миші з послідовностями відомих антитіл людини. Таке порівняння проводять окремо для важкого і легкого ланцюгів, але принцип його в обох випадках залишається однаковим. Зокрема, змінні домени від людських антитіл, каркасні послідовності яких виказують високий ступінь послідовнісної ідентичності з каркасними ділянками VL і VH миші, були ідентифіковані шляхом опитування бази даних Кабата, використовуючи BLAST NCBI (доступний через інтернет-сервер NCBI Національних установ з охорони здоров'я), з відповідними каркасними послідовностями миші. В одному з варіантів здійснення винаходу вибираються акцепторні послідовності, що мають більш ніж 50% послідовнісну ідентичність з мишачими донорними послідовностями. У більш кращому варіанті вибираються послідовності акцепторного антитіла з 60%, 70%, 80%, 90% або більшою ідентичністю.

За даними [Kabat et al., див. вище] комп'ютерне порівняння 3D6 виявило, що легкий ланцюг цього антитіла має найбільшу послідовнісну ідентичність з легкими ланцюгами людини субтипу каппа II, а важкий ланцюг антитіла 3D6 має найбільшу послідовнісну ідентичність з людськими важкими ланцюгами субтипу III. Отже легкі і важкі каркасні людські ділянки слід виводити із людських антитіл цих субтипів або із узгоджених послідовностей таких субтипів. Кращими змінними ділянками людських легких ланцюгів, що виказують найбільшу послідовнісну ідентичність з відповідною ділянкою від 3D6, є такі, що одержуються із антитіл з ID номерами за Кабатом 019230, 005131, 005058, 005057, 005059, U21040 і U41645, серед яких найкращою є ділянка 019230. Кращими змінними ділянками важких людських важких ланцюгів, що виказують найбільшу послідовнісну ідентичність з відповідною ділянкою від 3D6, є такі, що отримуються із антитіл з ID номерами за Кабатом 045919, 000459, 000553, 000386 і M23691, серед яких найкращою є ділянка 045919.

Слідом за цим залишки для заміщення вибирають таким чином. Якщо амінокислоти на змінній каркасній ділянці антитіла 3D6 і на змінній каркасній ділянці еквівалентного людського антитіла є різними, то каркасна людська амінокислота, зазвичай, повинна заміщуватися еквівалентною мишачою амінокислотою за умови, що, як очікується, ця амінокислота:

- (1) встановлює безпосередній нековалентний зв'язок з антигеном;
- (2) є сусідньою до CDR-ділянки, є частиною CDR-ділянки згідно з альтернативним визначенням, запропонованим у [Chothia et al., див. вище], або іншим чином взаємодіє з CDR-ділянкою (наприклад,

перебуває на відстані 3Å від CDR-ділянки) (наприклад, амінокислоти в положеннях L2, H49 і H94 антитіла 3D6), або

(3) бере участь у VL-VH-інтерфейсі (наприклад, амінокислоти в положеннях L36, L46 і H93 антитіла 3D6).

Комп'ютерне моделювання змінних ділянок важких і легких ланцюгів антитіла 3D6 і гуманізація антитіла 3D6 описані у Прикладі VII. Вони полягають у створенні тримірної моделі на базі найближчих визначених структур мишачого антитіла для важкого і легкого ланцюгів. З цією метою як матриця для моделювання легкого ланцюга антитіла 3D6 було вибрано антитіло, позначене як 1CR9 [Protein Data Bank (PDB) ID: 1CR9, Kanu et al., J. Mol. Biol. 293:855 (1999)], а як матриця для моделювання важкого ланцюга було вибрано антитіло, позначене як 1OPG [PDB ID: 1OPG, Kodandapani et al., J. Biol. Chem. 270:2268 (1995)]. Ця модель була надалі поліпшена серією стадій енергетичної мінімізації для видалення несприятливих контактів між атомами й оптимізації електростатичних і вандерваальсових взаємодій. Визначена структура 1qkz [PDB ID: 1QKZ, Derrick et al., J. Mol. Biol. 293:81 (1999)] була вибрана як матриця для моделювання CDR3 важкого ланцюга, оскільки 3D6 і 1OPG не вказують значної послідовнішої гомології на цій ділянці при їх зіставленні для порівняльного аналізу.

Інформацію щодо тримірних структур описаних тут антитіл можна одержати, наприклад, у Банку даних білків для дослідницького співробітництва зі структурної біоінформатики (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics' Protein Data Bank (PDB)). Доступ до банку PDB є вільним через інтернет World Wide Web, а сам банк описаний у [Berman et al., (2000) Nucleic Acids Research, 28:235]. Комп'ютерне моделювання дозволяє здійснювати ідентифікацію залишків, що взаємодіють із CDR-ділянками. Комп'ютерна модель структури антитіла 3D6 може, у свою чергу, бути вихідним пунктом для прогнозування тримірної структури антитіла, що містить ділянки визначення комплементарності 3D6, заміщені в людських каркасних структурах. Можуть бути сконструйовані додаткові моделі, що представляють структуру з подальшими заміщеннями амінокислот.

У загальному випадку бажаним є заміщення однієї, більшості або всіх амінокислот, що задовольняють вищевизначеним критеріям. Відповідно до цього, гуманізовані антитіла за даним винаходом будуть, зазвичай, містити заміщення каркасного залишку легкого ланцюга людини на відповідний залишок антитіла 3D6, принаймні, в 1, 2 або 3, а в більшості випадків у 4 таких положеннях: L1, L2, L36 і L46. Гуманізовані антитіла, зазвичай містять також заміщення каркасного залишку важкого ланцюга людини на відповідний залишок антитіла 3D6, щонайменше, в 1, 2, а іноді в 3 таких положеннях: H49, H93 і H94. Гуманізовані антитіла можуть також містити заміщення каркасного залишку важкого ланцюга на відповідний залишок зародкової лінії, щонайменше, в 1, 2, а іноді в 3 таких положеннях: H74, H77 і H89.

Проте, може мати місце певна невизначеність щодо того, чи задовольняє дана амінокислота вищевизначеним критеріям, внаслідок чого створюються альтернативні варіанти імуноглобулінів, один із яких має дане конкретне заміщення, а інший його не має. У тих випадках, де внаслідок заміщення мишачим залишком вводиться залишок, що є рідким у людських імуноглобулінах у даному конкретному положенні, може бути бажаним перевірити антитіло на активність з даним конкретним заміщенням і без нього. Якщо активність (наприклад, афінність зв'язування і/або специфічність зв'язування) є приблизно однаковою як із заміщенням, так і без нього, то це означає, що антитіло без заміщення може бути більш прийнятним, оскільки це згідно із викладеними вище положеннями повинно викликати менш сильну НАМА-відповідь.

Іншими кандидатами на заміщення є каркасні акцепторні амінокислоти людини, що є нетривіальними для людського імуноглобуліну в цьому положенні. Ці амінокислоти можуть заміщуватися на амінокислоти із еквівалентного положення більш типових імуноглобулінів людини. В альтернативному варіанті амінокислоти із еквівалентних положень у 3D6 миші можуть вводитися в людські каркасні ділянки, якщо такі амінокислоти є типовими для людського імуноглобуліну в еквівалентних положеннях.

В інших варіантах здійснення, де каркасним акцепторним імуноглобуліном людського легкого ланцюга є імуноглобулін з номером Kabat ID 019230, легкий ланцюг містить заміщення, принаймні, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, а у більшості випадків у 13 таких положеннях: L7, L10, L12, L15, L17, L39, L45, L63, L78, L83, L85, L100 і L104. В інших подібних варіантах здійснення, де каркасним акцепторним імуноглобуліном важкого ланцюга людини є імуноглобулін за номером Kabat ID 045919, важкий ланцюг містить заміщення, щонайменше, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, а у більшості випадків у 15 таких положеннях: H3, H5, H13, H16, H19, H40, H41, H42, H44, H72, H77, H82A, H83, H84 і H108. Ці положення є заміщеними на амінокислоту із еквівалентного положення людського імуноглобуліну, що має більш типовий амінокислотний залишок. Приклади підходящих для заміщення амінокислот наведені на Фіг.1 і 2.

Кандидатами на заміщення можуть бути також залишки незародкової лінії, що зустрічаються на каркасній ділянці. Комп'ютерне порівняння 3D6 з відомими зародковими послідовностями виявило, що важкі ланцюги, які вказують найбільший ступінь послідовної ідентичності, включають у себе такі послідовності змінної ділянки зародкової лінії: VH3-48, VH3-23, VH3-7, VH3-21 і VH3-11, серед яких найкращою є послідовність VH3-23. Порівняльний аналіз імуноглобуліну під номером Kabat ID 045919 з послідовністю VH3-23 показує, що залишки H74, H77 і/або H89 можуть бути вибрані для заміщення на відповідні залишки зародкової лінії (наприклад, залишки H74, H77 і/або H89 при порівнянні Kabat ID 045919 і VH3-23). Подібним чином послідовності зародкової лінії, що мають найбільший ступінь ідентичності з легким ланцюгом 3D6, включають у себе A1, A17, A18, A2 і A19, серед яких найкращою є A19. Залишки, що не узгоджуються між акцепторним каркасом вибраного легкого ланцюга і однією з цих послідовностей зародкової лінії, можуть бути вибрані для заміщення на відповідний залишок зародкової лінії.

У Табл. 1 подані результати аналізу послідовностей ділянок VH і VL антитіла 3D6. Тут представлені додаткові мишачі і людські структури, що можуть використовуватися у комп'ютерному моделюванні антитіла 3D6, а також додаткові людські антитіла і послідовності зародкової лінії, що можуть використовуватися у виборі амінокислотних заміщень. У Табл. 1 також зазначені рідкі мишачі залишки. Ідентифікація рідких мишачих залишків здійснюється шляхом порівняння донорних послідовностей VL і/або VH з послідовностями інших членів підгрупи, до якої належать донорні послідовності VL і/або VH (за Кабатом), та ідентифікації положень залишків, що відрізняються від узгоджених. Ці специфічні донорні відмінності можуть вказувати на наявність соматичних мутацій, що підсилюють активність. Нетривіальні або

рідкі залишки, близькі до сайту зв'язування, можуть контактувати з антигеном, що робить бажаним зберегти мишачий залишок. Проте, якщо нетривіальний мишачий залишок не є важливим для зв'язування, то краще використовувати відповідний акцепторний залишок, оскільки мишачий залишок може утворювати в гуманізованому антитілі імуногенні неоепітопи. У тому випадку, якщо нетривіальний залишок у донорній послідовності є фактично загальним залишком у відповідній акцепторній послідовності, цілком ясно, що кращим є акцепторний залишок.

Таблиця 1

Характеристики послідовності V-ділянки антитіла 3D6

Ланцюг	Важкий	Легкий
Підгрупа миші (Kabat seq ID NO:)	IIID (002688)	II (005840-005844, 005851-005853, 005857, 005863)
Гомологи мишей (Кабат/Генбанк)	002727/163.1'CL 002711/H35-C6'CL 002733/8-1-12-5-3-1(A2-1)'CL 002715/ASWA2'CL 020669/№14'CL	005840/1210.7 005843/42.4b.122'CL 005842/BXW-14'CL 005841/42.7B3.2'CL 005851/36-60CRI-
Рідкі амінокислоти (частота виникнення в класі, %)	N40 (0,233%) D42 (0,699%)	Y1 (0,035%) I15(3,3%) D27(0,867%)-CDR1 I78 (0,677%) L85 (0,625%) W89(0,815%)-CDR3 K106A (0,295%)
Підгрупа людини	III (000488-000491, 000503, 000624)	II (005046)
Групування канонічних CDR за Chothia [приклад: pdb]	H1: клас 1 [2fbj] H2: клас 3 [1igc]	L1: клас 4 [1rmf] L2: клас 1 [1lmk] L3: клас 1 [1tet]
Найближчі визначені структури миші	PDB ID: 1OPG Kodandapani et al., див. вище; (72% 2Å)	PDB ID: 1CR9; Kanyo et al., див. вище; (94%, 2 Å) PDB ID: 1NLD; Davies et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallog. 53:186 (1997); (98%, 2,8 Å)
Найближчі визначені структури людини	1VH(68%, nmr) 443560 (65%, IgG, λ мієлома, 1,8Å) KOL/2FB4H (60%, мієлома, 3Å)	1LVE(57%, LEN) 1B6DA (54%, B-J димер, 2,8Å); 1VGEL (54%, аутоантитіло)
Результати опитування зародкової лінії (Hu) (найвищий 4)	VH3-48 (4512283/BAA75032.1) VH3-23 (4512287/BAA75046.1) VH3-7 (4512300/BAA75056.1) VH3-21 (4512287/BAA75047.1) VH3-11 (4152300/BAA75053.1)	A1 (x63402) A17 (x63403) A18 (x63396) A2 (m31952) A19 (x63397)

*Важкий ланцюг і легкий ланцюг від одного й того самого антитіла (O-81, Hirabayashi et al. NAR 20:2601).

Доступ до зазначених тут послідовностей Kabat ID можна отримати, наприклад, у Базі даних Кабата щодо послідовностей білків імунологічного спрямування від Відділу імунологічної інженери Північно-західного університету. Інформація стосовно тримірних структур описаних тут антитіл може бути отримана, наприклад, із Банку даних стосовно білків (PDB: Protein Data Bank) Дослідницького товариства зі структурної біоінформації (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics). Доступ до банку PDB можна отримати через мережу інтернету (World Wide Web internet), а сам банк описаний у [Berman et al. (2000) Nucleic Acids Research, p. 235-242]. Інформацію щодо зазначених тут послідовностей генів зародкової лінії можна отримати, наприклад, із Базі даних Національного центру з біотехнологічної інформації (NCBI) у колекціях Igh, kappa-Ig та lambda-Ig генів зародкової лінії V (як відділку Національної медичної бібліотеки (NLM: National Library of Medicine) при Національних закладах з охорони здоров'я (NIH: National Institutes of Health). База даних стосовно гомологічних досліджень NCBI "Гени зародкових ліній імуноглобуліну" розповсюджується продуктом IgG BLAST™.

В одному із кращих варіантів здійснення винаходу гуманізоване антитіло містить (i) легкий ланцюг зі змінним доменом, що містить CDR-ділянки VL мишачого 3D6 і людський акцепторний каркас, який має, принаймні, один, краще, якщо два, три або чотири залишки, вибрані із групи, що складається із L1, L2, L36 і L46, заміщених на відповідний залишок 3D6, і (ii) важкий ланцюг, що містить CDR-ділянки VH антитіла 3D6 і людський акцепторний каркас, який має, принаймні, один, краще, якщо два або три залишки, вибрані із групи, що складається із H49, H93 і H94, заміщених на відповідний залишок антитіла 3D6, і в разі необхідності, принаймні, один, краще, якщо два або три залишки, вибрані із групи, що складається із H74, H77 і H89, заміщених на відповідний залишок зародкової лінії людини.

У ще кращому варіанті здійснення винаходу гуманізоване антитіло містить (i) легкий ланцюг зі змінним доменом, що містить CDR-ділянки VL мишачого 3D6 і людський акцепторний каркас, який має залишок 1, заміщений на tyr (Y), залишок 2, заміщений на val (V), залишок 36, заміщений на leu (L) і/або залишок 46,

заміщений на arg (R), і (ii) важкий ланцюг, що містить CDR-ділянки VH антитіла 3D6 і людський акцепторний каркас, який має залишок 49, заміщений на ala (A), залишок 93, заміщений на val (V) і/або залишок 94, заміщений на arg (R), і в разі необхідності має залишок 74, заміщений на ser (S), залишок 77, заміщений на thr (T) і/або залишок 89, заміщений на val (V).

В особливо кращому варіанті здійснення даного винаходу гуманізоване антитіло має описані тут структурні характеристики, а також має, принаймні, одну (краще, якщо дві, три, чотири або всі) такі активності: (1) зв'язування з агрегатованим Aβ₁₋₄₂ (наприклад, за результатами аналізу ELISA); (2) зв'язування з Aβ у бляшках (наприклад, забарвлення AD- і/або PDAPP-бляшок); (3) зв'язування з Aβ з афінністю, що в два, три рази перевищує афінність зв'язування з химерним 3D6 (наприклад, 3D6, що має мишачі CDR-ділянки і людський акцептор FR); (4) опосередкування фагоцитозу Aβ (наприклад, в аналізі на фагоцитоз *ex vivo* згідно з даним описом); і (5) додання гематоенцефалічного бар'єра (наприклад, демонстрація короточасної локалізації в мозку, наприклад, у піддослідних тварин PDAPP згідно з даним описом).

В іншому варіанті здійснення винаходу гуманізоване антитіло має описані тут структурні характеристики, зв'язується з Aβ таким чином або з такою достатністю афінності, що відбувається, принаймні, один із таких ефектів *in vivo*: (1) знижується Aβ-бляшкове навантаження; (2) відвертається утворення бляшок; (3) знижуються рівні розчинного Aβ; (4) зменшується невритна патологія, пов'язана з амілоїдогенним розладом; (5) зменшується або поліпшується, принаймні, один фізіологічний симптом, пов'язаний з амілоїдогенним розладом; і/або (6) поліпшується когнітивна функція.

Можливим є також варіант здійснення винаходу, в якому гуманізоване антитіло має описані тут структурні характеристики і специфічно зв'язується з епітопом, що містить залишки 1-5 або 3-7 пептиду Aβ.

3. Людські антитіла

Людські антитіла проти Aβ одержуються в різноманітні способи, описані нижче. Деякі людські антитіла вибирають, проводячи експерименти з конкурентного зв'язування в розрахунку на одержання такої самої епітопічної специфічності, що і конкретне мишаче антитіло на зразок моноклонального антитіла, розглянутого в даному описі. Людські антитіла можна вибрати також за конкретною епітопічною специфічністю, використовуючи як імуноген лише фрагмент пептиду Aβ, і/або шляхом скринінгу антитіл проти колекції делеційних мутантів пептиду Aβ. Людські антитіла у кращому варіанті мають специфічність ізотипу IgG1 людини.

а. Метод триом

Базовий підхід і типова клітина-партнер SPAZ-4, що зливається, для застосування в цьому методі були описані в [Oestberg et al., Hybridoma 2:361 (1983); Oestberg, US Patent No. 4,634,664; Engleman et al., US Patent 4,634,666] (включених тут в усій їхній повноті і для всіх цілей шляхом посилання). Одержані за цим методом клітинні лінії, що продукують антитіла, звуться "триомами", оскільки вони походять від трьох клітин - двох людських клітин і однієї клітини миші. Спочатку лінію мієломи миші зливають із В-лімфоцитом людини, отримуючи ксеногенну гібридну клітину, що не продукує антитіл, таку як клітинна лінія SPAZ-4, описана в [Oestberg et al., див. вище]. Після цього ксеногенну клітину зливають з імунізованим людським В-лімфоцитом, отримуючи клітинну лінію триоми, що продукує антитіла. Було встановлено, що триоми продукують антитіла більш стабільно, ніж звичайні гібридоми, отримані із людських клітин.

Імунізовані В-лімфоцити одержують із крові, селезінки, лімфотичних вузлів або кісткового мозку людського донора. Якщо потребуються антитіла проти специфічного гена або епітопу, то бажано для імунізації використовувати цей антиген або його егігоп. Імунізацію можна здійснювати як *in vivo*, так і *in vitro*. Для імунізації *in vivo* В-клітини звичайно беруть у людини, імунізованої пептидом Aβ, його фрагментом, більшим поліпептидом, що містить Aβ або його фрагмент, або ж антиідіотиповим антитілом до антитіла проти Aβ. У деяких методах В-клітини беруть у того ж пацієнта, якому і призначається терапія антитілами. Для імунізації *in vivo* В-лімфоцити, зазвичай, піддають дії антигена протягом 7-14 днів у такому середовищі, як RPMI-1640 (див. вище [Engleman et al.]), доповненому 10% людської плазми.

Імунізовані В-лімфоцити зливають із ксеногенними гібридними клітинами на зразок SPAZ-4, користуючись для цього добре відомими методами. Наприклад, ці клітини обробляють 40-50% поліетиленгліколем молекулярною масою 1000-4000 при температурі приблизно 37°C протягом 5-10 хвилин. Клітини відділяють від суміші злиття і розподіляють у середовищі, що є селективним для бажаних гібридів, наприклад, у НАТ (ГАТ-середовище) або АН. Клоні, що виділяють антитіла з потрібною специфічністю зв'язування, ідентифікуються шляхом аналізу триомного культурного середовища на здатність зв'язуватися з Aβ або його фрагментом. Триоми, що продукують людські антитіла з бажаною специфічністю, субклонують у спосіб обмежувального розрідження і вирощують у культурному середовищі *in vitro*. Отримані таким чином триомні клітинні лінії піддають випробуванням на здатність зв'язуватися з Aβ або його фрагментом.

Хоча триоми є генетично стабільними, проте вони не продукують антитіл на дуже високих рівнях. Рівні експресії можуть бути підвищені шляхом клонування генів антитіл із триоми в один або більше векторів експресії і трансформування вектора у стандартні клітинні лінії ссавців, бактеріальні або дріжджові клітинні лінії.

б. Трансгенні ссавці, що не є людьми

Людські антитіла проти Aβ можуть вироблятися також із трансгенних ссавців-"не-людей", що мають трансгени, які кодують, принаймні, сегмент локусу людського імуноглобуліну. Зазвичай, локус ендегенного імуноглобуліну такого трансгенного ссавця є функціонально неактивним. У кращому варіанті сегмент локусу людського імуноглобуліну включає у себе неперепудовані послідовності важколанцюгових і легколанцюгових компонентів. Як інактивація ендегенних імуноглобулінових генів, так і введення екзогенних імуноглобулінових генів можуть досягатися шляхом цільової гомологічної рекомбінації або шляхом уведення YAC-хромосом. Трансгенні ссавці після цього процесу є здатними до функціонального реаранжування послідовностей компонентів імуноглобуліну і експресії популяції антитіл різноманітних ізотипів, кодованих людськими імуноглобуліновими генами, без експресії ендегенних імуноглобулінових генів. Способи такого продукування і властивості ссавців, що мають такі характеристики, докладно описані,

наприклад, в [Lonberg et al., WO93/12227 (1993); US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, Nature 148:1547 (1994), Nature Biotechnology 14:826 (1996), Kucheriapati, WO 91/10741 (1991)] (включених тут в усій їхній повноті і для всіх цілей шляхом посилання). Особливо підходящими для цього є трансгенні миші. Антитіла проти А β отримують шляхом імунізації трансгенного ссавця-"не-людини" так, як описано Лонбергом [Lonberg] або Кучерлапаті [Kucheriapati], див. вище, пептидом А β або його фрагментом. Моноклональні антитіла одержують шляхом, наприклад, злиття В-клітин від таких ссавців з підходящими лініями клітин мієломи за допомогою звичайного методу Колера-Мільштейна (Kohler-Milstein). Людські поліклональні антитіла можуть також готуватися у формі сироватки від людей, імунізованих імунотенним агентом. У разі потреби такі поліклональні антитіла можуть бути сконцентровані шляхом афінного очищення за допомогою А β або інших амілоїдних пептидів у ролі реагентів афінності.

с. Методи фагових відображень

Наступний підхід до отримання антитіл проти А β полягає у скринінгу бібліотеки ДНК із людських В-клітин згідно із загальним протоколом, складеним Хьюзом [Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989)]. Як згадувалося в розділі "Метод триом", такі В-клітини можуть отримуватися від людини, імунізованої пептидом А β , його фрагментами, більш довгими пептидами, що містять А β або його фрагменти, або антидіотиповими антитілами. У разі потреби такі В-клітини одержують від пацієнта, якому призначається лікування антитілами. Далі добирають антитіла, що зв'язуються з А β або його фрагментом. Після цього клонують і ампліфікують послідовності, що кодуєть такі антитіла (або зв'язувальні фрагменти). Протокол, описаний Хьюзом, виявляється більш ефективним у комбінації з методом фагових відображень, див., наприклад, [Dower et al., WO 91/17271, McCafferty et al., WO 92/01047, Herzig et al., US 5,877,218, Winter et al., US 5,871,907, Winter et al., US 5,858,657, Holliger et al., US 5,837,242, Johnson et al., US 5,733,743, Hoogenboom et al., US 5,565,332] (включені тут в усій їхній повноті і для всіх цілей шляхом посилання). У цих методах готують фагові бібліотеки, члени яких відображають різноманітні антитіла на своїх зовнішніх поверхнях. Антитіла, зазвичай, відображаються як Fv- або Fab-фрагменти. Фаги, що відображають антитіла з бажаною, специфічністю, добирають за збагаченою специфічністю до пептиду А β або його фрагмента.

Один із варіантів методу фагових відображень дозволяє виробляти людські антитіла зі специфічністю зв'язування вибраного мишачого антитіла, див. [Winter, WO 92/20791]. У цьому методі як вихідний матеріал використовується змінна ділянка важкого чи легкого ланцюга вибраного мишачого антитіла. Якщо, наприклад, як вихідний матеріал вибрана змінна ділянка легкого ланцюга, то конструюють бібліотеку фагів, члени якої відображають одну і ту саму змінну ділянку легкого ланцюга (тобто, вихідний мишачий матеріал) і відмінну від неї змінну ділянку важкого ланцюга. Змінні ділянки важких ланцюгів одержують із бібліотеки реаранжованих змінних ділянок важких ланцюгів людини. Далі вибирають фаг, який виказує сильне специфічне зв'язування з А β (наприклад, принаймні 10^6 , а краще, якщо 10^8 M $^{-1}$). У подальшому змінна ділянка важкого ланцюга людини із цього фага служить як вихідний матеріал для конструювання решти фагової бібліотеки. У цій бібліотеці кожний фаг відображає одну і ту саму змінну ділянку важкого ланцюга (тобто, ділянку, ідентифіковану із першої бібліотеки відображень) і відмінну змінну ділянку легкого ланцюга. Змінні ділянки легких ланцюгів одержують із бібліотеки реаранжованих змінних ділянок легких ланцюгів людини. Далі знов вибирають фаги, що виказують сильне специфічне зв'язування з А β . Ці фаги відображають змінні ділянки повністю людських антитіл проти А β . Ці антитіла, зазвичай, мають таку саму або подібну епітопну специфічність, що й вихідний мишачий матеріал.

4. Вироблення змінних ділянок

Після концептуального вибору CDR і каркасних компонентів гуманізованих імуноглобулінів у розпорядженні стає широкий спектр методів для вироблення таких імуноглобулінів. Через виродження коду всі амінокислотні послідовності імуноглобулінів будуть кодуватися різноманітними нуклеїнокислотними послідовностями. Потрібні нуклеїнокислотні послідовності можуть вироблятися шляхом *de novo* твердофазного синтезу ДНК або PCR (полімеразно-ланцюгова реакція)-мутагенезу раніше приготованого варіанта бажаного поліпептиду. Кращим для підготування варіантів заміщення, делеції і вставлення цільової поліпептидної ДНК є спосіб олігонуклеотид-опосередкованого мутагенезу, див. [Adelman et al., DNA 2:183 (1983)]. Коротко, цей спосіб полягає в тому, що цільову поліпептидну ДНК змінюють шляхом гібридизації олігонуклеотиду, що кодує бажану мутацію на одониткову ДНК-матрицю. Після гібридизації використовують ДНК-полімеразу для синтезу повної другої комплементарної нитки цієї матриці, що вбудовує олігонуклеотидний праймер і кодує вибрану зміну в цільовій поліпептидній ДНК

5. Вибір постійних ділянок

Змінні сегменти антитіл, вироблених так, як описано вище, (наприклад, змінні ділянки важких і легких ланцюгів химерних, гуманізованих або людських антитіл), як правило, з'єднані принаймні з частиною постійної ділянки імуноглобуліну (Fc), зазвичай, людського імуноглобуліну. Послідовності ДНК людської постійної ділянки можуть бути виділені за допомогою добре відомих методів із різноманітних людських клітин, кращими серед яких є іморталізовані В-клітини [Kabat et al. див. вище, і Liu et al., WO87/02671] (включені тут в усій їхній повноті і для всіх цілей шляхом посилання). Звичайно, антитіло буде містити постійні ділянки як легких, так і важких ланцюгів. Постійна ділянка важкого ланцюга, зазвичай, містить СН1, шарнірну, СН2, СН3 і СН4-ділянки. Описані тут антитіла включають до свого числа антитіла, що містять усі типи постійних ділянок, і в тому числі: IgM, IgG, IgD, IgA і IgE, і будь-який ізотип, включаючи IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Вибір постійної ділянки залежить певною мірою від того, чи є бажаною антитіло-залежна комплементно- і/або клітинно-залежна токсичність. Наприклад, ізотипи IgG1 і IgG3 мають комплементну активність, а ізотипи IgG2 і IgG4 її не мають. Якщо є бажаним, щоб антитіло (наприклад, гуманізоване антитіло) виказувало цитотоксичну активність, то постійний домен є, звичайно, комплемент-фіксуючим постійним доменом, а клас його, як правило, належить до IgG1. Якщо ж така цитотоксична активність не є бажаною, то постійний домен може бути класу IgG2. Вибір ізотипу може також впливати на перехід антитіла у мозок. Кращим є людський ізотип IgG1. Постійні ділянки легких ланцюгів можуть бути групи лямбда або каппа. Гуманізоване антитіло може містити послідовності більш, ніж одного класу або ізотипу. Антитіла можуть бути експресовані як тетрамери, що містять два легких і два важких ланцюги, як відділені важкі

ланцюги, легкі ланцюги, як Fab, Fab' F(ab')₂ і Fv або як одноланцюгові антитіла, в котрих змінні домени важких і легких ланцюгів зв'язані через спейсер.

6. Експресія рекомбінантних антитіл

Химерні, гуманізовані та людські антитіла, зазвичай, виробляють шляхом рекомбінантної експресії. Нуклеїнові кислоти, що кодують гуманізовані змінні ділянки легких і важких ланцюгів, у разі необхідності зв'язані з постійними ділянками, вставляються у вектори експресії. Легкі та важкі ланцюги можуть бути клоновані в одні і ті самі або в різні вектори експресії. Сегменти ДНК, що кодують ланцюги імуноглобуліну, операбельно з'єднані з регулюючими послідовностями у векторах експресії, що забезпечують експресію поліпептидів імуноглобуліну. До числа послідовностей регулювання експресії належать, не обмежуючись лише ними, промотори (наприклад, зв'язані природним шляхом або гетерологічні промотори), сигнальні послідовності, енхансерні елементи і послідовності завершення транскрипції. У кращому варіанті послідовності регулювання експресії являють собою системи еукаріотичних промоторів у векторах, здатних трансформувати або трансфектувати еукаріотичні клітини-хазяїни. Як тільки вектор вбудовується у відповідного хазяїна, цей хазяїн підтримується в умовах, підходящих для експресії високого рівня нуклеотидних послідовностей, для збирання і очищення антитіл, що перехресно реагують.

Ці вектори експресії є, звичайно, такими, що реплікуються в організмах-хазяїнах чи як епісоми, чи як інтегральна частина хромосомальної ДНК-хазяїна. У загальному випадку вектори експресії містять маркери селекції (наприклад, стійкість до ампіциліну, стійкість до гігromіцину, стійкість до тетрацикліну або стійкість до неоміцину) для того, щоб ці клітини, трансформовані бажаними ДНК-послідовностями, можна було детектувати, див., наприклад, [Itakura et al., US Patent 4,704,362].

Особливо ефективним у «тонуванні» полінуклеотидів (наприклад, ДНК-послідовностей) за даним винаходом є *E. Coli*. Іншими мікробними хазяїнами, підходящими для використання в цих цілях, є бацили, наприклад, *Bacillus subtilis* та інші ентеробактерії, такі як *Salmonella*, *Serratia* та різні види *Pseudomonas*. У цих прокаріотичних хазяїнах також можна виробляти вектори експресії, які, звичайно, будуть містити послідовності регулювання експресії, сумісні з клітиною-хазяїном (наприклад, ориджином реплікації). Крім того, наявними будуть також численні різновиди добре відомих промоторів, таких як лактозна промоторна система, триптофанова (*trp*) промоторна система, бета-лактамазна промоторна система або промоторна система із лямбда-фага. Промотори, зазвичай, регулюють експресію, в разі необхідності з послідовністю-оператором, і мають послідовності сайту зв'язування з рибосомою і под. для імітації та завершення транскрипції і трансляції.

В експресії також можуть використовуватися інші мікроби, такі як дріжджі. Кращими дріжджами-хазяїнами є *Saccharomyces* з відповідними векторами, що мають послідовності регулювання експресії (наприклад, промотори), ориджин реплікації, завершувальні послідовності і под. До числа типових промоторів належать 3-фосфогліцераткіназа та інші гліколітичні ферменти. До числа дріжджових промоторів, що індукуються, належать, серед інших, промотори із алкогольдегідрогенази, ізоцитохрому C і ферментів, відповідальних за утилізацію мальтози і галактози.

Окрім мікроорганізмів, в експресії та продукуванні поліпептидів за даним винаходом використовуватися можуть також клітинні культури тварин ссавців (наприклад, полінуклеотиди, що кодують імуноглобуліни або їхні фрагменти), див., наприклад, [Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)]. Фактично прийнятними є еукаріотичні клітини, оскільки на сьогодні розроблена велика кількість підходящих ліній клітин-хазяїнів, здатних секретувати гетерологічні білки (наприклад, інтактні імуноглобуліни і, в тому числі, клітинні лінії яєчника китайського хом'ячка (CHO), різноманітні клітинні лінії Cos, HeLa-клітини, а краще - клітинні лінії мієломи або трансформовані В-клітини або гібридоми. Краще застосовувати нелюдські клітини. Вектори експресії для цих клітин можуть включати до свого числа послідовності регулювання експресії, такі як ориджин реплікації, промотор і енхансер [Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)], а також необхідні сайти інформації з процесінгу, такі як сайти зв'язування з рибосомами, сайти розщеплення РНК, сайти поліаденілювання і транскрипційні послідовності-термінатори. Кращими послідовностями регулювання експресії є промотори, отримані із імуноглобулінових генів, SV40, аденовірусу, вірусу бичачої папіломи, цитомегаловірусу і под. [Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992)].

В альтернативному варіанті послідовності, що кодують антитіла, можуть вбудовуватися у трансгени для введення в геном трансгенної тварини і наступної за цим експресії в молоці трансгенної тварини, див., наприклад, [Deboer et al., US 5,741,957, Rosen, US 5,304,489, and Meade et al., US 5,849,992]. До числа підходящих трансгенів належать кодувальні послідовності для легких і/або важких ланцюгів в операбельному з'єднанні з промотором і енхансером зі специфічного гена молочної залози, такого як казеїн або бета-лактоглобулін.

Вектори, що містять потрібні полінуклеотидні послідовності (наприклад, послідовності кодування важких і легких ланцюгів і послідовності регулювання експресії), можуть передаватися до клітини-хазяїна за допомогою добре відомих методів, вибір яких залежить від типу клітинного хазяїна. Наприклад, для прокаріотичних клітин, зазвичай, застосовується трансфекція хлоридом кальцію, а для інших клітин-хазяїнів можуть використовуватися обробка фосфатом кальцію, електропорація, ліпоефекція, біолістика або вірусна трансфекція, див., наприклад, [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989)] (включену тут в усій її повноті і для всіх цілей шляхом посилання). Серед інших методів, підходящих для трансформування клітин ссавців, можна назвати такі, що використовують плібрен, злиття протопластів, ліпосоми, електропорацію та мікроін'єкцію [Sambrook et al., див. вище]. Для продукування трансгенних тварин трансгени можуть вводитися шляхом мікроін'єкції в запліднені ооцити або вбудовуватися в геном ембріональних стовбурових клітин, а ядра таких клітин можуть переноситися до енуклеюваних ооцитів.

Якщо важкі та легкі ланцюги клонуються на окремих векторах експресії, то ці вектори співтрансфікуються для проведення експресії і збирання інтактних імуноглобулінів. Після експресії повні антитіла, їхні димери, окремі легкі та важкі ланцюги або інші форми імуноглобулінів за даним винаходом можуть бути очищені за допомогою стандартних процедур і, в тому числі, за допомогою осадження сульфату амонію, афінних колонок, колонкової хроматографії, HPLC (афінна хроматографія високої розрізняювальної спроможності)-очищення, гель-електрофорезу та ін., див., наприклад, [Scopes, Protein

Purification (Springer-Verlag, N. Y., (1982)]. Кращими при цьому для фармацевтичного застосування є практично чисті імуноглобуліни з гомогенністю, принаймні, приблизно 90-95%, а ще кращими - з гомогенністю 98-99% і більше.

7. Фрагменти антитіл

Об'ємом даного винаходу охоплюються також фрагменти антитіл. В одному з варіантів здійснення винаходу пропонуються фрагменти нелюдських, химерних і/або людських антитіл. В іншому варіанті здійснення передбачені фрагменти гуманізованих антитіл. Зазвичай, ці фрагменти виказують специфічне зв'язування з антигеном з афінністю, принаймні, 10^7 , а в більшості випадків - 10^8 або 10^9 M^{-1} . До числа фрагментів гуманізованих антитіл належать відокремлені важкі ланцюги, легкі ланцюги, Fab, Fab' F(ab')₂, Fabc і Fv. Фрагменти одержують за методами рекомбінантних ДНК або шляхом ферментативного чи хімічного відділення інтактних імуноглобулінів.

8. Випробування терапевтичної ефективності антитіл на піддослідних тваринах

Групам мишей PDAPP віком 7-9 місяців роблять ін'єкції 0,5мг поліклональних антитіл проти Аβ або специфічних моноклональних антитіл проти Аβ у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS). Усі препарати антитіл очищують до низьких рівней ендотоксину. Моноклональні антитіла можуть бути приготовані проти фрагмента шляхом ін'єкції миші цього фрагмента або більш довгої форми Аβ, приготування гібридом і скринінгу гібридом на антитіло, що специфічно зв'язується з бажаним фрагментом Аβ, не зв'язуючись при цьому з іншими фрагментами Аβ, що не перекриваються.

Піддослідним мишам робили інтраперитонеальні ін'єкції протягом чотирьох місяців для підтримання циркулюючої концентрації антитіл, що вимірялася по титру ELISA (твердофазового імуноферментного аналізу) більше 1/1000, визначеного для Аβ₄₂ або іншого імуногена. Протягом 6 місяців ін'єкцій проводився плинний моніторинг титрів, а в кінці цього періоду тварини були піддані еутаназії. Post mortem були проведені гістохімічні дослідження, аналіз рівней Аβ і токсикологічні дослідження. Використовувалося по 10 тварин на групу.

9. Скринінг антитіл за очищувальною активністю

Винаходом, поряд з іншим, пропонуються способи скринінгу антитіла за його активністю у очищенні амілоїдного відкладення або будь-якого іншого антигена, чи пов'язаної з цим біологічної субстанції, для котрих така очищувальна дія є бажаною. Для скринінгу за активністю проти амілоїдного відкладення зразок тканини із мозку пацієнта, що страждає на хворобу Альцгеймера, або від піддослідної тварини, що має ознаки патології Альцгеймера, приводять у контакт із фагоцитними клітинами, що несуть Fc-рецептор, такими як мікрогліальні клітини, і випробуванням антитілом у середовищі in vitro. Фагоцитними клітинами може бути первинна культура або клонінг лінія на зразок BV-2, C8-B4 або THP-1. У деяких методах компоненти у відповідний комбінації поміщають на предметне скло мікроскопу для полегшення мікроскопічного моніторингу. Можливими є також методи, при застосуванні яких у лунках мікротитрувального планшета проводять паралельно велику кількість реакцій. У такому форматі досліджень в окремі лунки можуть бути поміщені мініатюрні предметні стекла мікроскопу, або ж може використовуватися формат немікроскопічного детектування, наприклад, детектування Аβ за методом ELISA. У кращому варіанті проводять серію вимірювань кількості амілоїдного відкладення в реакційній суміші in vitro, починаючи від базового рівня, тобто до того, як була розпочата реакція, і вимірювання однієї чи більше тестових величин протягом реакції. Детектування антигена може здійснюватися шляхом забарвлення, наприклад, флуоресцентно міченим антитілом до Аβ або іншого компонента амілоїтного бляшко. Використовуване для забарвлення антитіло може бути як таким самим, що й антитіло, випробуване на очищувальну активність, або відрізнитися від нього; Зниження вимірюваних величин відносно базового рівня в процесі реакції амілоїдних відкладень означає, що випробуване антитіло володіє очищувальною активністю. Такі антитіла, очевидно, є корисними у застосуванні для профілактики або лікування хвороби Альцгеймера та інших амілоїдогенних розладів.

Аналогічні способи можуть використовуватися для скринінгу антитіл за їхньою активністю в очищенні інших видів біологічних субстанцій. Такі випробування можуть використовуватися для виявлення очищувальної активності проти практично будь-якого виду біологічних субстанцій. Зазвичай, така біологічна субстанція відіграє певну роль у хворобі людини або тварини. Для аналізу вона може відбиратися у формі зразка тканини або в ізольованій формі. У першому варіанті зразок тканини не слід фіксувати, щоб забезпечити легкий підхід до його компонентів і уникнути порушень конформації компонентів внаслідок фіксації. Як приклади зразків тканини для таких випробувань можна назвати ракову тканину, передракову тканину, тканину з доброякісними новоутвореннями на зразок бородавок і родимок, тканину, інфектовану патогенними мікроорганізмами, тканину, інфільтровану запальними клітинами, тканину з патологічними матрицями між клітинами (наприклад, із фібринозним перикардитом), тканину з аберантними антигенами та рубцеву тканину. Серед прикладів ізольованих біологічних речовин, що можуть використовуватися, можна навести Аβ, вірусні антигени або віруси, протеоглікани, антигени або інші патогенні мікроорганізми, пухлинні антигени й адгезійні молекули. Такі антигени можуть бути одержані із природних джерел, а також за допомогою рекомбінантної експресії, хімічного синтезу та ін. Зразок тканини або ізольовану біологічну субстанцію приводять у контакт із фагоцитними клітинами, що несуть Fc-рецептори, такими як моноцити або мікрогліальні клітини, і випробуванням антитілом у відповідному середовищі. Антитіло може бути спрямоване на випробувану біологічну речовину або асоційований з нею антиген. В останньому випадку об'єкт повинен бути протестований на те, чи фагоцитована натомість дана біологічна субстанція антигеном. Зазвичай, але не обов'язково, дане антитіло і біологічну субстанцію (іноді зі зв'язаним антигеном) приводять у контакт одне з одним, після чого до них додають фагоцитні клітини. Далі контролюють концентрацію біологічної субстанції і/або зв'язаного антигена, що міг залишитися в середовищі. Зниження кількості або концентрації антигена або зв'язаної біологічної субстанції у середовищі вказує на те, що антитіло має очищувальну реакцію проти цього антигена і/або зв'язаної біологічної субстанції разом із фагоцитними клітинами (див. Приклад IV).

В. Нуклеїнові кислоти, що кодують імунологічні і терапевтичні агенти

Імунна відповідь на амілоїдні відкладення може викликатися також введенням нуклеїнових кислот, що

кодують антитіла та їхні складові ланцюги, використовувані для пасивної імунізації. Такими нуклеїновими кислотами можуть бути ДНК або РНК. Нуклеїнокислотний сегмент, що кодує імуноген, зазвичай, з'єднаний з регуляторними елементами на зразок промотора й енхансера, що дозволяють експресувати цей ДНК-сегмент у потрібних клітинах-мішенях пацієнта. Для експресії в клітинах крові, як це потребується для індукування імунної відповіді, підходящими для прямої експресії є промоторні й енхансерні елементи із легколанцюгових або важколанцюгових імуноглобулінових генів або CMV головні проміжні ранні промотор і енхансер. Часто у вектор клонуються зшиті регуляторні елементи і кодувальні послідовності. Для введення дволанцюгових антитіл два ланцюги можуть бути клоновані в одному й тому самому або в окремих векторах.

Доступними є численні вірусні векторні системи, включаючи ретровіруси [Lawrie and Tumin, *Curr. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109 (1993)]; аденовірусні вектори, див., наприклад, [Bett et al., *J. Virol.* 67:5911 (1993)]; адено-зв'язані вірусні вектори, див., наприклад, [Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179:1867 (1994)], вірусні вектори із родини віспи, включаючи вірус коров'ячої віспи і віруси пташиної віспи, вірусні вектори із роду альфа-вірусу, такі як одержані із вірусів Sindbis і Semliki Forest, див., наприклад, [Dubensky et al., *J. Virol.* 70:508 (1996)], Венесуельській вірус конячого енцефаліту [Johnston et al., US 5,643,576] і віруси сказу на зразок вірусу везикулярного стоматиту [Rose, WO 96/34625] і вірусів папіломи [Ohe et al., *Human Gene Therapy* 6:325 (1995)]; Woo et al., WO 94/12629 and Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24,2630-2622(1996)].

ДНК, що кодує імуноген, або вектор, що її містить, можуть бути впаковані у ліпосоми. Підходящі ліпіди і споріднені аналоги описані в [Eppstein et al., US 5,208,036, Feigner et al., US 5,264,618, Rose, US 5,279,833, Erand et al., US 5,283,185]. Вектори і ДНК, що кодують імуноген, можуть бути також адсорбовані на носійних частках або зв'язані з ними. Як приклади таких носіїв можна назвати поліметилметакрилатні полімери, полілактиди та полі(лактид-співгліколіди) [McGee et al., *J. Micro Encap.* (1996)].

Вектори або голі поліпептиди (наприклад, ДНК) для генної терапії можуть постачатися *in vivo* даному пацієнту, зазвичай, шляхом системного введення (наприклад, внутрішньовенного, інтраперитонеального, назального, шлункового, інтрадермального, внутрішньом'язового, субдермального або інтракраніального вливання) або шляхом місцевих аплікацій [Anderson et al., US 5,399,346]. Термін "голий полінуклеотид" стосується полінуклеотиду, не ускладненого колоїдними матеріалами. Голі полінуклеотиди іноді клонуються в плазмідний вектор. Такі вектори можуть включати у себе також допоміжні агенти на зразок бупіваціну [Attardo et al., US 5,593,970]. ДНК може вводитися також за допомогою генної гармати [Xiao & Brandsma, див. вище]. ДНК, що кодує імуноген, осаджують на поверхню мікроскопічних металевих часток. Приготовані таким чином мікрочастки прискорюються ударною хвилею або розширюваним гелієм і проникають у тканини на глибину декількох клітинних шарів. Підходящим для цього знаряддям є прилад для постачання генів Accel™ Gene Delivery Device, що виробляється фірмою Agacetus, Inc. (Middleton, WI). Гола ДНК може перепускатися також крізь шкіру в потік крові просто нанесенням плями ДНК на шкіру з хімічним або механічним подразненням [Howell et al., WO 95/05853].

Можливим є також варіант, у якому вектори, що кодують імуногени, постачаються в клітини *ex vivo*, такі як клітини, експлантовані від окремого пацієнта (наприклад, лімфоцити, аспіровані клітини кісткового мозку, клітини, отримані шляхом біопсії тканини) або в гематопоетичні стовбурові клітини універсальних донорів, з наступною реімплантацією цих клітин пацієнту, звичайно, після селекції клітин, у які вбудувався даний вектор.

II. Профілактичні та терапевтичні методи

Даний винахід спрямований, поряд з іншим, на лікування хвороби Альцгеймера та інших амілоїдогенних розладів шляхом уведення терапевтичних імунологічних реагентів (наприклад, гуманізованих імуноглобулінів) до специфічних епітопів у поліпептиді Аβ пацієнту в умовах, що створюють у даного пацієнта сприятливу терапевтичну реакцію (наприклад, індукцію фагоцитозу Аβ, зниження бляшкового навантаження, інгібування бляшкоутворення, зменшення невритної дистрофії, поліпшення когнітивної функції і/або повернення розвитку когнітивного відхилення у зворотному напрямку, лікування або профілактику когнітивного відхилення), наприклад, з метою профілактики або лікування будь-якої амілоїдогенної хвороби. Винахід спрямований також на використання розкритих у ньому імунологічних реагентів (наприклад, гуманізованих імуноглобулінів) у виготовленні медикаменту для лікування або профілактики амілоїдогенної хвороби.

Застосовуваний тут термін "лікування" означає аплікацію або введення терапевтичного агента пацієнту або аплікацію чи введення терапевтичного агента в ізольовану тканину або клітинну лінію від пацієнта, який страждає на дану хворобу, має її симптоми або є схильним до неї, з метою догляду, зцілення, полегшення стану, заспокоєння, зміни, лікування, зниження інтенсивності, поліпшення стану або подолання хвороби, симптомів хвороби чи схильності до неї.

Відповідно до однієї з його ознак, винаходом пропонуються способи профілактики або лікування хвороби, пов'язаної з амілоїдними відкладеннями Аβ у мозку пацієнта. До таких хвороб належать хвороба Альцгеймера, синдром Дауна і розумова недостатність. Остання може виникати як разом із іншими ознаками амілоїдогенної хвороби, так і без них. Деякі методи за даним винаходом передбачають уведення ефективної дози антитіла, що специфічно зв'язується з компонентом амілоїдного відкладення у пацієнта. Такі методи є особливо корисними у профілактиці або лікуванні хвороби Альцгеймера у людей. Типові методи включають у себе введення ефективної дози антитіла, що зв'язується з Аβ. Кращі методи передбачають уведення ефективної дози антитіла, що специфічно зв'язується з епітопом у межах залишків 1-10 пептиду Аβ, наприклад, антитіл, що специфічно зв'язуються з епітопом у межах залишків 1-3 Аβ, антитіл, що специфічно зв'язуються з епітопом у межах залишків 1-4 Аβ, антитіл, що специфічно зв'язуються з епітопом у межах залишків 1-5 Аβ, антитіл, що специфічно зв'язуються з епітопом у межах залишків 1-6 Аβ, антитіл, що специфічно зв'язуються з епітопом у межах залишків 1-7 Аβ, або антитіл, що специфічно зв'язуються з епітопом у межах залишків 3-7 Аβ. Згідно з ще однією ознакою даного винаходу пропонується введення антитіл, що зв'язуються з епітопом, який містить вільний N-кінцевий залишок Аβ. Згідно з іншою ознакою даного винаходу пропонується введення антитіл, що зв'язуються з епітопом у межах залишків 1-10 Аβ, де залишком 1 і/або залишком 7 Аβ є аспартанова кислота. Згідно з ще однією

ознакою даного винаходу пропонується введення антитіл, що специфічно зв'язуються з пептидом Аβ, не зв'язуючись при цьому з амілоїдним білком-попередником (APP) повної довжини. Згідно з ще однією ознакою даного винаходу ізотипом антитіла є людський імуноглобулін IgG1.

Подальшою ознакою даного винаходу є запропоноване ним уведення антитіл, що зв'язуються з амілоїдним відкладенням у пацієнта і викликають очищувальну реакцію проти цього амілоїдного відкладення. Наприклад, така очищувальна реакція може бути здійснена шляхом фагоцитозу, опосередкованого Fc-рецептором.

Терапевтичні агенти за даним винаходом, як правило, є практично чистими від небажаних забруднень. Це означає, що терапевтичний агент має, принаймні, 50% (мас.) чистоту, а також є практично вільним від перешкоджаючих білків і забруднень. Іноді ці агенти мають чистоту, щонайменше, 80% (мас.), у кращих випадках, щонайменше, 90% або 95% (мас.). Проте за допомогою звичайних методів очищення білків можуть одержуватися гомогенні пептиди чистотою, принаймні, 99% (мас.).

Ці способи можуть використовуватися стосовно як безсимптомних пацієнтів, так і до тих пацієнтів, що виказують симптоми хвороби. Антитілами, використовуваними в таких способах, можуть бути людські, гуманізовані, химерні або нелюдські антитіла або їхні фрагменти (наприклад, фрагменти, що зв'язуються з антигеном), а також це можуть бути моноклональні або поліклональні антитіла. Згідно з ще однією ознакою винаходу ним пропонується введення антитіл, одержаних із людини, імунізованої пептидом Аβ, причому така людина може бути пацієнтом, що отримує лікування антитілом.

Згідно з ще однією ознакою винаходу пропонується введення антитіла з фармацевтичним носієм у формі фармацевтичної композиції. В альтернативному варіанті антитіло може створюватися у пацієнта шляхом уведення полінуклеотиду, що кодує, принаймні, один ланцюг антитіла. Полінуклеотид експресується так, щоб виробити ланцюг антитіла у пацієнта. При необхідності цей полінуклеотид кодує важкі та легкі ланцюги антитіла. Такий полінуклеотид експресується так, щоб продукувати важкі і легкі ланцюги у пацієнта. У типовому варіанті здійснення винаходу проводять моніторинг рівня введеного антитіла в кров пацієнта.

Таким чином, даний винахід дозволяє задовольнити давно назрілу потребу в терапевтичних схемах профілактики і зниження інтенсивності нейропатології, а у деяких пацієнтів - також когнітивної недостатності, пов'язаної з хворобою Альцгеймера.

А. Пацієнти, що піддаються лікуванню

Сприйнятливими до лікування є пацієнти, які наражені на ризик захворювання, але не виказують його симптомів, а також пацієнти, в яких на даний час вже виявляються симптоми захворювання. Що стосується хвороби Альцгеймера, то захворюти на неї може будь-хто у достатньо літньому віці. Отже, запропоновані способи можуть призначатися як профілактичні у загальних випадках, не вдаючись до необхідності проводити оцінку ризику для того чи іншого пацієнта. Запропоновані способи є особливо ефективними для тих пацієнтів, хто наражається на відомий генетичний ризик виникнення у них хвороби Альцгеймера. До числа таких пацієнтів належать ті, хто має родичів, що страждають на цю хворобу, і ті, чий ризик визначений аналізом генетичних або біохімічних маркерів. До генетичних маркерів групи ризику хвороби Альцгеймера належать мутації в APP-гені і, особливо, мутації в положенні 717 і положеннях 670 і 671, які отримали назву мутацій Харді (Hardy) і Сведіша (Swedish), відповідно [Hardy, див. вище]. Серед інших маркерів ризику можна назвати мутації в презенілінових генах PS1 і PS2, а також ApoE4, родинна історія хвороби Альцгеймера, гіперхолестеринемія або атеросклероз. Особи, що в даний час страждають на хворобу Альцгеймера, можуть бути виявлені за характерною деменцією, а також наявністю факторів ризику, описаних вище. Крім того, для ідентифікації осіб, що страждають на хворобу Альцгеймера, у розпорядженні є численні діагностичні тести. Поряд з іншими, до них належать вимірювання рівней tau цереброспинальної рідини (CSF tau) і Aβ42. Підвищений рівень tau і знижений рівень Aβ42 є ознакою наявності хвороби Альцгеймера. Особи, що страждають на хворобу Альцгеймера, можуть виявлятися також за критерієм ADRDA, описаним у розділі Приклади.

Лікування безсимптомних пацієнтів може починатися у будь-якому віці (наприклад, у 10, 20, 30 років). Проте, зазвичай, лікування слід починати до досягнення пацієнтом віку 40, 50, 60 або 70 років. Лікування, зазвичай, передбачає призначення великої кількості доз протягом певного періоду часу. Процес лікування може супроводжуватися контролем рівней антитіл протягом певного часу. Якщо реакція знижується, то призначають підвищене дозування. Лікування пацієнтів, потенційно схильних до синдрому Дауна, може починатися ще до народження шляхом уведення терапевтичного агента матері або невдовзі після народження.

В. Режими і дози лікування

У профілактичному застосуванні фармацевтичні композиції або медикаменти вводять пацієнтам, що є схильними до хвороби Альцгеймера або іншим чином наражаються на ризик її виникнення, у кількості, достатній для усунення або зменшення цього ризику, послаблення тяжкості хвороби або віддалення моменту її виникнення, включаючи біохімічні, гістологічні і/або поведінкові симптоми хвороби, її ускладнення і проміжні патологічні фенотипи, що з'являються в процесі її розвитку. У терапевтичному застосуванні композиції або медикаменти вводяться пацієнту, який викликає підозру або вже страждає на таку хворобу, в кількості, достатній для лікування або, принаймні, часткового зупинення симптомів хвороби (біохімічних, гістологічних і/або поведінкових), включаючи її ускладнення і проміжні патологічні фенотипи в процесі її розвитку.

У деяких методах уведення лікувального засобу зменшує або усуває міокогнітивне погіршення у пацієнтів, які ще не мають розвиненої патології Альцгеймера. Кількість, адекватна для здійснення терапевтичного або профілактичного лікування, визначається як терапевтично або профілактично ефективна доза. Як у профілактичному, так і в терапевтичному режимах лікувальні агенти, звичайно, вводять у декількох дозах до досягнення достатньої імунної відповіді. Термін «імунна відповідь» або «імунологічна відповідь» означає розвинення гуморального (антитіло-опосередкованої) і/або клітинної (опосередкованої антиген-специфічними Т-клітинами або їхніми продуктами секреції) відповіді, спрямованої проти антигена у реципієнта. Така відповідь може бути активною, тобто викликану введенням імуногена,

або пасивною, тобто викликаною введенням імуноглобуліну або антитіла чи примованих Т-клітин.

«Імуногенний агент» або «імуноген» є здатним викликати імунологічну відповідь проти самого себе після введення його ссавцю, у тому числі разом з ад'ювантом. Зазвичай, проводять моніторинг імуногенної реакції, і якщо вона починає слабнути, то дозування повторюють.

Ефективні дози композицій за даним винаходом для лікування вищеперелічених станів можуть бути різними залежно від багатьох факторів, включаючи засоби введення ліків, місця розташування мішені, фізіологічного стану пацієнта, того, є даний пацієнт людиною чи твариною, введених інших лікарських засобів і того, є дане лікування профілактичним чи терапевтичним. Зазвичай, пацієнтом є людина, хоча лікувати таким чином можна також тварин, включаючи трансгенних особин. Дози лікування повинні бути відтитровані на оптимізацію їхньої безпечності й ефективності.

Для пасивної імунізації антитілом дози вибирають у межах від 0,0001 до 100мг/кг, а частіше - від 0,01 до 5мг/кг маси тіла пацієнта. Наприклад, дози можуть становити 1мг/кг маси тіла або 10мг/кг маси тіла, або ж від 1 до 10мг/кг, краще, якщо принаймні 1мг/кг. Дози можуть вводитися пацієнтам щоденно, через день, один раз на тиждень або за будь-яким іншим графіком, визначеним шляхом емпіричних досліджень. Лікування, зазвичай, проводять з багатократним введенням доз протягом тривалого періоду часу, наприклад, щонайменше, 6 місяців. Може також здійснюватися режим лікування з введенням доз один раз за два тижні, або один раз за місяць чи кожні 3-6 місяців. За типовими графіками дозування становить від 1 до 10мг/кг або 15мг/кг кожний день підряд, 30мг/кг через день, або 60мг/кг один раз за тиждень. У деяких способах одночасно вводять два і більше моноклональних антитіл з різною специфічністю зв'язування, а дози кожного антитіла в цьому випадку також перебувають у вищезазначених межах.

Антитіло, зазвичай, вводять з цілої низки причин. Інтервали між поодинокими дозами можуть становити і тиждень, і місяць, і рік. Інтервали можуть бути також нерегулярними і визначатися вимірюваннями рівня антитіла проти Аβ в крові пацієнта. У деяких способах дозування регулюють у розрахунку на досягнення концентрації антитіла в плазмі крові в межах 1-1000мкг/мл, а в деяких способах - у межах 25-300мкг/мл. Можливі також варіанти, в яких антитіло вводять у препаратах пролонгованої дії. У цьому випадку вводити препарат потребується не так часто. Дози і частота введення препарату залежать від величини періоду напіввиведення антитіла у даного пацієнта. У загальному випадку людські антитіла виказують найдовші періоди напіввиведення, а слідом за ними йдуть гуманізовані антитіла, химерні антитіла і нелюдські антитіла.

Доза і частота введення препаратів можуть залежати від мети лікування -профілактика або терапія. У випадку профілактичного застосування композиції, що містять дані антитіла або їхню суміш, вводять пацієнту, який ще не досяг стану хвороби, для підсилення його опору цій хворобі. Така кількість лікувального засобу визначається як «профілактично ефективна доза». У цьому випадку точні кількості лікувального засобу також залежать від стану здоров'я пацієнта і його загального імунітету, але у більшості випадків лежать у межах від 0,1 до 25мг на дозу, а частіше - від 0,5 до 2,5мг на дозу. Відносно низькі дози використовують з відносно нечастими прийомами (довгими інтервалами) протягом тривалого періоду часу. Деякі пацієнти продовжують приймати лікування протягом решти свого життя.

У терапевтичному застосуванні іноді потребуються відносно високі дози (наприклад, від 1 до 200мг антитіла на дозу, а у більшості випадків від 5 до 25мг на дозу) з відносно короткими інтервалами прийому до тих пір, поки прогресування хвороби не зменшиться або не закінчиться, а в кращих варіантах - до тих пір, аж поки у пацієнта не з'являться ознаки часткового або повного поліпшення симптомів хвороби. Після цього дозування може бути переведене у профілактичний режим.

Нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла, вживають у дозах приблизно від 10нг до 1г, від 100нг до 100мг, від 1мкг до 10мг і в межах 30-300мкг ДНК на пацієнта. Дози інфекційних вірусних векторів перебувають у діапазоні 10-100 і більше віріонів на дозу.

Терапевтичні агенти можуть вводитися парентеральним шляхом, локально, внутрішньовенним, пероральним, підшкірним, внутрішньоартеріальним, інтракраніальним, інтраперітонеальним, інтраназальним або внутрішньом'язовим шляхом у профілактичних і/або терапевтичних цілях. Найбільш типовим шляхом введення імуногенного агента є підшкірний, хоча не менш ефективними можуть бути також інші способи. Наступним за поширеністю вживання способом є внутрішньом'язові ін'єкції. Їх, як правило, роблять у м'язи рук або ніг. У деяких способах лікувальні речовини вводять шляхом ін'єкції в конкретну тканину, де акумулюються відкладення, як, наприклад, у випадку інтракраніальних ін'єкцій. Внутрішньом'язові ін'єкції і внутрішньовенні вливання роблять для введення антитіл. У деяких способах терапевтичні антитіла вводять шляхом ін'єкції безпосередньо в череп. Крім того, антитіла можуть вводитися у формі композицій або приладів пролонгованого звільнення на зразок приладу Medipad™.

Агенти за даним винаходом у разі необхідності можуть вводитися в комбінації з іншими агентами, що є, принаймні, частково ефективними у лікуванні амілоїдогенних хвороб. У випадку синдрому Альцгеймера і Дауна, коли амілоїдні відкладення утворюються в мозку, агенти за даним винаходом можуть вводитися також разом з іншими агентами, які збільшують перехід агентів за даним винаходом через гематоенцефалічний бар'єр.

С. Фармацевтичні композиції

Агенти за даним винаходом часто вводяться пацієнту у формі фармацевтичних композицій, що містять активний терапевтичний агент та інші фармацевтично прийнятні компоненти [Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980))]. Краща форма такої композиції залежить від шляху її введення і терапевтичного застосування. Композиції можуть містити залежно від бажаного складу також фармацевтично прийнятні, нетоксичні носії або розріджувачі, які мають загальне визначення носіїв, застосовуваних для складання фармацевтичних композицій, призначених для введення тваринам або людям. Розріджувач вибирають так, щоб не зашкодити біологічній активності композиції. Серед прикладів таких розріджувачів можна назвати дистильовану воду, забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчини Рінгера, розчин декстрази і розчин Хенка. Окрім того, фармацевтична композиція може також включати у себе інші носії, ад'юванти або нетоксичні, нетерапевтичні, неімуногенні стабілізатори та ін.

Фармацевтичні композиції можуть включати у себе також великі макромолекули, що поволі метаболізуються, на зразок білків, полісахаридів, таких як хітозан, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти і співполімери (наприклад, латекс-функціоналізована сефароза(ТМ), агароза, целюлоза та ін.), полімерні амінокислоти, амінокислотні співполімери і ліпідні агрегати (такі як масляні краплі або ліпосоми). Окрім того, ці носії можуть діяти як імуностимуляторні агенти (наприклад, ад'юванти).

У випадку парентерального введення агенти за даним винаходом можуть готуватися у формі ін'єкційних розчинів або суспензій даної субстанції у фізіологічно прийнятному розріджувачі з фармацевтичним носієм, роль якого може виконувати стерильна рідина на зразок масла у воді, фізіологічного розчину, гліцеролу або етанолу. Крім того, в композиціях можуть бути наявними також допоміжні речовини на зразок змочувальних агентів, емульсифікаторів, поверхнево-активних речовин, речовин рН-буферизації і под. Інші компоненти фармацевтичних композицій можуть бути нафтового, тваринного, рослинного або синтетичного походження; серед них можна назвати, наприклад, арахісову олію, соєву олію і мінеральну олію. У загальному випадку кращими рідкими носіями і особливо для ін'єкційних розчинів є гліколі, такі як пропіленгліколь або поліетиленгліколь. Антитіла можуть уводитися у формі ін'єкцій речовин уповільненого всмоктування або імплантаційних препаратів, які можуть складатися таким чином, щоб дозволити на пролонговане звільнення активного інгредієнта. Типова композиція містить моноклональні антитіла у концентрації 5мг/мл у водному буфері, що складається із 50ммоль L-гістидину, 150ммоль NaCl, відрегульованого до рН 6,0 соляною кислотою HCl.

Композиції, як правило, готують для ін'єкцій у формі рідких розчинів або суспензій. Можуть також готуватися їхні тверді форми, підходящі для розчинення або суспендування в рідких носіях перед ін'єкцією. Ці препарати можуть також готуватися у формі емульсій або замикатися в капсули в ліпосомах або мікрочастках на зразок полілактиду, полігліколіду або співполімеру для підсилення ад'ювантного ефекту, як описано вище, див. [Langer, Science 249: 1527 (1990) and Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28:97 (1997)]. Агенти за даним винаходом можуть уводитися у формі ін'єкцій уповільненого всмоктування або імплантаційних препаратів, складання яких може здійснюватися так, щоб дозволити на пролонговане або пульсуюче звільнення активного інгредієнта.

Можливі також склади, підходящі для інших способів введення і, в тому числі, для перорального, інтраназального і легеневого, у формі супозиторіїв і трансдермальних апікацій. Супозиторії можуть формуватися із сумішей, що містять активний інгредієнт у межах від 0,5 до 10%, у кращому варіанті - від 1% до 2% зі зв'язуючим і носієм, що містять поліалкіленгліколь або тригліцерид. Пероральні склади включають у себе ексципієнти із фармацевтично чистих манітолу, лактози, крохмалю, стеарату магнію, натрійсахарину, целюлози та карбонату магнію. Ці композиції можуть мати форму розчинів, суспензій, таблеток, пілоль, капсул, препаратів пролонгованої дії або порошків і містять активний інгредієнт у кількості 10-95%, а у кращому варіанті - 25-70%.

Місцеві апікації застосовуються для трансдермального або інтрадермального постачання лікарської речовини. Місцеве введення активного агента може бути полегшене введенням разом з ним токсину холери або його детоксикованих похідних чи субодиниць, або інших підходящих бактеріальних токсинів [Glenn et al., Nature 391, 851 (1998)]. Для такого сумісного введення із компонентів можуть формуватися суміші або зшиті молекули, отримані шляхом хімічного поперечного зшивання або експреси як злитий білок.-

В альтернативному варіанті трансдермальне постачання може здійснюватися через шкіру або за допомогою трансферосом [Paul et al., Eur. J. Immunol. 25:3521 (1995); Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368:201-15 (1998)].

III. Моніторинг курсу лікування

Винаходом пропонуються способи моніторингу лікування пацієнтів, що страждають на хворобу Альцгеймера або є схильними до неї, тобто способи моніторингу курсу лікування, призначеного даному пацієнту. Ці способи можуть використовуватися для контролю як терапевтичного лікування симптомних пацієнтів, так і профілактичного лікування безсимптомних пацієнтів. Зокрема, ці способи є корисними в моніторингу пасивної імунізації (наприклад, вимірювання рівня введеного антитіла).

У деяких з цих способів передбачається визначення базового рівня, наприклад, рівня або профілю антитіла у пацієнта, перед введенням йому дози активного агента і порівняння з цим базовим рівнем величини для побудови профілю або рівня після лікування. Значне зростання (тобто більше типової межі експериментальної похибки у повторюваних вимірюваннях на одному й тому самому зразку, вираженої через стандартне відхилення від середнього значення вимірюваної величини) рівня або профілю вказує на позитивний результат лікування (тобто на те, що введення активного агента досягло бажаної відповіді). Якщо ж величина імунної відповіді суттєво не змінилася або навіть зменшилася, то це свідчить про негативний результат лікування.

В інших способах визначають контрольну величину (тобто середнє і стандартне відхилення) рівня або профілю для контрольної групи. Зазвичай, особи (або особини) такої контрольної групи є такими, що раніше лікування не отримували. Виміряні таким чином величини рівня або профілю у пацієнта після введення йому терапевтичного агента порівнюють з контрольною величиною. Значне перевищення вимірюваної величини відносно контрольної (тобто більше, ніж одне стандартне відхилення від середнього значення) свідчить про позитивний або достатній ефект лікування. Відсутність такого перевищення або наявність зменшення свідчать про негативний або недостатній результат лікування. Введення активного агента, зазвичай, продовжують до тих пір, поки вимірюваний рівень не перевищить контрольної величини. Як і у вищезрозглянутому випадку, досягнення ділянки плато на графіку відносно контрольних величин вказує на те, що лікування може бути перерване або проводиться зі зменшеними дозами і/або частотою їх прийняття.

В інших способах визначають контрольну величину рівня або профілю (наприклад, середнє значення і стандартне відхилення) у контрольній групі осіб (або особин), які отримували раніше лікування певним терапевтичним агентом, і рівні чи профілі яких мають плато на графіку відповіді на таке лікування. Виміряні величини рівнів або профілів - пацієнта порівнюють з цією контрольною величиною. Якщо виміряний рівень у пацієнта не дуже відрізняється (наприклад, більше одного стандартного відхилення) від контрольної величини, то лікування можна переривати. Якщо ж рівень, виміряний у пацієнта, є значно нижчим за

контрольну величину, то цілком виправданим буде продовження введення активного агента пацієнту. Якщо рівень, виміряний у пацієнта стійко залишається нижчим контрольної величини, то можуть бути показаними певні зміни у лікуванні.

Пропонуються також способи слідування за рівнями або профілями антитіл у пацієнтів, які в даний час лікування не отримують, але проходили курс лікування раніше. Метою такого слідування є визначення того, чи потребується лікування відновити. Виміряний у пацієнта рівень або профіль антитіла може бути порівняний з величиною, яка була досягнута раніше після попереднього курсу лікування. Значне зниження відносно попередніх вимірювань (тобто більше, ніж типова межа похибки при повторюваних вимірюваннях на одному і тому самому зразку) є свідченням того, що лікування може бути відновлене. Можливим є варіант, у якому виміряну у пацієнта величину порівнюють з контрольною величиною (середнє значення плюс стандартне відхилення), знятою в групі пацієнтів після проходження ними курсу лікування. В іншому варіанті величину, виміряну у пацієнта, порівнюють з контрольною величиною, отриманою в групі пацієнтів профілактичного курсу лікування, які не мали симптомів хвороби або показали поліпшення характеристик хворого стану. В усіх цих випадках значне зниження відносно контрольного рівня (тобто більше за стандартне відхилення) є показником того, що лікування даного пацієнта повинно бути відновлене.

Зразками тканин для аналізу, звичайно, є проби крові, плазми, сироватки, слизової рідини або цереброспинальної рідини пацієнта. Зразок піддають аналізу, наприклад, на рівні або профілі антитіл до пептиду Аβ, наприклад, на рівні або профілі гуманізованих антитіл. Методи аналізу ELISA для виявлення антитіл, специфічних до Аβ, описані в розділі Приклади. В деяких способах визначають рівень або профіль уведеного антитіла, використовуючи для цього випробування на очищення, наприклад, випробування на фагоцитоз *in vitro* згідно з даним описом. У таких способах зразок тканини даного пацієнта приводять у контакт з амілоїдним відкладенням (наприклад, від миші PDAPP) і фагоцитними клітинами, що несуть Fc-рецептори. Після цього сліdkують за очищенням амілоїдного відкладення. Наявність і поширення реакції очищення відкладення служить ознакою наявності і достатнього рівня антитіл, що є ефективними у очищенні Аβ у зразку тканини пацієнта.

Профіль антитіл після пасивної імунізації, зазвичай, має на початку пік концентрації антитіл, за яким йде експоненціальний спад. Без введення наступної дози цей спад наближається до рівнів, що мали місце перед лікуванням, протягом періоду часу від декількох днів до декількох місяців, залежно від періоду напіввиведення прийнятого антитіла. Наприклад, період напіввиведення деяких людських антитіл складає порядку 20 днів.

У деяких способах перед введенням антитіл проводять вимірювання базового рівня антитіл до Аβ у пацієнта, невдовзі після чого проводять друге вимірювання для визначення пікового рівня антитіл і ще одне або декілька вимірювань через певні інтервали часу для слідування за спадом рівнів антитіл. Якщо рівень антитіла знижується до базового рівня або до напередзаданого відсотку піку нижче базового рівня (наприклад, 50%, 25% або 10%), то пацієнту призначається продовження курсу приймання антитіл. У деяких способах пік або послідовно виміряні рівні нижче базового порівнюють з еталонними рівнями, визначеними раніше для встановлення сприятливого режиму профілактичного або терапевтичного лікування для інших пацієнтів. Якщо виміряний рівень антитіла є значно нижче, ніж еталонний рівень (наприклад, менше середнього значення мінус одне стандартне відхилення еталонної величини в групі пацієнтів, що отримують ефективне лікування), то призначають прийом додаткових доз антитіла.

Можливим є застосування протягом курсу лікування також інших способів моніторингу будь-яких загальноприйнятих фізіологічних симптомів (наприклад, соматичних або розумових), на які у повсякденній праці покладаються дослідники та лікарі при встановленні діагнозу або проведенні моніторингу амілоїдогенних хвороб (наприклад, хвороби Альцгеймера). Таким чином можна здійснювати, наприклад, моніторинг когнітивного погіршення. Останнє є симптомом хвороби Альцгеймера і синдрому Дауна, але таке погіршення може виникати також і без інших ознак будь-якої з цих хвороб. Когнітивне погіршення може, наприклад, відслідковуватися при оцінці розумових здібностей пацієнта на Державному освідненні мініментальності згідно з узгодженням протягом курсу лікування.

С Набори

Винаходом передбачені також набори для здійснення моніторингу описаних вище способів. Зазвичай до такого набору входить агент, що специфічно зв'язується з антитілами до Аβ. Набір також містить мітку. Для виявлення антитіл до Аβ мітка має, зазвичай, форму мічених антиідіотипових антитіл. Для виявлення антитіл агент може постачатися попередньо зв'язаним із твердою фазою, роль якої можуть виконувати, наприклад, лунки мікротитрувального планшета. Набори, як правило, супроводжуються документацією з правилами користування ними. До документації може входити карта, діаграма, таблиця або інший довідковий матеріал з кореляцією вимірюваного рівня відносно рівнів антитіл до Аβ. Термін «документація» стосується будь-якого письмового або записаного на тому чи іншому носії матеріалу, що додається або іншим чином супроводжує набір у процесі його виготовлення, транспортування, продажу і використання. Наприклад, терміном «документація» охоплюються аркуші та брошури проспектів, етикетки на упаковці, інструкції, аудіо- та відеокасети, комп'ютерні диски, а також написи, відтиснені безпосередньо на наборі.

Винаходом передбачені також діагностичні набори, наприклад, дослідницькі набори, набори для детектування та інші (наприклад, для відображень *in vivo*). Такі набори, як правило, містять антитіло для зв'язування з епітопом пептиду Аβ, у кращому варіанті в межах залишків 1-10. Антитіло переважно є міченим, або до набору входить допоміжний реагент для мічення. Крім того, набір супроводжується інструкціями щодо його застосування, наприклад, для відображення *in vivo*. Типові антитіла, що включаються до наборів, є такими, як подано у даному описі.

D. Відображення *in vivo*

Винаходом пропонуються також способи відображення *in vivo* амілоїдних відкладень у пацієнта. Такі способи можуть застосовуватися для діагностики або підтвердження діагнозу хвороби Альцгеймера чи схильності до неї. Наприклад, ці способи можуть використовуватися стосовно пацієнтів, що вказують симптоми деменції. Якщо у пацієнта виявляється наявність аномальних амілоїдних відкладень, то він, очевидно, страждає на хворобу Альцгеймера. Ці способи можуть використовуватися також стосовно

безсимптомних пацієнтів. Наявність аномальних відкладень амілоїду означає схильність пацієнта до симптоматичної хвороби в майбутньому. Дані методи можуть застосовуватися також у моніторингу прогресування хвороби і/або реакції на лікування пацієнтів з поставленим раніше діагнозом хвороби Альцгеймера.

Ці способи здійснюються шляхом уведення пацієнту реагенту на зразок антитіла, що зв'язується з Аβ, і детектування цього реагенту після його зв'язування. Кращими для цих цілей є антитіла, що зв'язуються з Аβ-відкладеннями у пацієнта, не зв'язуючись із поліпептидом APP повної довжини. Особливо прийнятними тут є антитіла, що зв'язуються з епітопом пептиду Аβ у межах амінокислот 1-10. У деяких способах антитіла зв'язуються з епітопом у межах амінокислот 7-10 пептиду Аβ. Такі антитіла, звичайно, зв'язуються, не викликаючи суттєвої очищувальної відповіді. В інших способах антитіла зв'язуються з епітопом у межах залишків 1-7 пептиду Аβ. Такі антитіла, зазвичай, зв'язуються і викликають очищувальну відповідь проти Аβ. Але очищувальної відповіді можна уникнути, якщо використовувати фрагменти антитіл, що не містять постійних ділянок повної довжини на зразок Fabs. У деяких способах одне й те саме антитіло може служити і як лікувальний, і як діагностичний реагент. У загальному випадку антитіла, що зв'язуються з епітопами С-кінця до залишку 10 пептиду Аβ, не дають такого сильного сигналу, як антитіла, що зв'язуються з епітопами в межах залишків 1-10, імовірно, через те, що С-кінцеві епітопи є недоступними в амілоїдних відкладеннях. У зв'язку з цим, такі антитіла є менш прийнятними.

Діагностичні реагенти можуть вводитися в тіло пацієнта шляхом внутрішньовенної ін'єкції або безпосередньо в мозок за допомогою інтракраніальної ін'єкції або ж через отвір, просвердлений у черепі. Доза такого реагенту повинна перебувати в таких самих межах, що й у способах лікування. Зазвичай, реагент є міченим, хоча в деяких випадках первинний реагент з афінністю до Аβ є неміченим, а вторинний, мічений, реагент використовується для зв'язування з цим первинним реагентом. Вибір мітки залежить від засобу детектування. Наприклад, для оптичного детектування підходящою є флуоресцентна мітка. Парамагнітні мітки підходять для томографічного детектування без хірургічного втручання. Радіоактивні мітки можуть детектуватися також за допомогою PET або SPECT.

Діагностичні дослідження проводять шляхом порівняння кількості, розмірів і/або інтенсивності мічених локусів із відповідними величинами базового рівня. Величини базового рівня можуть являти собою середні рівні у групі незхворілих осіб (або особин). Величини базового рівня можуть також являти собою попередні рівні, визначені у того ж самого пацієнта. Наприклад, величини базового рівня можуть визначатися у пацієнта перед початком лікування, а виміряні після цього величини можуть порівнюватися з цими величинами базового рівня. Зменшення виміряних величин відносно базового рівня свідчить про позитивну реакцію на лікування.

Даний винахід одержує подальше пояснення у наведених нижче прикладах його практичного здійснення, що не несуть з собою жодних обмежень.

Приклади

Приклад I

Терапевтична ефективність антитіл проти Аβ: mAb 2H3, mAb 10D5, mAb 266, mAb 21F12 і pAb AB1-42

У цьому Прикладі описані випробування різноманітних моноклональних і поліклональних антитіл проти Аβ на їхню здатність інгібувати накопичування Аβ в мозку гетерозиготних трансгенних мишей.

A. Схема досліджень

Від лабораторії Charles River Laboratory було одержано 60 самців і самок гетерозиготних PDAPP трансгенних мишей віком від 8,5 до 10,5 місяців. Тварини були розподілені по шести групах обробки різними антитілами проти Аβ. Розподіл піддослідних тварин по групах був проведений так, щоб ознаки статі, віку, родоходу і джерела постачання були в межах груп якомога близькими між собою. Схема експерименту подана в Табл. 2.

Таблиця 2

Схема експерименту

Група лікування	№ ^a	Застосоване антитіло	Специфічність антитіла	Ізотип антитіла
1	9	Без антитіла (тільки РВБ)	NA ^b	NA
2	10	Політональне	Аβ1-42	Змішаний
3	0	mAb ^d 2H3	Аβ1-12	IgG1
4	8	mAb 10D5	Аβ3-7	IgG1
5	6	mAb 266	Аβ13-28	IgG1
6	8	mAb 21F12	Аβ33-42	IgG2a

a. Кількість мишей у групі наприкінці експерименту. Всі групи на початку експерименту мали по 10 тварин.

b. NA: Незастосований.

c. Мишачий поліклональний імуноглобулін: не агрегатоване Аβ42.

d. mAb: моноклональне антитіло.

Як показано в Табл. 2, до числа використовуваних антитіл були включені чотири мишачих Аβ-специфічних моноклональних антитіл: 2H3 (спрямоване на залишки 1-12 Аβ), 10D5 (спрямоване на залишки 3-7 Аβ), 266 (спрямоване на залишки 13-28 Аβ і таке, що зв'язується з розчинним, анегз агрегатованим AN1792), 21F12 (спрямоване на залишки 33-42 пептиду Аβ). П'яту групу обробляли фракцією Аβ-специфічного поліклонального антитіла (вирощеною шляхом імунізації агрегатованим AN1792). Негативна, контрольна група тварин отримувала тільки розріджувач PBS, без антитіла.

B. Моніторинг курсу лікування

Моноклональні антитіла вводилися шляхом ін'єкції з дозою приблизно 10 мг/кг (допускаючи, що маса піддослідної миші складала 50г). Слідування за титрами антитіл проводилося протягом 28 тижнів лікування. Тваринам робили внутрішньоперитонеальні ін'єкції в середньому кожні сім днів, підтримуючи титри анти-Аβ вище 1000. Хоча вимірювані титри антитіл mAb 266 були нижчими, це не було зв'язано з агрегатованим AN1792, який у даних випробуваннях використовувався як антиген-захоплювач, і отже у цій групі дотримувалася такий самий графік дозування. Лікування тварин у групі, що отримувала моноклональне антитіло 2H3, було перервано в перші три тижні, оскільки антитіло очищувалося *in vivo* надто швидко.

Для визначення титрів антитіл була складена субпопуляція, до якої увійшли по три добрані з кожної групи випадковим чином тварини, які знекровлювалися перед кожною інтраперитонеальною імунізацією. Таким чином, разом було зроблено 30 кровопускань. Титри антитіл вимірювали як антитіло, що зв'язується з Аβ1-42, використовуючи сендвіч-аналіз за методом ELISA з пластиковими багатолунковими планшетами, покритими Аβ1-42, як це докладно описано в розділі «Загальні матеріали і методи». Середні титри для кожного кровопускання наведені в Табл. 3 для поліклонального і моноклональних антитіл 10D5 і 21F12.

Таблиця 3

Тижні 21F12	21F12	Тижні 10D5	10D5	Тижні поліклон	Поліклональне антитіло
0,15	500	0,15	3000	0,15	1600
0,5	800	0,5	14000	0,5	4000
1	2500	1	5000	1	4500
1,5	1800	1,1	5000	1,5	3000
2	1400	1,2	1300	2	1300
3	6000	2	3000	3	1600
3,5	550	3	4000	3,5	650
4	1600	3,5	500	4	1300
5	925	4	2400	5	450
6	3300	5	925	6	2100
7	4000	6	1700	7	1300
8	1400	7	1600	8	2300
9	1900	8	4000	9	700
10	1700	9	1800	10	600
11	1600	10	1800	11	600
12	1000	11	2300	12	1000
13	1500	12	2100	13	900
14	1300	13	2800	14	1900
15	1000	14	1900	15	1200
16	1700	15	2700	16	700
17	1700	16	1300	17	2100
18	5000	17	2200	18	1800
19	900	18	2200	19	1800
20	300	19	2500	20	1200
22	1750	20	980	22	1000
23	1600	22	2000	23	1200
24	1000	23	1000	24	675
25	1100	24	850	25	850
26	2250	25	600	26	1600
27	1400	26	1100	27	1900
28		27	1450	28	
		28			

Середнє значення титрів складало приблизно 1000 протягом цього періоду часу у випадках препаратів поліклональних антитіл і трохи більше цього рівня у тварин, що отримували моноклональні антитіла 10D5 і 21F12.

Лікування тварин тривало протягом 6 місяців, що в цілому склало період 196 днів. Через тиждень після кінцевої дози тварини були піддані еутаназії.

С. Рівні Аβ і APP у мозку

Приблизно через 6 місяців лікування різноманітними препаратами антитіл проти Аβ мозок у кожної тварини був видалений і підданий перфузії фізіологічним розчином. Одна півкуля мозку була препаративана для імуногістохімічного аналізу, а друга використовувалася для кількісної оцінки рівнів Аβ і APP. Для вимірювання концентрації різноманітних форм бета-амілоїдного пептиду і амілоїдного білка-попередника (APP) півкулю розсікали і з неї готували гомогенати гіпокампової, кортикальної і мозочкової ділянок у 5моль гуанідині. Препарати були послідовно розріджені, і в них була проведена кількісна оцінка рівня амілоїдного пептиду і APP шляхом порівняння із серією розчинів стандартів пептиду Аβ і APP відомої концентрації у форматі ELISA.

Рівні загального Аβ і Аβ1-42, виміряні за методом ELISA у гомогенатах кори головного мозку і гіпокампу, а також рівень загального Аβ у мозочку представлені в Табл. 4, 5 і 6, відповідно. Середня концентрація загального Аβ для контрольної групи тварин, інкульованих фізіологічним розчином PBS, становила в 3,6 разів більше в гіпокампі, ніж у корі головного мозку (середнє значення 63389нг/г гіпокампової тканини порівняно із 17818нг/г для кори головного мозку). Середній рівень у мозочку тварин контрольної групи (30,6нг/г тканини) був більш, ніж у 2000 разів нижчим за рівень у гіпокампі. Ці рівні є подібними тим, що раніше були одержані у гетерозиготних PDAPP трансгенних мишей цього віку [Johnson-Wood et al., див вище].

Стосовно кори головного мозку одна група тварин, що отримувала лікування, мала середній рівень А β вимірюваний як А β 1-42, котрий значно відрізнявся від середнього рівня, отриманого в контрольній групі ($p < 0,05$), тварини якої одержували поліклональне антитіло проти А β , як показано в Табл. 4. Середній рівень А β 1-42 був знижений на 65% порівняно з контрольним рівнем для тварин цієї групи лікування. Середні рівні А β 1-42 були також значно знижені, на 55%, порівняно з контрольним рівнем в одній з додаткових груп лікування, тварини якої отримували дози моноклонального mAb 10D5 ($p = 0,0433$).

Таблиця 4

Кора головного мозку

Група лікування	N ^a	Середні значення						Середні значення	
		Загальний А β			А β 42			Загальний А β	А β 42
		Результат ELISA ^b	Величина Р ^c	Зміна внаслідок лікування %	Результат ELISA	Величина Р	Зміна внаслідок лікування %	Результат ELISA	Результат ELISA
PBS	9	17818	NA ^d	NA	13802	NA	NA	16150+/-7456 ^e	12621+/-5738
Полі клон. АНТН-А β 42	10	6160	0,0055	-65	4892	0,0071	-65	5912+/-4492	4454+/-3347
mAb 10D5	8	7915	0,1019	-56	6214	0,0433	-55	9695+/-6923	6943+/-3351
mAb 266	6	9144	0,1255	-49	8481	0,1255	-39	9204+/-9293	7489+/-6921
mAb 21F12	8	15158	0,2898	-15	13578	0,7003	-2	12481+/-7082	11005+/-6324

Примітки:

- a. Кількість тварин на групу наприкінці експерименту.
- b. нг/г тканини.
- c. Аналіз за методом Манна-Уїтні (Mann Whitney).
- d. NA: незастосовний.
- e. Стандартне відхилення.

У гіпокампі середнє відсоткове зниження загального А β , зумовлене лікуванням поліклональним антитілом проти А β (50%, $p = 0,0055$), було не таким великим, як спостерігалось в корі головного мозку (65%) (Табл. 5). Але абсолютна величина цього зниження була майже в три рази вищою у гіпокампі, ніж у корі головного мозку: абсолютне зниження 31683нг/г тканини в гіпокампі порівняно з 11658нг/г тканини в корі головного мозку. З іншого боку, вимірюваний як рівень більш амілоїдогенної форми А β , А β 1-42, а не загального А β , він знижувався поліклональним антитілом у значному ступені ($p = 0,0025$). Середні рівні в групах, що оброблялися моноклональними 10D5 і 266, були зниженими на 33% і 21%, відповідно.

Таблиця 5

Гіпокамп

Група лікування	N ^a	Середні значення						Середні значення	
		Загальний А β			А β 42			Загальний А β	А β 42
		Результат ELISA ^b	Величина Р ^c	Зміна внаслідок лікування %	Результат ELISA	Величина Р	Зміна внаслідок лікування, %	Результати аналізу ELISA	Результати аналізу ELISA
PBS	9	63389	NA ^d	NA	54429	NA	NA	58351+/-13308 ^e	52801+/-14701
Поліклон, анти-А β 42	10	31706	0,0055	-50	27127	0,0025	-50	30058+/-22454	24853+/-18262
mAb 10D5	8	46779	0,0675	-26	36290	0,0543	-33	44581+/-18632	36465+/-17146
mAb 266	6	48689	0,0990	-23	43034	0,0990	-21	36419+/-27304	32919+/-25372
mAb 21F12	8	51563	0,7728	-19	47961	0,8099	-12	57327+/-28927	50305+/-23927

Примітки:

- a. Кількість тварин на групу наприкінці експерименту.
- b. нг/г тканини.
- c. Аналіз за методом Манна-Уїтні (Mann Whitney).
- d. NA: незастосовний.
- e. Стандартне відхилення.

Рівень загального А β був вимірюваний також у мозочку (Табл. 6). Тварини цієї групи, які отримували поліклональне антитіло анти-А β і моноклональне антитіло 266, показали значне зниження рівнів загального А β (43% і 46%, $p = 0,0033$ і $p = 0,0184$, відповідно), а група, що отримувала моноклональне 10D5, показала майже значне зниження (29%, $p = 0,0675$).

Таблиця 6

Мозочок

Група лікування	N ^a	Середні значення			Середні значення
		Загальний А β			Загальний А β
		Результат аналізу ELISA ^b	Величина Р ^c	Зміна внаслідок лікування, %	Результати аналізу ELISA

PBS	9	30,64	NA ^d	NA	40,00+/-31,89 ^e
Поліклон, анти-Аβ42	10	17,61	0,0033	-43	18,15+/-4,36
mAb 10D5	8	21,68	0,0675	-29	27,294+/-19,43
mAb 266	6	16,59	0,0184	-46	19,59+/-6,59
mAb 21F12	8	29,80	>0,9999	-3	32,88+/-9,90

Примітки:

- Кількість тварин на групу наприкінці експерименту.
- нг/г тканини.
- Аналіз за методом Манна-Уїтні (Mann Whitney).
- NA: незастосовний.
- Стандартне відхилення.

За методом ELISA була визначена також концентрація APP у корі головного мозку і мозочку у мишей, оброблюваних антитілом і контрольним PBS. Були проведені два різні аналізи APP. У першому, позначеному як APP-α/FL, були розпізнані як альфа-APP (α - секретована форма APP, яка була розщеплена на послідовності Аβ) і форми APP повної довжини (FL: full-length), у той час як у другому аналізі був розпізнаний лише альфа-APP. У протилежність викликаному лікуванням зниженню Аβ у субпопуляції оброблюваних груп, рівні APP були практично незмінними в усіх групах оброблюваних тварин порівняно з контрольними. Ці результати вказують на те, що імунізація антитілами проти Аβ виснажують Аβ, не виснажуючи APP.

Підсумовуючи вищевикладене, можна сказати, що рівні Аβ значно знизилися в корі головного мозку, гіпокампі і мозочку у тварин, які отримували лікування поліклональним антитілом, вирощеним проти AM792. У меншому ступені моноклональні антитіла до амінокінцевої ділянки Аβ1-42 і, зокрема, до амінокислот 1-16 і 13-28 також продемонстрували значні ефекти лікування.

D. Гістохімічний аналіз

Далі було проведено порівняння морфології Аβ-імунореактивних бляшок у мозку піддослідних мишей, об'єднаних у субколонію із груп, що отримували PBS, поліклональне Аβ42, 21F12, 266 і 10D5, з результатами попередніх досліджень, у яких застосовувалися стандартні процедури імунізації антитілом Аβ42.

Найбільші зміни як у поширеності, так і в зовнішньому вигляді амілоїдних бляшок спостерігалися у тварин, імунізованих поліклональним антитілом Аβ42. Зменшення амілоїдного навантаження, еродована морфологія бляшок і зв'язана з клітинами імунореактивність сильно наближалися до ефектів стандартної процедури імунізації. Ці спостереження підтверджують результати твердофазного імуноферментного аналізу ELISA, в' яких значне зниження як загального Аβ, так і Аβ42 досягалося введенням поліклонального антитіла Аβ42.

Аналогічна якісна оцінка амілоїдних бляшок у групі 10D5 також показала зменшення їх як за кількістю, так і за зовнішнім виглядом з певними проявами клітинно-пов'язаної імунної реактивності Аβ. Порівняно з тваринами контрольної обробки фракція поліклонального Ig проти Аβ і одне з моноклональних антитіл (10D5) знизили бляшкове навантаження на 93% і 81%, відповідно (p<0,005). Антитіло 21F12 виказало відносно помірну дію на бляшкове навантаження. Мікроскопічні дослідження мозку після імунізації поліклональним rAb Аβ1-42 показали наявність дифузії відкладень і відсутність багатьох із більш грубих скупчених бляшок у групі, імунізованої поліклональним rAb Аβ1-42, порівняно з тваринами контрольної обробки.

E. Лімфопроліферативна реакція

Були проведені вимірювання Аβ-залежної лімфопроліферації на клітинах селезінки, зібраних через вісім днів після останньої інфузії антитіл. Свіжозібрані клітини у кількості 10⁵ клітин на лунку культивували протягом 5 днів у присутності Аβ1-40 при концентрації 5мкмоль для стимуляції. Як позитивний контрольний зразок служили додаткові клітини, що культивувалися з Т-клітинним мітогеном, РНА, а як негативний контрольний зразок - клітини, що культивувалися без додавання пептиду.

Спленоцити від мишей PDAPP, пасивно імунізованих різними антитілами проти Аβ, були стимульовані in vitro AN1792, після чого були виміряні проліферативна і цитокінна реакції. Метою цього аналізу було визначення того, чи полегшувала пасивна імунізація антиген-презентацію, а отже і примування Т-клітинної реакції, специфічної для AN 1792. У мишей, пасивно імунізованих антитілами проти Аβ, не спостерігалося AN 1792-специфічних проліферативних і цитокінних-реакцій.

Приклад II

Терапевтична ефективність антитіл проти Аβ: mAb 2H3, mAb 10D5, mAb 266, mAb 21F12, mAb 3D6, mAb 16C11 і rAb Аβ 1-42

У цих дослідженнях була повторно проведена імунізація моноклональним 10D5 і були протестовані ще два антитіла проти Аβ - моноклональні 3D6 (Аβ1-5) і 16C11 (Аβ33-42). Контрольні групи тварин отримували або PBS або холосте антитіло (ТМ2а) узгодженого ізо типу. Використовувані тут піддослідні миші були старші за віком (11,5-12 місяців, гетерозиготні), ніж у попередніх дослідженнях, а решта схеми експерименту залишилася такою самою. Тут також через шість місяців імунізації антитіло 10D5 знизило бляшкове навантаження більш, ніж на 80% порівняно з обома видами контрольних зразків - PBS і антитіло узгодженого ізо типу (p=0,003). Серед інших антитіл проти Аβ моноклональне 3D6 було таким самим ефективним, викликавши 86% зниження (p=0,003). У протилежність йому, третє антитіло проти даного пептиду, 16C11, не виказало жодної дії на бляшкове навантаження. Аналогічні результати були одержані у вимірюваннях з Аβ42 методом ELISA-аналізу.

Отримані результати свідчать про те, що відповідь антитіл проти пептиду Аβ за відсутності Т-клітинного імунітету є достатньою для зниження амілоїдних відкладень у мишей PDAPP, але при цьому не всі антитіла

проти Аβ є однаково ефективними. Антитіла, спрямовані на епітопи, що містять амінокислоти 1-5 або 3-7 пептиду Аβ, є особливо ефективними. В цілому можна показати, що пасивно введені антитіла проти Аβ (тобто пасивна імунізація) знижують ступінь розвинення бляшкових відкладень у піддослідних мишей з хворобою Альцгеймера.

Приклад III

Моніторинг зв'язування антитіл у центральній нервовій системі (УНС)

Даний Приклад демонструє, що за помірних концентрацій сироватки (25-70мкг/мл) антитіла отримують доступ у ЦНС на рівнях, достатніх для декорування бета-амілоїдних бляшок.

Для визначення того, чи можуть антитіла проти Аβ діяти безпосередньо в ЦНС, були проведені дослідження на наявність периферійно введених антитіл у мозку перфузованих фізіологічним розчином мишей наприкінці експерименту за Прикладом II. Незафіксовані кріостатні зрізи мозку були піддані дії флуоресцентного реагенту проти мишачого імуноглобуліну (IgG-Cy3 «коза проти миші»). Бляшки в мозку тварин груп 10D5 і 3D6 були сильно декоровані антитілом, у той час як у групі 16C-11 забарвлення не спостерігалось. Для виявлення повного ступеня бляшкового відкладення послідовні зрізи зразків мозку кожної тварини спочатку піддавали імунологічній реакції з антитілом проти Аβ, а потім - з вторинним реагентом. Антитіла 10D5 і 3D6 після периферійного введення досягали до більшості бляшок в ЦНС. В цих групах лікування бляшкове навантаження значно зменшувалося порівняно з групою 16C11. Потрапляння антитіл у ЦНС не було зумовлене аномальним витоком гематоенцефалічного бар'єра, оскільки згідно з результатами вимірювань, проведених Евансом Блу (Evans Blue) на мишах PDAPP, зростання судинної проникності не спостерігалось. Крім того, концентрація антитіла в паренхімі мозку старих мишей PDAPP була такою самою, що і в нетрансгенних мишей, в яких концентрація антитіла у сироватці складала 0,1% (незалежно від ізотипу).

Ці дані свідчать про те, що периферійно введені антитіла можуть потрапляти в ЦНС там, де вони безпосередньо включають процес видалення амілоїду. Цілком імовірно, що антитіло 16C11 також має доступ до бляшок, але не є здатним зв'язуватися з ними.

Приклад IV

Скринінг ex vivo за активністю антитіл проти амілоїдних відкладень

Для вивчення дії антитіл на видалення бляшок був проведений аналіз ex vivo, в якому первинні мікрогліальні клітини культивувалися з незафіксованими кріостатними зрізами ураженого хворобою Альцгеймера мозку як мишей PDAPP, так і людини. Мікрогліальні клітини були взяті з кори головного мозку новонароджених мишей DBA/2N (1-3 дні). Зразки кори головного мозку механічно дисоціювали у збалансованому сольовому розчині Хенка (HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution), фірми Sigma, з 50мкг/мл ДН-ази I (Sigma). Дисоційовані клітини були профільтровані на 100мкм клітинному фільтрі (Falcon) і піддані центрифугуванню зі швидкістю 1000об./хв протягом 5 хвилин. Осад був повторно суспендований у живильному середовищі (високоглюкозне DMEM: модифіковане за Дульбеко середовище Ігла, 10% FBS (фетальна бичача сироватка) і 25нг/мл gmGM-CSF), і клітини були висіяні з густиною, що складала 2 зразки мозку на пластмасову пробірку T-75 для культивування. Через 7-9 днів пробірки піддали обертанню на орбітальному шейкері зі швидкістю 200об./хв протягом 2 годин при 37°C. Клітинну суспензію центрифугували зі швидкістю 1000об./хв і повторно суспендували у середовищі для аналізу.

Кріостатні зрізи завтовшки 10мкм ураженого хворобою Альцгеймера мозку мишей PDAPP або людини (post mortem, інтервал менше 3 години) у відталому стані були поміщені на покриті полілізіном круглі накривні стекла в лунках 24-лункових планшетів для культивування тканин. Накривні стекла були двічі промиті аналітичним середовищем, що складалося із безгібридом-сироваточного середовища (H-SFM, Gibco BRL) з 1% FBS, глутаміну, пеніцилін/стрептоміцину і 5нг/мл gmGM-CSF (фірми R&D). Протягом 1 години добавляли контроль або антитіла проти Аβ з подвійною концентрацією (кінцева 5мкг/мл). Після цього були висіяні мікрогліальні клітини з густиною $0,8 \times 10^6$ клітин/мл аналітичного середовища. Культури витримували у зволоженому інкубаторі (37°C, 5% CO₂) протягом 24 годин і більше. Наприкінці інкубування культури були зафіксовані 4% параформальдегідом і просочені 0,1% розчином Triton-X100. Зрізи були забарвлені біотинільованим 3D6, а потім кон'югатом стрептавідин/Cy3 (фірми Jackson ImmunoResearch). Екзогенні мікрогліальні клітини були візуалізовані ядерним барвником (DAPI). Культури обстежувалися під інверсійним флуоресцентним мікроскопом (Nikon, TE300), і були зроблені їхні мікрознімки цифровою камерою SPOT з програмним забезпеченням SPOT (Diagnostic instruments). Для аналізу методом Вестерн-блотінгу культури були екстраговані у 8моль сечовині, розріджені 1:1 у відновлювальному трициновому буфері для зразків і поміщені на 16% трициновий гель (Novex). Після перенесення на імобілізовані блоти були піддані дії 5мкг/мл поліклонального Аβ42, а потім HRP-кон'югованим антитілом проти миші і розвинені за допомогою ECL (Amersham).

Після проведення аналізу зрізів мозку PDAPP у присутності 16C11 (одне з антитіл проти Аβ, яке було неефективним in vivo) бета-амілоїдні бляшки залишилися неторкнутими, а фагоцитоз не спостерігався. У протилежність цьому, культивування сусідніх зрізів у присутності 10D5 привело до значного видалення амілоїдних відкладень і появи на мікрогліальних клітинах численних фагоцитних пухирців, що містили Аβ. Ідентичні результати були отримані на зрізах мозку, ураженого хворобою Альцгеймера. Тут спостерігався індукований антитілом 10D5 фагоцитоз AD-бляшок (AD - хвороба Альцгеймера), у той час як 16C11 залишилося неефективним. Крім того, аналіз дозволив одержати порівнювані результати після проведення його на мікрогліальних клітинах миші або людини, а також на антитілах миші, кролика і примату проти Аβ.

У Табл. 7 представлено порівняння фагоцитозу зі зв'язуванням з Аβ для декількох різних специфічностей зв'язування антитіл. Тут можна бачити, що антитіла, що зв'язуються з епітопами в межах амінокислот 1-7, як зв'язують, так і видаляють амілоїдні відкладення, у той час як антитіла, що зв'язуються з епітопами в межах амінокислот 4-10, зв'язуються, не видаляючи амілоїдні відкладення. Антитіла, які зв'язуються з епітопами, що є С-кінцевими до залишку 10, ні зв'язуються, ні видаляють амілоїдні відкладення.

Аналіз епітопної специфічності

	Епітоп	Антитіло Ізотип	Забарвлення	Фагоцитоз
N-Кінець				
Mab				
3D6	1-5	IgG2b	+	+
10D5	3-7	IgG1	+	+
22C8	3-7	IgG2a	+	+
6E10	5-10	IgG1	+	-
14A8	4-10	IgG1 щура	+	-
Амінокисл. 13-28				
18G11	10-18	IgG1 щура	-	-
266	16-24	IgG1	-	-
22D12	18-21	IgG2b	-	-
C-Кінець				
2G3	-40	IgG1	-	-
16C11	-40/-42	IgG1	-	-
21F12	-42	IgG2a	-	-
Імунна сироватка				
Кролик (CFA)	1-6		+	+
Миша (CFA)	3-7		+	+
Миша (QS-21)	3-7		+	+
Мавпа (QS-21)	1-5		+	+
Миша (MAP1-7)			+	+

У Табл. 8 подані результати, отримані з декількома антитілами проти Аβ, що дозволяють провести порівняння їхньої здатності викликати фагоцитоз *ex vivo* і зменшувати бляшкове навантаження *in vivo* у дослідженнях з пасивним переносом. Хоча антитіла 16C11 і 21F12 зв'язувалися з агрегатованим синтетичним пептидом Аβ з високою авідністю, вони залишалися нездатними реагувати з бета-амілоїдними бляшками на незафіксованих зрізах мозку, неспроможними ініціювати фагоцитоз у випробуваннях *ex vivo* і були неефективними *in vivo*. Антитіла 10D5, 3D6 і поліклональне антитіло проти Аβ були активними в усіх трьох вимірюваннях. Ці результати показують, що ефективність *in vivo* зумовлена безпосереднім, викликаним антитілом видаленням бляшок у ЦНС і що випробування *ex vivo* дозволяють прогнозувати ефективність антитіл *in vivo*.

Таблиця 8

Випробування *ex vivo* як провісник ефективності *in vivo*

Антитіло	Ізотип	Авідність до агрегатованого Аβ (pM)	Зв'язування з β- амілоїдними бляшками	Ефективність <i>ex vivo</i>	Ефективність <i>in vivo</i>
Моно клон.					
3D6	IgG2b	470	+	+	+
10D5	IgG1	43	+	+	+
16C11	IgG1	90	-	-	-
21F12	IgG2a	500	-	-	-
TM2a	IgG1	-	-	-	-
Поліклон.					
1-42	Змішаний	600	+	+	+

Аналогічні випробування були проведені з метою визначення очищувальної активності антитіла проти фрагмента синуклеїну під назвою NAC. Синуклеїн показав себе як білок, зв'язаний з амілоїдними бляшками. Антитіло проти NAC було приведене в контакт зі зразком мозкової тканини, що містив амілоїдні бляшки, і мікрогліальними клітинами, як було описано вище. Як контроль була використана кроляча сироватка. Послідовний моніторинг показав значне зменшення кількості і розмірів бляшок, що свідчило про очищувальну активність цього антитіла.

Для підтвердження того, що Аβ протягом цих випробувань *ex vivo* був інтерналізований, була застосована конфокальна мікроскопія. У присутності контрольних антитіл екзогенні мікрогліальні клітини залишалися у конфокальній площині над тканиною; фагоцитичних пухирців, що містили Аβ, не спостерігалось, а бляшки в межах зрізу залишалися неторкнутими. У присутності 10D5 майже весь бляшковий матеріал містився у пухирцях в екзогенних мікрогліальних клітинах. Для визначення долі інтерналізованого пептиду оброблені антитілом 10D5 культури були екстраговані 8моль сечовини у різні моменти часу й аналізувалися за допомогою Вестерн-блотінгу. У момент часу 1год., коли фагоцитоз ще не виник, реакція з поліклональним антитілом проти Аβ виявила сильну стрічку 4kD (що відповідала пептиду Аβ). Аβ-імунореактивність, що знизилася на перший день, на третій день була цілком відсутньою. Отже,

опосередкований антитілом фагоцитоз Аβ веде до його деградації.

Для визначення того, чи опосередковується фагоцитоз Fc-рецептором у випробуваннях *ex vivo* були приготовані фрагменти F(ab')₂ антитіла 3D6 проти Аβ. Хоча фрагменти F(ab')₂ повністю зберегли свою здатність реагувати з бляшками, вони були неспроможні ініціювати фагоцитоз мікрогліальними клітинами. Крім того, фагоцитоз усім антитілом міг би блокуватися реагентом проти мишачих Fc-рецепторів (анти-CD 16/32). Ці дані свідчать про те, що видалення Аβ *in vivo* відбувається шляхом фагоцитозу, опосередкованого Fc-рецептором.

Приклад V

Перехід антитіл через гематоенцефалічний бар'єр

У цьому Прикладі визначається концентрація антитіла, що постачається у мозок після внутрішньовенної ін'єкції у периферійну тканину як нормальної миші, так і миші PDAPP. Після лікування миші PDAPP і контрольні нормальні миші були піддані перфузії 0,9% NaCl. Були приготовані зрізи ділянок мозку (гіпокампу або кори головного мозку), які були піддані швидкому заморожуванню. Зразки мозку гомогенізували в інгібіторах 0,1% Triton+протеаза. Імуноглобулін в екстрактах детектували за допомогою ELISA-аналізу. Імуноглобулін IgG F(ab')₂ «коза проти миші» нанесли на радіоімунологічний планшет як захоплювальний реагент. Сироватку або мозкові екстракти інкубували протягом 1 години. Ізотипи детектували IgG1-HRP або IgG2a-HRP або IgG2b-HRP проти миші (Caltag). Антитіла незалежно від ізотипу були наявними в ЦНС у концентрації 1:1000, яку виміряли в крові. Наприклад, коли концентрація IgG1 у три рази перевищувала концентрацію IgG2a в крові, вона була в три рази більшою за концентрацію IgG2a також у мозку, де рівні обох антитіл складали 0,1% їхніх відповідних рівнів у крові. Ці результати спостерігалися як у трансгенних, так і у нетрансгенних мишей, вказуючи на те, що PDAPP не має особливого у своєму роді витоку гематоенцефалічного бар'єра.

Приклад VI

Клонування і секвенування змінних ділянок мишачого 3D6

Клонування і аналіз послідовності VH антитіла 3D6. Змінна ділянка (VH) важкого ланцюга антитіла 3D6 була клонована за допомогою RT-PCR, використовуючи мПНК, приготовану із клітин гібридами двома незалежними методами. У першому з них використовувалися консенсусні праймери до ведучого пептиду VH-ділянки, куди входили кодон ініціації трансляції як 5'-праймер (ДНК №3818-3829) і специфічний 3'-праймер постійних ділянок g2b (ДНК №3832). Послідовності із PCR-ампліфікованого продукту, а також із численних, незалежно виведених клонів повністю узгоджувалися між собою. Як наступна перевірка на VH-ділянці послідовності антитіла 3D6, результат підтверджувався секвенуванням VH-фрагмента, отриманого методологією RT-PCR продукту 5' RACE, і специфічного 3'-праймера g2b (ДНК №3832). Знову послідовність була виведена з PCR-продукту, а також численні, незалежно виведені клони. Обидві послідовності узгоджувалися між собою (за винятком заміщення V8I на ведучій ділянці із продукту 5' RACE), вказуючи на те, що ці послідовності виведені із мПНК, що кодує VH-ділянку антитіла 3D6. Нуклеотидна (SEQ ID NO:3) і амінокислотна (SEQ ID NO:4) послідовності VH-ділянки антитіла 3D6 наведені в Табл. 9A і на Фіг.2, відповідно.

Таблиця 9A. Нуклеотидна послідовність VH мишачого 3D6.

ATGAAC TTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTAAAGGTGTCCAGTGTGA
AGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGCGTCTCTGAAACTCT
CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAACTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGAA
TCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTTGCATCCATTAGGAGTGGTGGTGGTAGAACCTACTA
TTCAACAATGTAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGAGAATGCCAAGAACACCCCTGT
ACCTGCAAATGAGTAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCTTGATTATTGTGTGTCAGATAT
GATCACTATAGTGGTAGCTCCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCT (SEQ ID NO: 3)

*Підкреслений ведучий пептид.

Клонування й аналіз послідовності VL антитіла 3D6. Легколанцюгова змінна ділянка VL антитіла 3D6 була клонована аналогічно клонуванню VH-ділянки. У першому досліді був сконструйований набір консенсусних праймерів для ампліфікації мишачих VL-ділянок таким чином: 5'-праймери (ДНК №3806-3816) були сконструйовані так, щоб гібридизуватися з VL-ділянкою, в яку входить кодон ініціації трансляції, а 3'-праймер (ДНК №3817) був специфічним для мишачої Ск-ділянки нижче від з'єднувальної ділянки V-J. Аналіз ДНК-послідовності PCR-фрагмента, а також незалежно виведені клони, ізольовані за допомогою цього набору консенсусних легколанцюгових праймерів, показали, що отримана кДНК була виведена із нефункціонально реаранжированого транскрипта як послідовності, що містить мутацію зсуву рамки зчитування між точками з'єднання V-J-ділянки.

У другому досліді 5'RACE був використаний для клонування другої VL, що кодує кДНК. Аналіз ДНК-послідовності цього продукту (консенсус 11) показав, що він закодував функціональну мПНК. Таким чином, можна зробити висновок, що ця послідовність кодує правильну легколанцюгову мПНК антитіла 3D6. Нуклеотидна (SEQ ID NO:1) й амінокислотна (SEQ ID NO:2) послідовності VL-ділянки антитіла 3D6 наведені в Табл. 9B і на Фіг.1, відповідно.

Таблиця 9В. Нуклеотидна послідовність VL-ділянки мишачого 3D6.

ATGATGAGTCCTGCCAGTTCTGTTCTGTAGTGCTCTGGATTCTGGGAAACCAACGG
 ITATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTTGGACAACCAGCCT
 CCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAAT
 TGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAACT
 GGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACACTGA
 AAATCAGCAGAATAGAGGCTGAGGATTTGGACTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACAT
 TTCTCTCGGACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 1)

*Підкреслений ведучий пептид.

Праймери, використовувані для клонування кДНК VL-ділянки антитіла 3D6, подані в Табл. 10.

Таблиця 10

ДНК	Розмір	Кодувальна нитка	ДНК-послідовність	Примітки
3806	40	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.G TT.GCC.TGT.TAG.GCT.GTT .GGT.GCT.G (SEQ ID NO:39)	Каппа-змінний праймер 1 миші MKV PRIMER 1, Набір MRC; % A+T=50,00 [20]; % C+G=50,00 [20] Davis, Botstein, Roth Темп. плавл. 72,90°C
3807	39	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.G WC.AGA.CAC.ACT.CCT.GY T.ATG.GGT (SEQ ID NO:40)	Каппа-змінний праймер 2 миші MKV PRIMER 2, Набір MRC; % A+T=46,15 [18]; % C+G 48,72 [19] Davis, Botstein, Roth Темп. плавл. 72,05°C
3808	40	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.T GT.GCT.CAC.TCA.GGT.CC T.GGS.GTT.G (SEQ ID NO:41)	Каппа-змінний праймер 3 миші MKV PRIMER 3, Набір MRC; % A+T = 45,00 [18]; % C+G = 52,50 [21] Davis, Botstein, Roth Темп. плавл. 73,93°C
3809	43	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.G RC.CCC.TGC.TCA.GWT.TY T.TGG.MWT.CTT.G (SEQ ID NO:42)	Каппа-змінний праймер 4 миші MKV PRIMER 4, Набір MRC; % A+T=41,86 [18]; % C+G = 46,51 [20] Davis, Botstein, Roth Темп. плавл. 72,34°C
3810	40	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.TT T.WCA.GGT.GCA.GAT.TWT .CAG.CTT.C (SEQ ID NO:43)	Каппа-змінний праймер 5 миші MKV PRIMER 5, Набір MRC % A+T = 52,50 [21]; % C+G = 42,50 [17] Davis, Botstein, Roth Темп. плавл. 69,83°C
3811	37	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.G TK.OTC.TGY.TSA.GYT.YCT .GRG.G (SEQ ID NO:44)	Каппа-змінний праймер 6 миші MKV PRIMER 6, Набір MRC; % A+T = 37,84 [14]; % C+G = 40,54 [15] Davis, Botstein, Roth Темп. плавл. 68,01°C
3812	41	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.C WT.CAA.GAT.GGA.GTC.AC A.KWY.YCW.GG (SEQ ID NO:45)	Каппа-змінний праймер 7 миші MKV PRIMER 7 Набір MRC; % A+T = 39,02 [16]; % C+G = 46,34 [19] Davis, Botstein, Roth Темп. плавл. 71,70°C

3813	41	Наявна	ACT.AGT.OSA.CAT.GTG.G GG.AYC.TKT.TTY.CMM.TTT .TTC.AAT.TG (SEQ ID NO:46)	Каппа-змінний праймер 8 миші MKV PRIMER 8, Набір MRC; % A+T = 53,66 [22]; % C+G = 34,15 [14] Davis, Botstein, Roth Темп. плавл. 66,70°C
3814	35	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GGT.R TC.CWC.ASC.TCA.GTT.CC T.TG (SEQ ID NO:47)	Каппа-змінний праймер 9 миші MKV PRIMER 9, Набір MRC; % A+T = 45,71 [16]; % C+G = 45,71 [16] Davis, Botstein, Roth Темп. плавл. 69,36°C
3815	37	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GTA.TA T.ATG.TTT.GTT.GTC.TAT.T TC.T (SEQ ID NO:48)	Каппа-змінний праймер 10 миші MKV PRIMER 10, Набір MRC; % A+T = 70,27 [26]; % C+G = 29,73 [11] Davis, Botstein, Roth Темп. плавл. 63,58°C
3816	38	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.A GC.CCC.AGC.TCA.GCT.TC T.CTT.CC (SEQ ID NO:49)	Каппа-змінний праймер 11 миші MKV PRIMER 11, Набір MRC; % A+T = 44,74 [17]; % C+G = 55,26 [21] Davis, Botstein, Roth Темп. плавл. 74,40°C
3817	27	Відсутня	GGA.TCC.CGG.GTG.GAT.G GT.GGG.AAG.AT 3 (SEQ ID NO:50)	Каппа легколанцюговий реверсний праймер миші, aa 116-122; Праймер постійної ділянки Ск Набір MRC+Small-сайт; % A+T = 47,06 [8]; % C+G = 52,94 [9] Davis, Botstein, Roth Темп. плавл. 57,19°C
3818	37	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.AT G.CAG.CTG.GGT.CAT.STT. CTT.C (SEQ ID NO:51)	Важкий змінний праймер 1 миші MHV primer 1, Набір MRC;
3819	36	Наявна	kCT.AGT.CGA.CAT.GGG.AT G.GAG.CTR.TAT.CAT.SYT. CTT (SEQ ID NO:52)	Важкий змінний праймер 2 миші MHV primer 2, Набір MRC;
3820	37	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.G WT.GTG.GTT.AAA.CTG.GG T.TTT.T (SEQ ID NO:53)	Важкий змінний праймер 3 миші MHV primer 3, Набір MRC;
3821	35	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GRA.C TT.TGG.GYT.CAG.CTT.GR T.TT (SEQ ID NO:54)	Важкий змінний праймер 4 миші MHV primer 4, Набір MRC;
3822	40	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.C TC.CAG.GCT.CAA.TTT.AGT .TTT.CCT.T (SEQ ID NO:55)	Важкий змінний праймер 5 миші MHV primer 5, Набір MRC;

3823	37	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GGC.T GT.CYT.RGS.GCT.RCT.CTT .CTG.C (SEQ ID NO:56)	Важкий змінний праймер 6 миші MHV primer 6, Набір MRC;
3824	36	Наявна	ACT.AGT.OGA.CA.T.GGR.A TG.GAG.CKG.GRT.CTT.TM T.CTT (SEQ ID NO:57)	Важкий змінний праймер 7 миші MHV primer 7, Набір MRC;
3825	33	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.A GT.GCT.GAT.TCT.TTT.GTG (SEQ ID NO:58)	Важкий змінний праймер 8 миші MHV primer 8, Набір MRC;
3826	40	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GGM.T TG.GGT.GTG.GAM.CTT.GC T.ATT.CCT.G (SEQ ID NO:59)	Важкий змінний праймер 9 миші MHV primer 9, Набір MRC;
3827	37	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.C AG.ACT.TAC.ATT.CTC.ATT. CCT.G (SEQ ID NO:60)	Важкий змінний праймер 10 миші MHV primer 10, Набір MRC;
3828	38	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.TT T.TGG.GCT.GAT.TTT.TTT.T AT.TG (SEQ ID NO: 61)	Важкий змінний праймер 11 миші MHV primer 11, Набір MRC;
3829	37	Наявна	ACT.AGT.CGA.CAT.GAT.G GT.GTT.AAG.TCT.TCT.GTA .CCT.G (SEQ ID NO:62)	Важкий змінний праймер 12 миші MHV primer 12, Набір MRC;
3832	27	Відсутня	GGA.TCC.CGG.GAG.TGG.A TA.GAC.TGA.TGG (SEQ ID NO: 63)	Важколанцюговий реверсний праймер мишачого IgG2b. Положення амінокислот 119- 124, набір MRC;

Від N-кінця до C-кінця як легкий, так і важкий ланцюги містять домени FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. Позначення амінокислот кожного з доменів відповідає нумераційній угоді Кабата [Kabat et al.], див. вище.

Експресія химерного антитіла 3D6. Змінні ділянки важкого і легкого ланцюгів були реконструйовані на кодування розщеплювальних донорних послідовностей нижче від відповідних точок з'єднання VDJ або VJ і клоновані у вектор експресії ссавця pCMV-hy1 для важкого ланцюга і pCMV-hk1 для легкого ланцюга. Ці вектори кодують людські постійні ділянки $\gamma 1$ і κ як екзонні фрагменти нижче від вставленого кластера змінних ділянок. Після перевірки послідовностей вектори експресії важкого і легкого ланцюгів були сумісно трансфіковані в COS-клітини. Два різних важколанцюгових клони (H2.2 і H3.2) були незалежно співтрансфіковані з трьома різними химерними легколанцюговими клонами (L3, L4 і L10) для підтвердження відтворюваності результату. Як позитивний контроль для векторів була проведена трансфекція химерного антитіла 21.6. Через 48 годин після трансфекції кондиціоноване середовище було зібране і проаналізоване методом Вестерн-блоттингу на вироблення антитіл та методом ELISA на зв'язування з Аβ.

Усі трансфектанти експресували комбінації «важкий ланцюг+легкий ланцюг», які розпізнаються антитілом IgG(H+L) «коза проти людини» на Вестерн-блоттингу.

Безпосереднє зв'язування антитіл 3D6 і химерного 3D6 (PK1614) з Аβ тестували за допомогою ELISA-аналізу. Результати показали, що химерне 3D6 зв'язується з Аβ з високою авідністю, подібною тій, що була продемонстрована антитілом 3D6 (Фіг.3А). Крім того, ELISA-аналіз конкурентного інгібування показав, що химерне 3D6 і мишаче 3D6 однаково конкурують з біотинільованим 3D6 за зв'язування з Аβ (Фіг.3В). Химерне антитіло продемонструвало властивості зв'язування, що не відрізнялися від еталонного зразка 3D6.

Таблиця 11

Концентрація, мкг/мл	3D6	PK1614	IgG1
0,037		119,3	
0,11	118,6	118,9	
0,33	99,7	71,25	
1	98,63	84,53	134,4

Крім того, як 3D6, так і PK1614 ефективно видаляли бляшки Аβ. Аналіз ex vivo показав, що концентрація антитіла зростає, а кількість Аβ зменшується однаковою мірою як з мишачим, так і з химерним антитілами 3D6. Отже, можна зробити висновок, що ці послідовності кодують функціональні, відповідно, важкий і легкий ланцюги антитіла 3D6.

Приклад VII

Гуманізація 3D6

Гомологічне молекулярне моделювання. З метою ідентифікації ключових структурних каркасних залишків у мишачому антитілі 3D6 була спроектована тримірна модель на основі мишачих антитіл, найближчих за важкими і легкими ланцюгами. Для цього, як матриця для моделювання легкого ланцюга (PDB ID: 1CR9 [Капуо et al., див. вище]) 3D6, було вибрано антитіло, позначене як 1CR9, а для моделювання важкого ланцюга (PDB ID: 1OPG [Kodandapani et al., див. вище]) як матриця було вибрано антитіло, позначене 1OPG (див. також Табл. 1). Порівняння амінокислотних послідовностей 3D6 з легким і важким ланцюгом цих антитіл показало, що, за винятком ділянок CDR3 важкого ланцюга, антитіла 1CR9 і 1OPG мають значну послідовнісну гомологію з антитілом 3D6. Крім того, петлі CDR цих антитіл

потрапляють у ті самі канонічні структурні класи Chothia, що й петлі CDR антитіла 3D6; тут також за винятком ділянок CDR3 важкого ланцюга. Таким чином, антитіла 1CR9 і 1OPG були вибрані як носії визначеної структури для гомологічного моделювання антитіла 3D6.

Перша модель гомологи змінної ділянки антитіла 3D6 на базі антитіл, зазначених вище, була сконструйована за допомогою програмного пакета Look & SegMod Modules GeneMine (v3.5). Цей програмний продукт був придбаний за постійною ліцензією у групи Molecular Applications Group (Palo Alto, CA). Даний програмний пакет авторів др. Michael Levitt і др. Chris Lee полегшує процес молекулярного моделювання автоматизуванням стадій, залучених до структурного моделювання первинної послідовності на матриці відомої структури на основі гомології послідовностей. У процесі роботи програми на професійній EOM Silicon Graphics IRIS у середовищі UNIX модельована структура автоматично удосконалюється, проходячи через низку стадій енергетичної мінімізації з видаленням небажаних міжатомних контактів і оптимізацією електростатичних і вандерваальсових взаємодій.

Наступна вдосконалена модель була побудована з використанням потужності моделювання продукту Quanta®. Опитування бази даних PDB щодо CDR3 важкого ланцюга антитіла 3D6 ідентифікувало 1qkz як найбільш гомологічну і таку, що має кількість залишків, ідентичну 3D6. Отже, ділянка CDR3 важкого ланцюга антитіла 3D6 була змодельована на матриці кристалічної структури 1qkz. На Фіг.4 показаний слід а-вуглецевого каркасу моделі антитіла 3D6. Тут VH-домен показаний пунктирною лінією, VL-домен - суцільною лінією, а петлі CDR показані у формі смужок.

Вибір послідовностей акцепторного антитіла людини. Підходящі послідовності акцепторного антитіла людини були ідентифіковані шляхом комп'ютерного порівняння амінокислотних послідовностей мишачих змінних ділянок з послідовностями відомих людських антитіл. Це порівняння проводилося окремо для важкого і легкого ланцюгів 3D6. Зокрема, були ідентифіковані змінні домени із людських антитіл, каркасні послідовності яких вказували великий ступінь ідентичності з VL- і VH-каркасними ділянками миші. Зроблено це було шляхом опитування бази даних Кабата за допомогою NCBI BLAST (загально доступного через інтернет-сервер NCBI Державних установ з охорони здоров'я) щодо відповідних мишачих каркасних послідовностей.

Як акцепторні послідовності були вибрані два кандидати на основі таких критеріїв: (1) гомологія з послідовністю об'єкта; (2) подібність канонічних структур CDR донорній послідовності; (3) відсутність будь-яких рідких амінокислотних залишків на каркасних ділянках. Вибраною акцепторною послідовністю для VL стала послідовність за номером Кабата (KABID) 019230 (номер доступу в Генбанку: Genbank Accession No. S40342), а для VH - послідовність KABID 045919 (номер доступу в Генбанку: Genbank Accession No. AF115110). Ці вибрані акцепторні послідовності антитіла були використані у перших версіях гуманізованого антитіла 3D6.

Заміщення амінокислотних залишків. Як відзначалося вище, гуманізовані антитіла за даним винаходом містять змінні каркасні ділянки практично із людського імуноглобуліну (акцепторний імуноглобулін) і ділянки визначення комплементарності практично із мишачого імуноглобуліну (донорного імуноглобуліну), що має назву 3D6. Після ідентифікації ділянок визначення комплементарності антитіла 3D6 і підходящих акцепторних імуноглобулінів людини наступною стадією було визначення того, які залишки, якщо такі взагалі є, цих компонентів потрібно замінити для оптимізації властивостей отримуваного в результаті гуманізованого антитіла. Для вибору залишків на заміщення використовувалися описані вище критерії.

На Фіг.1 і 2 відображено порівняння оригінальних VL і VH мишачого 3D6 з відповідною версією 1 гуманізованої послідовності, відповідною каркасною акцепторною послідовністю людини і, нарешті, послідовністю V-ділянки людської зародкової лінії, що вказує максимальну гомологію з каркасною акцепторною послідовністю людини. Виділені залишки вказують на канонічні (суцільне заповнення), верньєрні (пунктирні рамки), заповнювальні (жирний звичайний шрифт) і рідкі (жирний курсив) амінокислоти. Зірочками позначені залишки, зворотно мutowані у мишачі залишки в акцепторній каркасній послідовності людини. CDR-ділянки показані виведеними назовні. Підсумок мутацій, убудованих у версію 1 VH і VL гуманізованого 3D6, поданий у Табл. 12.

Таблица 12

Підсумок мутацій у гуманізованому 3D6.V1

Мутації	VL (112 залишків)	VH (119 залишків)
Люд.->Миш.: Каркас	4/112	3/119 (1 канон., 1 заповн.)
CDR1	6/16	3/5
CDR2	4/7	7/14
CDR3	5/8	4/10
Люд.->Миш.	19/112(17%)	17/119(14%)
Миш.->Люд.: Каркас	13/112	14/119
Примітки до зворотних мутацій	1. I2V, що є канонічним положенням. 2. Y36L, що є заповнювальним залишком і також лежить під CDR-ділянками. 3. L46R, що є заповнювальним залишком і лежить нижче CDR-ділянок.	4. S49A Верньєрний, нижче CDR-ділянок. 5. A93V, що є заповнювальним залишком і лежить під верньєрною зоною. 6. K94R, що є канонічним залишком.
Примітки до акцепторів	7. KABID 019230/Genbank Acc#S40342 8. Людськ. LC підгрупа II 9. CDR із тої самої канонічної структурної групи, що і донор (m3D6) L1=клас 4	11. KABID 045919/Genbank Acc#AF115110 12. Людськ. HC підгрупа III 13. CDR із тої самої канонічної структурної групи, що і донор (m3D6) H1=клас 1

	L2=клас 1 L3=клас 1 10. Невідома специфічність	H2=клас 3 14. Розпізнає капсульний полісахарид Neisseria meningitidis
Акцепторна зародкова лінія	15.VH3-23	16.A3&A19

У Табл. 13 і 14 наведені ключі до нумерації Кабата для різноманітних легких і важких ланцюгів, відповідно.

Таблиця 13

Ключ до нумерації Кабата для легкого ланцюга

№ Кабата	№	Тип	VL3D6 миші	VL 3D6 людини	KABID 019230	Зарод. лінія A19	Примітки
1	1	FR1	Y	Y	D	D	Рідкий залишок миші може контактувати з CDR Канонічний/контакт з CDR
2	2		V	V	I	I	
3	3		V	V	V	V	
4	4		M	M	M	M	
5	5		T	T	T	T	
6	6		Q	Q	Q	Q	
7	7		T	S	S	S	
8	8		P	P	P	P	
9	9		L	L	L	L	
10	10		T	S	S	S	
11	11		L	L	L	L	
12	12		S	P	P	P	
13	13		V	V	V	V	
14	14		T	T	T	T	
15	15		I	P	P	P	
16	16		G	G	G	G	
17	17		Q	E	E	E	
18	18		P	P	P	P	
19	19		A	A	A	A	
20	20		S	S	S	S	
21	21		I	I	I	I	
22	22		S	S	S	s	
23	23		C	C	C	C	
24	24	CDR1	K	K	R	R	
25	25		S	S	S	S	
26	26		S	S	S	S	
27	27		Q	Q	Q	Q	
27A	28		S	S	S	S	
27B	29		L	L	L	L	
27C	30		L	L	L	L	
27D	31		D	D	H	H	
27E	32		S	S	S	S	
28	33		D	D	N	N	
29	34		G	G	G	G	
30	35		K	K	Y	Y	
31	36	FR2	T	T	N	N	
32	37		Y	Y	Y	Y	
33	38		L	L	L	L	
34	39		N	N	D	D	
35	40		W	W	W	W	
36	41		L	L	Y	Y	
37	42		L	L	L	L	
38	43		Q	Q	Q	Q	
39	44	FR2	R	K	K	K	Заповн. залиш.
40	45		P	P	P	P	
41	46		G	G	G	G	
42	47		Q	Q	Q	Q	
43	48		S	S	S	S	
44	49		P	P	P	P	
45	50		K	Q	Q	Q	
46	51		R	R	L	L	
47	52		L	L	L	L	
48	53		I	I	I	I	
49	54		Y	Y	Y	Y	
50	55	CDR2	L	L	L	L	Заповн. залиш.
51	56		V	V	G	G	

52	57		S	S	S	S	
53	58		K	K	N	N	
54	59		L	L	R	R	
55	60		D	D	A	A	
56	61		S	S	S	S	
57	62	FR3	G	G	G	G	
58	63		V	V	V	V	
59	64		P	P	P	P	
60	65		D	D	D	D	
61	66		R	R	R	R	
62	67		F	F	F	F	
63	68		T	S	S	S	
64	69		G	G	G	G	
65	70		S	S	S	S	
66	71		G	G	G	G	
67	72		S	S	S	S	
68	73		G	G	G	G	
69	74		T	T	T	T	
70	75		D	D	D	D	
71	76		F	F	F	F	
72	77		T	T	T	T	
73	78		L	L	L	L	
74	79		K	K	K	K	
75	80		I	I	I	I	
76	81		S	S	S	S	
77	82		R	R	R	R	
78	83		I	V	V	V	
79	84		E	E	E	E	
80	85		A	A	A	A	
81	86		E	E	E	E	
82	87		D	D	D	D	
83	88		L	V	V	V	
84	89		G	G	G	G	
85	90		L	V	V	V	
86	91		Y	Y	Y	Y	
87	92		Y	Y	Y	Y	
88	93		C	C	C	C	
89	94	CDR3	W	W	M	M	
90	95		Q	Q	Q	Q	
91	96		G	G	A	A	
92	97		T	T	L	L	
93	98		H	H	Q	Q	
94	99		F	F	T	T	
95	100		P	P	P	P	
96	101		R	R	R	R	
97	102		T	T	T	T	
98	103	FR4	F	F	F		
99	104		G	G	G		
100	105		G	Q	Q		
101	106		G	G	G		
102	107		T	T	T		
103	108		K	K	K		
104	109		L	V	V		
105	110		E	E	E		
106	111		I	I	I		
106A	112		K	K	K		

Таблиця 14

Ключ до нумерації Кабата для важкого ланцюга

№ Кабата	№	Тип	VH3D6 миші	VH3D6 людини	KABID 045919	Зарод. лінія VH3-23	Примітки
1	1	FR1	E	E	E	E	
2	2		V	V	V	V	
3	3		K	Q	Q	Q	
4	4		L	L	L	L	
5	5		V	L	L	L	
6	6		E	E	E	E	
7	7		S	S	S	S	
8	8		G	G	G	G	
9	9		G	G	G	G	

10	10		G	G	G	G	
11	11		L	L	L	L	
12	12		V	V	V	V	
13	13		K	Q	Q	Q	
14	14		P	P	P	P	
15	15		G	G	G	G	
16	16		A	S	S	S	
17	17		S	L	L	L	
18	18		L	R	R	R	
19	19		K	L	L	L	
20	20		L	S	S	S	
21	21		S	C	C	C	
22	22		C	A	A	A	
23	23		A	A	A	A	
24	24		A	S	S	S	
25	25		S	G	G	G	
26	26		G	F	F	F	
27	27		F	T	T	T	
28	28		T	F	F	F	
29	29		F	S	S	S	
30	30		S				
31	31	CDR1	N	N	S	S	
32	32		Y	Y	Y	Y	
33	33		G	G	A	A	
34	34		M	M	V	M	
35	35		S	S	S	S	
36	36	FR2	W	W	W	W	
37	37		V	V	V	V	
38	38		R	R	R	R	
39	39		Q	Q	Q	Q	
40	40		N	A	A	A	Рідк. залишок миші, заміщ. w/люд.
41	41		S	P	P	P	
42	42		D	G	G	G	Рідк. залишок миші, заміщ. w/люд.
43	43		K	K	K	K	
44	44		R	G	G	G	
45	45		L	L	L	L	
46	46		E	E	E	E	
47	47		W	W	W	W	
48	48		V	V	V	V	
49	49		A	A	S	S	CDR контакт./зовнішній шар
50	50	CDR2	S	S	A	A	
51	51		I	I	I	I	
52	52		R	R	S	S	
52A	53		S	S	G	G	
53	54		G	G	S	S	
54	55		G	G	G	G	
55	56		G	G	G	G	
56	57		R	R	S	S	
57	58		T	T	T	T	
58	59		Y	Y	Y	Y	
59	60		Y	Y	A	A	
60	61		S	S	D	D	
61	62		D	D	S	S	
62	63		N	N	V	V	
63	64		V	V	K	K	
64	65		K	K	G	G	
65	66		G	G			
66	67	FR3	R	R	R	R	
67	68		F	F	F	F	
68	69		T	T	T	T	
69	70		I	I	I	I	
70	71		S	S	R	R	
71	72		R	R	D	D	
72	73		E	D	N	N	
73	74		N	N	A	S	
74	75		A	A	K	K	
75	76		K	K	N	N	
76	77		N	N	S	T	
77	78		T	S	L	L	
78	79		L	L			

79	80		Y	Y	Y	Y	
80	81		L	L	L	L	
81	82		Q	Q	Q	Q	
82	83		M	M	M	M	
82A	84		S	N	N	N	
82B	85		S	S	S	S	
82C	86		L	L	L	L	
83	87		K	R	R	R	
84	88		S	A	A	A	
85	89		E	E	E	E	
86	90		D	D	D	D	
87	91		T	T	T	T	
88	92		A	A	A	A	
89	93		L	L	L	V	
90	94		Y	Y	Y	Y	
91	95		Y	Y..	Y	Y	
92	96		C	C	C	C	
93	97		V	V	A	A	Заповнювальн. залишок, використ. миші
94	98		R	R	K	K	Канонічний, використ. миші
95	99	CDR3	Y	Y	D		
96	100		D	D	N		
97	101		H	H	Y		
98	102		Y	Y	D		
99	103		S	S	F		
100	104		G	G	W		
100A	105		S	S	S		
100B	106		S	S	G		
100C	107		-	-	T		
100D	108		-	-	F		
101	109		D	D	D		
102	110		Y	Y	Y		
103	111	FR4	W	W	W		
104	112		G	G	G		
105	113		Q	Q	Q		
106	114		G	G	G		
107	115		T	T	T		
108	116		T	L	L		
109	117		N	V	V		
110	118		T	T	T		
111	119		N	V	N		
112	120		S	S	S		
113	121		S	S	S		

У кращому варіанті здійснення гуманізованих антитіл вказують афінність специфічного зв'язування з Аβ на рівні, принаймні, 10^7 , 10^8 , 10^9 або 10^{10} M^{-1} . Зазвичай, верхня межа афінності зв'язування гуманізованих антитіл з Аβ є в три, чотири або п'ять разів вищою за аналогічну межу антитіла 3D6, тобто приблизно 10^9 M^{-1} . Нерідко нижня межа афінності зв'язування також перевищує нижню межу антитіла 3D6 у три, чотири і п'ять разів.

Збирання й експресія VH і VL гуманізованого 3D6, версія 1. Для кожної V-ділянки було синтезовано по 4 великих одониткових олігонуклеотиди, що перекриваються. Крім того, з метою ще більшого полегшення збирання конкретної V-ділянки для кожної з них було синтезовано 4 коротких PCR-праймери. ДНК-послідовності використовуваних для цієї цілі олігонуклеотидів наведені в Табл. 15.

Таблиця 15. Олігонуклеотиди ДНК.

№ ДНК	Розмір	Кодування ?	Послідовність	Примітки
4060	136	Так	tccgc aagct tgccg ccacc ATGGA CATGC GCGTG CCCGC CCAGC TGCTG GGCCT GCTGA TGCTG TGGGT GTCCG GCTCC TCCGG CTACG TGGTG ATGAC CCACT CCCCC CTGTC CCTGC CCGTG ACCCC CGGCG A (SEQ ID NO:17)	hum 3D6 VL-A
4061	131	Ні	CTGGG GGGAC TGGCC GGGCT TCTGC AGCAG CCACT TCAGG TAGGT CTTGC CGTCG GAGTC CAGCA GGGAC TGGGA GGAAT TGCAG GAGAT GGAGG CGGGC TCGCC GGGGG TCACG GGCAG GGACA GGGGG G (SEQ ID NO:18)	hum 3D6 VL-B

4062	146	Так	ACCTG AACTG GCTGC TGCAG AAGCC CGGCC AGTCC CCCC GCGCC TGATC TACCT GGTGT CCAAG CTGGA CTCCG GCGTG CCCGA CCGCT TCTCC GGCTC CGGCT CCGGC ACCGA CTTCA CCCTG AAGAT CTCCC GCGTG GAGGC C (SEQ ID NO:19)	hum 3D6 VL-C
4063	142	Hi	aattc tagga tccac tcacg CTTGA TCTCC ACCTT GGTGC CCTGG CCGAA GGTGC GGGGG AAGTG GGTGC CCTGC CAGCA GTAGT ACACG CCCAC GTCCT CCGCC TCCAC GCGGG AGATC TTCAG GGTGA AGTCG GTGCC GG (SEQ ID NO:20)	hum 3D6 VL-D
4064	16	Hi	CTGGG GGGAC TGGCC G (SEQ ID NO:21)	hum 3D6 VL A+B назад % A+T = 18,75 [3]; % C+G = 81,2 [13] Davis, Botstein, Roth T-ра плавл., 66,96°C
4065	22	Так	ACCTG AACTG GCTGC TGCAG AA (SEQ ID NO:22)	hum 3D6 VL C+D вперед % A+T=45,45 [10]; % C+G=54,55 [12] Davis, Botstein, Roth T-ра плавл., 64,54°C
4066	138	Так	acaga aagct tgccg ccacc ATGGA GTTTG GGCTG AGCTG GCTTT TTCTT GTGGC TATTT TAAAA GGTGT CCAGT GTGAG GTGCA GCTGC TGGAG TCCGG CCGCG GCCTG GTGCA GCCCG GCGGC TCCCT GCGCC TGT (SEQ ID NO:23)	hum 3D6 VH-A
4067	135	Hi	GCCGC CGGAG CGGAT GGAGG CCACC CACTC CAGGC CCTTG CCGGG GGCCT GCGGC ACCCA GGACA TGCCG TAGTT GGAGA AGGTG AAGCC GGAGG CCGCG CAGGA CAGGC GCAGG GAGCC GCCGG GCTGC ACCAG (SEQ ID NO:24)	hum 3D6 VH-B
4068	142	Так	CTGGA GTGGG TGGCC TCCAT CCGCT CCGGC GCGCG CCGCA CCTAC TACTC CGACA ACGTG AAGGG CCGCT TCACC ATCTC CCGCG ACAAC GCCAA GAACT CCCTG TACCT GCAGA TGAAC TCCCT GCGCG CCGAG GACAC CG (SEQ ID NO:25)	hum 3D6 VH-C

4069	144	Hi	ctgca aggat ccact caccG GAGGA CACGG TCACC AGGGT GCCCT GGCCC CAGTA GTCGG AGGAG CCGGA GTAGT GGTCG TAGCG CACGC AGTAG TACAG GCGCG TGTCC TCGGC GCGCA GGGAG TTCAT CTGCA GGTAC AGGG (SEQ ID NO:26)	hum 3D6 VH-D
4070	16	Hi	GCCGC CGGAG CGGAT G (SEQ ID NO:27)	hum 3D6 VH A+B назад % A+T=18,75 [3]; % C+G = 81,25 [13] Davis, Botstein, Roth Т-ра плавл., 66,96°C
4071	20	Так	CTGGA GTGGG TGGCC TCCAT (SEQ ID NO:28)	hum 3D6 VH C+D вперед % A+T=35,00 [7]; % C+G=65,00 [13] Davis, Botstein, Roth Т-ра плавл., 66,55°C
4072	19	Так	tcc gca agc ttg ccg cca c (SEQ ID NO:29)	hum 3D6 VL A+B вперед % A+T=31,58 [6]; % C+G=68,42 [13] Davis, Botstein, Roth Т-ра плавл., 66,64°C
4073	29	Hi	aat tct agg atc cac tca cgC TTG ATC TC (SEQ ID NO:30)	hum 3D6 VL C+D назад % A+T=55,17 [16]; % C+G=44,83 [13] Davis, Botstein, Roth Т-ра плавл., 66,04°C
4074	23	Так	aca gaa agc ttg ccg cca ccA TG (SEQ ID NO:31)	hum 3D6 VH A+B вперед % A+T=43,48 [10]; % C+G=56,52 [13] Davis, Botstein, Roth Т-ра плавл., 66,33°C
4075	22	Hi	ctg caa gga tcc act cac cGG A (SEQ ID NO:32)	hum 3D6 VH C+D назад % A+T=40,91 [9]; % C+G=59,09 [13] Davis, Botstein, Roth Т-ра плавл., 66,40°C

Гуманізований легкий ланцюг збирали за допомогою PCR (полімеразно-ланцюгової реакції). Аналіз послідовності ДНК більш ніж двох десятків клонів виявив наявність розкиданих точкових мутацій і делецій по VL-ділянці стосовно очікуваної послідовності. Аналіз послідовностей показав, що клон 2.3 піддавався на репарацію двох близько розташованих поодиноких нуклеотидних делецій на аміно-кінцевій ділянці. Отже, сайт-спрямований мутагенез здійснювався на клоні pCRShum3D6v12.3 за допомогою олігонуклеотидів з уведенням двох втрачених нуклеотидів, і репарація точкових мутацій була підтверджена аналізом ДНК-послідовності, а VL-вставка була клонована у вектор експресії pCMV-cK легкого ланцюга.

Збирання гуманізованої VH за допомогою методів на основі PCR-реакції дозволило одержати клони з великими делеціями на 5'-половині послідовності. Подальші зусилля щодо оптимізації умов PCR-реакції досягли лише часткового успіху. Клон, зібраний в оптимізованих умовах PCR-реакції, все ще мав 10-20 nt делецій на ділянці, карта якої лягає на перекриття фрагментів A+B. Відповідно до цього для збирання VH була застосована інша стратегія із використанням опосередкованого ДНК-полімераза (T4, Klenow, і секвенаса) розширення перекриття з наступним використанням T4 ДНК-лігази для ковалентного з'єднання кінців, що перекриваються. Аналіз ДНК-послідовності субпопуляції клонів, отриманих збиранням VH, використовуючи останній з цих підходів, показав наявність розкиданих точкових мутацій і делецій серед клонів. Аналіз більше ніж двох десятків клонів показав практично таку саму картину, що й для самих клонів. Аналогічні результати, отримані після першого експерименту зі збирання VH- і VL-клонів, вказують на те, що помилки ДНК-послідовності, що спостерігалися, виникали через похибки автоматичного синтезатора у процесі синтезу довгої ДНК, що використовувалася для збирання.

Гуманізований VH-клон 2.7 був вибраний для сайт-направленої, опосередкованої мутагенезом репарації трьох нуклеотидних делецій, які він згідно зі спостереженнями містив.

Приклад VIII

Характеризація гуманізованого антитіла 3D6v2

Була створена друга версія гуманізованого антитіла 306, яка мала всі заміщення, зазначені для версії 1, за винятком заміщення D→Y на залишку 1. Заміщення на цьому залишку у версії 1 було здійснене через те, що цей залишок був ідентифікований як такий, що взаємодіє з CDR-ділянкою. Але внаслідок цього заміщення був утрачений залишок, який є рідким для людських імуноглобулінів у цьому положенні. Отже була створена версія без даного заміщення. Крім того, залишки незародкової лінії на каркасних ділянках

важкого ланцюга були заміщені на залишки зародкової лінії, а саме на H74=S, H77=T і H89=V. Нумерація Кабата для легкого і важкого ланцюгів версії 2 є такою самою, як відображено в Табл. 13 і 14, відповідно, за винятком того, що залишком 1 легкого ланцюга версії 2 є asp (D), залишком 74 важкого ланцюга є ser (S), залишком 77 важкого ланцюга є thr (T), а залишком 89 важкого ланцюга є val (V). Нуклеотидні послідовності легкого і важкого ланцюгів версії 1 гуманізованого 3D6 позначені як SEQ ID NO:34 і 36, відповідно. Нуклеотидні послідовності легкого і важкого ланцюгів версії 2 гуманізованого 3D6 позначені як SEQ ID NO:35 і 37, відповідно.

Приклад IX

Функціональні випробування гуманізованих антитіл 3D6

Зв'язування гуманізованого 3D6v1 з агрегатованим Аβ. Функціональні випробування гуманізованого 3D6v1 проводилися при використанні кондиціонованого середовища від COS-клітин, підданих перехідній трансфекції. Ці клітини були трансфектовані повністю химерним антитілом, як сумішшю «химерний важкий ланцюг+гуманізований легкий ланцюг», так і сумішшю «химерний легкий ланцюг+гуманізований важкий ланцюг» і, нарешті, повністю гуманізованим антитілом. Кондиціоноване середовище було протестоване на зв'язування з агрегатованим Аβ1-42 за допомогою ELISA-аналізу. Гуманізоване антитіло показало добру активність у межах експериментальної похибки і продемонструвало зв'язувальні властивості, що не відрізнялися від еталонного зразка химерного 3D6. Результати цих випробувань подані в Табл. 16.

Таблиця 16

нг/мл	Химерне	HuVH/ChVL	ChVH/HuVL	HuVH/HuVL
690	0,83	0,811	0,867	0,895
600				
260				
230				
200				
190	0,675	0,648	0,774	0,81
87				
77				
67				
63				
29	0,45	0,438	0,594	0,689
25				
22				
21				
9,6				
8,5	0,251	0,232	0,381	0,496
7,4				
7				
3,2				
2,3				

Для порівняння афінності зв'язування гуманізованих антитіл 3D6v1 і 3D6v2 був проведений ELISA-аналіз із використанням агрегатованого Аβ як антигена. Отримані результати показують, що як 3D6v1 (H1L1), так і 3D6v2 (H2L2) мають майже ідентичні властивості зв'язування з Аβ (Fig.5).

NET-аналіз із заміщеннями h3D6v2 (rNET). rNET-Аналіз епітопної карти дозволяє одержати інформацію щодо внеску конкретних залишків в епітопі в загальну активність зв'язування антитіла. В rNET-аналізі використовуються синтезовані пептидні аналоги із систематичними поодинокими заміщеннями. Зв'язування випробуваного антитіла визначають проти природного пептиду (природного антигена) і проти 19 альтернативних «однозаміщених» пептидів, кожний з яких є заміщеним у першому положенні однією із 19 амінокислот, що не є природними в цьому положенні. По результатах випробувань будують профіль зв'язування, який відображає ефекти заміщення в цьому положенні різними неприродними для цього положення залишками. Подібним чином будуються профілі для послідовних положень уздовж антигенного пептиду. Після цього скомбінований профіль або епітопна карта (що відображає заміщення в кожному положенні всіма 19 неприродними залишками) може бути порівняна з картою, аналогічним чином побудованою для другого антитіла. Практично однакові або ідентичні карти свідчать про те, що порівнювані антитіла мають однакову або подібну епітопну специфічність.

Такий аналіз був проведений для 3D6 і гуманізованого 3D6 версії 2. Антитіла були протестовані на зв'язування проти природного пептиду Аβ: DAEFRHDSGY (SEQ ID NO:33). Його залишки 1-8 систематично заміщувалися кожним із 19 неприродних для цього положення залишків. Карти будувалися відповідним чином для 3D6 і h3D6v2. Отримані результати представлені в табличній формі в Табл. 17.

Таблиця 17

Аβ: Net-епітопне картування із заміщенням (rNET- картування) антитіла wt3D6 і гуманізованого 3D6

Заміщення	3D6 [OD] дикого типу	3D6 [OD] гуманізоване	Заміщення	3D6 [OD] дикого типу	3D6 [OD] гуманізоване
Залишок 1=A	0,464	0,643	Залишок 5=A	0,275	0,435
C	0,450	0,628	C	0,359	0,635
D	0,577	0,692	D	0,080	0,163
E	0,576	0,700	E	0,115	0,187

F	0,034	0,062	F	0,439	0,569
G	0,569	0,738	G	0,485	0,679
H	0,054	0,117	H	0,577	0,680
I	0,048	0,118	I	0,510	0,671
K	0,033	0,057	K	0,573	0,693
L	0,073	0,148	L	0,517	0,691
M	0,039	0,072	M	0,418	0,611
N	0,587	0,757	N	0,476	0,655
P	0,069	0,144	P	0,093	0,198
Q	0,441	0,689	Q	0,388	0,565
R	0,056	0,155	R	0,613	0,702
S	0,569	0,762	S	0,487	0,633
T	0,450	0,702	T	0,530	0,639
V	0,057	0,190	V	0,493	0,562
W	0,031	0,070	W	0,393	0,461
Y	0,341	0,498	Y	0,278	0,230
Залишок 2=A	0,548	0,698	Залишок 6=A	0,587	0,707
C	0,553	0,694	C	0,585	0,703
D	0,119	0,222	D	0,584	0,701
E	0,563	0,702	E	0,579	0,702
F	0,577	0,717	F	0,586	0,704
G	0,527	0,720	G	0,592	0,709
H	0,534	0,741	H	0,596	0,688
I	0,522	0,722	I	0,602	0,708
K	0,548	0,722	K	0,585	0,691
L	0,482	0,705	L	0,584	0,688
M	0,535	0,705	M	0,583	0,687
N	0,525	0,735	N	0,580	0,686
P	0,445	0,707	P	0,587	0,705
Q	0,567	0,756	Q	0,570	0,695
R	0,562	0,719	R	0,576	0,686
S	0,587	0,705	S	0,573	0,689
T	0,552	0,712	T	0,573	0,700
V	0,550	0,702	V	0,588	0,715
W	0,553	0,701	W	0,576	0,696
Y	0,547	0,704	Y	0,595	0,708
Залишок 3=A	0,038	0,061	Залишок 7=A	0,580	0,688
C	0,222	0,410	C	0,559	0,676
D	0,019	0,027	D	0,573	0,681
E	0,542	0,689	E	0,565	0,677
F	0,034	0,060	F	0,546	0,668
G	0,016	0,019	G	0,562	0,679
H	0,016	0,020	H	0,557	0,675
I	0,019	0,024	I	0,552	0,681
K	0,053	0,090	K	0,565	0,685
L	0,019	0,026	L	0,566	0,701
M	0,019	0,027	M	0,562	0,697
N	0,024	0,032	N	0,573	0,688
P	0,017	0,020	P	0,582	0,678
Q	0,153	0,406	Q	0,563	0,679
R	0,015	0,023	R	0,551	0,677
S	0,016	0,021	S	0,563	0,674
T	0,015	0,019	T	0,560	0,685
V	0,016	0,021	V	0,563	0,687
W	0,149	0,304	W	0,547	0,685
Y	0,016	0,020	Y	0,560	0,682
Залишок 4=A	0,016	0,020	Залишок 8=A	0,573	0,687
C	0,020	0,023	C	0,583	0,700
D	0,017	0,020	D	0,586	0,697
E	0,016	0,021	E	0,601	0,701
F	0,557	0,703	F	0,586	0,687
G	0,016	0,020	G	0,569	0,681
H	0,470	0,723	H	0,559	0,683
I	0,119	0,360	I	0,568	0,686
K	0,015	0,018	K	0,557	0,698
L	0,559	0,716	L	0,570	0,-686
M	0,549	0,725	M	0,571	0,693
N	0,085	0,089	N	0,573	0,700

P	0,030	0,056	P	0,574	0,694
Q	0,065	0,110	Q	0,590	0,703
R	0,016	0,019	R	0,589	0,699
S	0,026	0,031	S	0,599	0,719
T	0,016	0,021	T	0,586	0,689
V	0,213	0,494	V	0,578	0,688
W	0,291	0,568	W	0,567	0,687
Y	0,529	0,730	Y	0,574	0,680

Слід зауважити, що отримані профілі є практично ідентичними у 3D6 і h3D6v2, якщо подивитися на заміщення у кожному положенні (тобто, якщо порівняти дані в колонці 1 (3D6) з даними в колонці 2 (h3D6v2), то можна побачити, що величини в них мають ідентичні коливання). Ці дані свідчать про те, що специфічність h3D6v2 зберігається, оскільки rNet-епітопна карта антитіла h3D6v2 є практично ідентичною епітопній карті m3D6, що використовує як залишки 1-4 A β , так і залишки 5-8 A β .

Імуногістохімічний аналіз зрізів мозку PDAPP демонструє специфічність антитіла h3D6v1. Гуманізоване антитіло 3D6v1 розпізнає A β на приготованих у кріостаті зрізах мозку мишей PDAPP. Як гуманізоване 3D6v1, так і PK1614 зв'язуються з бляшками PDAPP з однаковим характером реакції на дозу, як це показали вимірювання величини флуоресценції (у пікселях) на мікроскопічний препарат відносно кількості антитіла, використаного для забарвлення тканини (Фіг.6). У цьому експерименті використовувалися ідентичні вторинні антитіла проти людини. Застосовувані при цьому методики готування зрізів, забарвлення і відображення були описані вище. В ідентичних експериментах аналіз зображень забарвлення h3D6v2 на зрізах PDAPP і мозку, ураженого хворобою Альцгеймера, показали, що h3D6v2 розпізнає бляшки A β так само, як і 3D6v1 (наприклад, високодекоровані бляшки).

Аналіз конкурентного зв'язування h3D6. Здатність антитіл h3D6v1 і v2 конкурувати з мишачим 3D6 вимірювалася за методом ELISA із використанням біотинільованого антитіла 3D6. Аналіз конкурентного зв'язування показав, що антитіла h3D6v1, h3D6v2 і химерне PK1614 - всі можуть конкурувати з m3D6 за зв'язування з A β (Фіг.7). Антитіла h3D6v1 і h3D6v2 були ідентичними за їхньою здатністю конкурувати з 3D6 проти A β . Як негативний контроль використовувалося антитіло 10D5, оскільки воно має відмінний від 3D6 епітоп зв'язування. Аналіз BIAcore також показав високу афінність h3D6v1 і h3D6v2 до A β (Табл. 18).

Таблиця 18

Вимірювання афінності
антитіл проти A β за методом BIAcore

Антитіло	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	Kd(nM)
Мишаче 3D6	4,06E+05	3,57E-04	0,88
Химерне 3D6	4,58E+05	3,86E-04	0,84
Гуманізоване 3D6v1	1,85E+05	3,82E-04	2,06
Гуманізоване 3D6v2	1,70E+05	3,78E-04	2,24

У порівнянні з 3D6, яке має величину Kd 0,88nM, як h3D6v1, так і h3D6v2 мають приблизно в 2-3 рази меншу афінність зв'язування, що складає 2,06nM і 2,24nM для h3D6v1 і h3D6v2, відповідно. Випробування на конкурентне зв'язування за методом ELISA показали приблизно в 6 разів меншу афінність зв'язування у h3D6v1 і h3D6v2. Гуманізовані антитіла, як правило, мають афінність зв'язування в 3-4 рази меншу, ніж їхні мишачі двійники. Отже, майже трикратна втрата (середні результати аналізів за методами ELISA і BIAcore) є для h3D6v1 і h3D6v2 у припустимих межах.

Випробування ex vivo з використанням антитіл h3D6v2. Здатність антитіла h3D6v2 стимулювати мікрогліальні клітини була протестована у випробуваннях на фагоцитоз ex vivo (Фіг.8). Антитіло h3D6v2 виказало в індукуванні фагоцитозу A β -агрегатів із тканини мозку мишей PDAPP таку саму ефективність, що і химерне 3D6. Як негативний контроль у цьому експерименті використовувався IgG, оскільки він не є здатним зв'язуватися з A β , а отже не може індукувати фагоцитоз.

In vivo локалізація h3D6v у мозку. Мишам PDAPP (14 особин) в окремих експериментах були зроблені внутрішньовенні ін'єкції мічених ізотопом ¹²⁵I антитіл h3D6v2, m3D6 і DAE13. Через 7 днів тварини були убиті, і піддані перфузії для подальших досліджень. Ділянки мозку кожної тварини були розсічені і виміряні на ¹²⁵I-активність у специфічних місцях. Радіомічена активність у мозку була порівняна з активністю у зразках сироватки. Результати аналізу подані в Табл. 19 і 20 для сироватки і ділянок мозку, відповідно.

Таблиця 19

m3D6	DAE13	Hu3D6
30389,1	17463,9	40963,8
12171	13200,6	24202,2
3418,2	36284,7	12472,4
18678,9	421,3	33851,8
27241	19702	27187,3
26398,8	24855,8	29016,9
27924,8	29287,4	33830,7
12008,4	12733,1	26734,9
29487,8	27722,5	30144,5

25498,6	30460,7	35126,9
9652	23320,1	28414,8
24599,3	7119,1	16956,1
29240	28093,5	18190,7
11922,7	24659,7	25671,4
17443,1	26748,9	

Таблиця 20

m3D6			DAE13			Hu3D6 (H2L2)		
Мозочок	Кора гол. м.	Гіпокамп	Мозочок	Кора гол. м.	Гіпокамп	Мозочок	Кора гол. м.	Гіпокамп
1991,9	1201,1	4024	1277,5	2522,9	5711,9	2424,6	3759,4	11622
238,9	746,1	2523	502,5	2123,5	6965,8	1509,8	2274,9	7018,2
645,9	603	1241,1	2325	3528,2	7801,6	500	2265,9	5316,3
1000	2508,2	4644,2	232,7	849,8	1891,9	2736,2	5703,7	10395,5
1266,9	3737,9	7975,8	891,6	2621	8245,2	1192,2	3188	10170
1422	2398,7	7731,1	1102,6	2087,5	7292,3	2269,4	3481,4	9621,6
1700,4	2154,4	7124,1	1650,6	3488,4	10284,8	1526,7	3028	8331,3
542,5	812,4	2456,8	712,9	2318,5	6643,3	1538,1	4194,1	11244,8
1309	3010,5	8693,5	1172,9	1953,6	7363	1245,7	1699,4	6831,2
1372,2	997,5	2425,4	1067,9	3697,2	12280,7	2708,8	2789	7887,4
778,6	1291,9	5654,4	1952,2	2120,7	6412,7	2251,3	3897,5	11121,5
1199,3	1683,4	4887,3	1005,2	1852,5	5121,4	1529,6	1772,2	7986,9
1021,8	3234,5	8036,2	961,5	3382,9	8473,1	644,1	1663,4	5056,5
742,1	1056,7	3405,2	852,3	1943,2	6717,4	1516,4	1620,6	9888
1273,7	1320,8	4262,6	997,5	3065,7	10213,1			

Ці дані показують, що антитіло h3D6v2 локалізувалося в мозку, причому місцем його особливо високої концентрації була ділянка гіпокампу, де, як відомо, агрегується Аβ. Щодо антитіл m3D6 і DAE13, то їхня здатність локалізуватися в мозку була порівняною з h3D6v2. Всі три антитіла були здатні проходити через гемато-бар'єр, як це продемонструвало зв'язування *in vivo* з бляшками Аβ.

Приклад X

Клонування і секвенування змінних ділянок мишачого 10D5

Клонування і аналіз послідовності VH антитіла 10D5. VH- і VL-ділянки антитіла 10D5 із клітин гібридоми були клоновані за методом RT-PCR, використовуючи процедури 5'-RACE. У Табл. 21 і на Фіг.9 подані нуклеотидна послідовність (SEQ ID NO:13) і виведена амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:14), одержані із двох незалежних кДНК-клонів, що кодують імовірний VL-домен антитіла 10D5. У Табл. 22 і на Фіг.10 подані нуклеотидна послідовність (SEQ ID NO:15) і виведена амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:16), одержані із двох незалежних кДНК-клонів, що кодують імовірний VH-домен антитіла 10D5. Ці VL- і VH-послідовності антитіла 10D5 задовольняють критеріям для функціональних V-ділянок, оскільки вони містять суміжну відкриту рамку зчитування (ORF) від ініціаторного метіоніну до C-ділянки і також мають збережені залишки, характерні для генів V-ділянки імунoglobulinу.

Таблиця 21. ДНК-послідовність VL-ділянки мишачого 10D5.

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTACTGATGTTCTGGATTCCCTGCTCCAGCAGTGA
 TGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCA
 TCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTATACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGG
 TACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATT
 TTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGA
 TCAAGAAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTAAGTCTTCAAGGTTACATGTT
 CCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGGAA (SEQ ID NO: 13)

*Підкреслений ведучий пептид

Таблиця 22. ДНК-послідовність VH-ділянки мишачого 10D5.

ATGGACAGGCTTACTTCCTCATTCCCTGCTGCTGATTGTCCCTGCATATGTCCTGTCCCA
 GGCTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGAATATTGCAGTCTCCAGACCCCTCAGTCTGA
 CTTGTTCTTTCTCTGGGTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGAGTGAGCTGGATTCTG
 CAGCCTTCAGGAAAGGCTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCG
 CTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAAGCAGG
 TATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACCCCTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGTTCTGA
 AGGCCCATTAAGTCCGGTACTAGTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
 CACCGTCTGCTCA (SEQ ID NO:15)

*Підкреслений ведучий пептид

Приклад XI

Профілактика і терапія для людей

Для визначення безпечності лікарського засобу для людей був проведений односторовий експеримент Фази I. Терапевтичний агент вводили різним пацієнтам у дозах, що наростали, починаючи від 0,01, рівня припустимої ефективності, і далі з трикратним збільшенням до рівня, який приблизно в 10 разів перевищував ефективну дозу для мишей.

Далі для визначення терапевтичної ефективності був проведений експеримент Фази II. Для цього експерименту були добрані пацієнти, що страждали на хворобу Альцгеймера від раннього до середнього віку виникнення згідно з критеріями імовірності цієї хвороби, розробленими Асоціацією хвороби Альцгеймера і споріднених з нею/ розладів (ADDA: Alzheimer's disease and Related Disorders Association). Підходящими для цього були пацієнти, які на Державному освідченні мінімальної розумової здатності (MMSE: Mini-Mental State Exam) одержали тест-оцінки в межах від 12 до 26. Окрім цього, пацієнти-кандидати для цього експерименту повинні були мати всі ознаки здатності виживання під час його проведення і не мати симптомів щодо можливості виникнення ускладнень на зразок, що виникають, наприклад, від споживання супутніх медикаментів. Базовий рівень функції пацієнта оцінюють шляхом класичних психометричних досліджень на зразок MMSE і ADAS, які представляють всебічну шкалу для оцінки пацієнтів зі станом і функцією хвороби Альцгеймера. Ці психометричні шкали дають міру прогресування стану Альцгеймера. Для моніторингу лікування можуть використовуватися також підходящі шкали інтелекту. Прогресування хвороби може відслідковуватися також за допомогою MRI. Може проводитися також моніторинг профілів крові пацієнтів, включаючи аналіз імуногенно-специфічних антитіл і відповіді Т-клітин.

Після вимірювання базового рівня пацієнти починають отримувати лікування. При цілком випадковому доборі пацієнтів їм вводять терапевтичний агент або плацебо, дотримуючись принципу "сліпого експерименту". Обстеження пацієнтів проводять, принаймні, кожні 6 місяців. Ефективність лікування визначають за значним зниженням у прогресуванні хвороби в групі, що отримувала лікування, порівняно з групою плацебо.

На другій фазі досліджень (Фазі II) оцінюють ступінь перетворення пацієнтів із таких, що страждають на ранню втрату пам'яті, не зумовлену хворобою Альцгеймера, що іноді зветься "віковим погіршенням пам'яті" (AAMI: age-associated memory impairment) або "помірним погіршенням когнітивної функції" (MCI: mild cognitive impairment), на пацієнтів, які імовірно страждають на хворобу Альцгеймера згідно з визначенням за критеріями ADDA. Пацієнтів з високим ризиком перетворення їхнього стану на хворобу Альцгеймера залучають до досліджень із неклінічної популяції шляхом добору еталонних популяцій за ранніми ознаками втрати пам'яті або іншими утрудненнями, пов'язаними із доальцгеймеровською симптоматологією, а також за родинною історією хвороби Альцгеймера, генетичними факторами ризику, віком, статтю та іншими ознаками, визнаними за такі, що свідчать про високий ризик виникнення цієї хвороби. Збирають оцінки базового рівня по відповідних оглядах, включаючи MMSE і ADAS, а також інші записи, що є оцінками більш нормальної популяції. Ці популяції пацієнтів поділяють на відповідні групи, порівнюючи з плацебо альтернативні дозування активного агента, і відслідковують приблизно за 6-місячним інтервалом. Кінцевим етапом для кожного з пацієнтів при цьому є визначення того, чи став він об'єктом перетворення на хворобу Альцгеймера, імовірно для нього, згідно з критеріями ADDA наприкінці спостережень.

Загальні матеріали і методи

А. Готування поліклональних і моноклональних антитіл проти А β

Поліклональне антитіло проти А β готували із крові, зібраної у двох груп тварин. Перша група складалася зі 100 самок мишей породи швейцарського вебстера віком від 6 до 8 тижнів. Тварин імунізували на початку експерименту (день 0), на 15-й день і 29-й день 100мкг AN1792 у комбінації з CFA/IFA. На 36-й день тваринам робили четверту ін'єкцію, що складала половину дози AN1792. На 42-й день тварин, після умертвіння, знекровлювали, і готували сироватку, яку об'єднували, отримувавши її у загальній кількості 64мл. Друга група тварин складалася із 24 самок мишей віком від 6 до 9 тижнів, ізогенних із мишами PDAPP, але нетрансгенних для APP-гена людини. Тварин імунізували на початку експерименту (день 0), на 14-й, 25-й і 56-й дні 100мкг AN1792, сполученого з CFA/IFA. Тварин цієї групи також знекровлювали після умертвіння на 63-й день. Із крові готували сироватку, загальна кількість якої складала об'єм 14мл. Отримані таким чином дві партії сироватки об'єднували. Фракцію антитіл очищали у два послідовні етапи преципітації 50% насиченим сульфатом амонію. Остаточний преципітат піддавали діалізу проти PBS і тесту на ендотоксин. Рівень ендотоксину складав менше 1 ендотоксичної одиниці на мг.

Моноклональні антитіла проти А β готували із асцитичної рідини. Цю рідину спочатку піддавали деліпидуванню додаванням концентрованого декстран-сульфату натрію до охолодженої на льоду асцитичної рідини при помішуванні на льоду до досягнення остаточної концентрації 0,238%. Після цього, помішуючи, додавали концентрований CaCl₂ до кінцевої концентрації 64ммоль. Цей розчин піддавали центрифугуванню при 10000×г, і осад, що утворився, видалили. Супернатант перемішували на льоду з однаковим з ним об'ємом насиченого сульфату амонію, що додавався по краплях. Розчин піддавали центрифугуванню знову при 10000×г, і супернатант видаляли. Осад ресуспендували і піддавали діалізу проти 20ммоль тріс-HCl, 0,4моль NaCl, pH 7,5. Цю фракцію поміщали до FPLC сефарозної Q-колонки фірми Pharmacia і елюювали зі зворотним градієнтом від 0,4моль до 0,275моль NaCl у 20ммоль тріс-HCl, pH 7,5.

Пік антитіл ідентифікували поглинанням на хвилі 280нм, і відповідні фракції об'єднували. Очищений препарат антитіла характеризували вимірюванням концентрації білка за методом BCA і чистоти за методом SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію). Утворений пул також перевіряли на ендотоксин. Рівень ендотоксину складав менше, ніж 1 ендотоксична одиниця на мг. Титрам менше 100 довільно приписували величину 25.

В. Вимірювання титрів антитіл

Піддослідних мишей знекровлювали через маленький надріз на хвостовій вені, збираючи приблизно 200мкл крові у мікроцентрифужній пробірці. Морським свинкам перед знекровлюванням спочатку голили задній скакальний суглоб, а потім голкою 18 калібру підрізали метатарсальну вену і збирали кров у мікроцентрифужну пробірку. Крові давали можливість згорнутися протягом 1 години при кімнатній температурі, інтенсивно перемішували і піддавали центрифугуванню при 14000×г протягом 10 хвилин для відділення зсідка крові від сироватки. Після цього сироватку переносили до очищувальної мікроцентрифужної пробірки і зберігали при 4°C аж поки вона не титрувалася.

Титри антитіл виміряли за допомогою ELISA-аналізу. Для цього 96-лункові мікротитрувальні планшети (планшети Costar EIA) покривали 10мкл розчину, що містив або 10мкг/мл А β 42 чи SAPP або інші антигени,

як зазначено у приватних повідомленнях, у буфері покриття лунок (0,1моль фосфату натрію, pH 8,5, 0,1% азиду натрію) і витримували протягом ночі при кімнатній температурі. Потім уміст лунок відсмоктували, і в них додавали сироватку, починаючи від розрідження 1/100 у розріджувачі для зразків (0,014моль фосфату натрію, pH 7,4, 0,15моль NaCl, 0,6% альбуміну бичачої сироватки, 0,05% тимерозалу). Здійснювалося сім послідовних розріджень зразків безпосередньо на планшетах трикратними стадіями до досягнення кінцевого розрідження 1/218700. Розчини інкубували в лунках покритих планшетів протягом 1 години при кімнатній температурі. Після цього планшети чотири рази промивали фізіологічним розчином PBS, що містив 0,05% Tween 20. Друге антитіло, Ід "коза проти миші", кон'юговане з пероксидазою хрину (постачальник фірма Boehringer Mannheim) додавали в лунки в кількості 100мкл титру 1/3000 у розріджувачу для зразків і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Далі планшети знову промивали 4 рази фізіологічним розчином PBS, Tween 20. Для розвинення хромогенів у кожному лунку добавляли 100мкл повільного TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, постачальник фірма Pierce Chemicals) і інкубували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли додаванням 25мкл 2моль H_2SO_4 . Після цього на приладі Vmax фірми Molecular Devices (450nm-650nm) зчитували колірну інтенсивність.

Титри визначали як величини, обернені розрідженню сироватки, що дають половину максимальної оптичної густини. Максимальну оптичну густину в загальному випадку визначали при початковому розрідженні 1/100, за винятком випадків дуже високих титрів, коли для досягнення максимальної оптичної густини потребувалося більш високе початкове розрідження. Якщо 50% рівень потрапляв на проміжок між двома розрідженнями, то остаточний титр обчислювали шляхом лінійної екстраполяції. Для обчислювання середньо-геометричних титрів антитіл титрам менше 100 довільно приписували величину 25.

С. Препарування тканин мозку

Після еутаназії мозок кожної з піддослідних тварин видаляли, одну півкулю мозку препарували для імуногістохімічного аналізу, а три ділянки його (гіпокамп, кору і мозочок) препарували на зрізи із іншої півкулі і використовували для вимірювання концентрації різноманітних білків А β і форм APP за допомогою специфічного ELISA-аналізу [Johnson-Wood et al., див. вище].

Тканини, призначені для аналізу за методом ELISA, гомогенізували в 10 об'ємах охолодженого на льоду гуанідинового буферу (5,0моль гуанідин-HCl, 50ммоль тріс-HCl, pH 8,0). Одержані гомогенати обережно перемішували на нутаторі Адамса (фірми Fisher) протягом 3-4 годин при кімнатній температурі, а потім зберігали при -20°C до кількісної оцінки А β і APP. Попередні дослідження показали, що аналітичні зразки в цих умовах зберігання залишалися стабільними і що кількість синтетичного білка А β (фірма Bachem) можна було відновлювати прищипленням в гомогенати контрольної тканини мозку від мишачого приплуду [Johnson-Wood et al., див. вище].

D. Вимірювання рівнів А β

Гомогенати мозку розріджували у ступені 1:10 охолодженням на льоду казеїновим розріджувачем (0,25% казеїну, фізіологічний розчин PBS, 0,05% азиду натрію, 20мкг/мл апротиніну, 5ммоль EDTA pH 8,0, 10мкг/мл лейпептину) і потім піддавали центрифугуванню при 16000xg протягом 20 хвилин при температурі 4°C. Були приготовані синтетичні стандарти білка А β (амінокислоти 1-42) і стандарти APP для включення 0,5моль гуанідину і 0,1% альбуміну бичачої сироватки (BSA) у кінцевій композиції. В "загальному" А β сендвічі ELISA-аналізу використовувалося моноклональне антитіло 266, специфічне до амінокислот 13-28 пептиду А β [Seubert et al., див. вище] як антитіло-захоплювач і біотинільоване моноклональне антитіло 3D6, специфічне до амінокислот 1-5 А β [Johnson-Wood et al., див. вище], як антитіло-репортер. Моноклональне антитіло 3D6 не розпізнає секретований APP або повнодовжинний APP, а детектує лише види А β з амінокінцевою аспартановою кислотою. Цей аналіз має знижену межу чутливості, приблизно 50нг/мл (11нмоль), і не показує перехресної реактивності до ендогенного мишачого білка А β при концентраціях до 1нг/мл [Johnson-Wood et al., див. вище].

В А β 1-42-специфічному сендвічі ELISA-аналізу використовується моноклональне антитіло 21F12, специфічне до амінокислот 33-42 пептиду А β [Johnson-Wood et al., див. вище], як антитіло-захоплювач. Біотинільоване моноклональне 3D6 у цьому аналізі, який має більш низьку межу чутливості, приблизно 125мкг/мл (28мкмоль) [Johnson-Wood et al., див. вище], також є антитілом-репортером. Для ELISA-аналізу А β 100мкл моноклонального 266 (при 10мкг/мл) або моноклонального 21F12 (при 5мкг/мл) поміщали як покриття в лунки 96-лункових планшетів для імуноаналізу (фірма Costar) і інкубували протягом ночі при кімнатній температурі. Розчин видаляли шляхом відсмоктування, і лунки блокували додаванням в них 200мкл 0,25% альбуміну людської сироватки у буфері PBS протягом, принаймні, 1 години при кімнатній температурі. Блокувальний розчин видаляли, і планшети до їх використання зберігали у висушеному стані при 4°C. Далі планшети перед використанням піддавали повторній гідратації промивним буфером [тріс-забуферений сольовий розчин (0,15моль NaCl, 0,01моль тріс-HCl, pH 7,5) плюс 0,05% Tween 20]. Зразки і стандарти поміщали у потрійні аліквоти 100мкл на лунку й інкубували протягом ночі при 4°C. Планшети, принаймні, тричі промивали промивним буфером після кожної стадії аналізу. Після цього додавали біотинільоване моноклональне 3D6, розріджене до 0,5мкг/мл у казеїновому аналітичному буфері (0,25% казеїну, фізіологічний розчин PBS, 0,05% Tween 20, pH 7,4) та інкубували в лунках протягом 1 години при кімнатній температурі. Далі в лунки протягом 1 години при кімнатній температурі додавали кон'югат авідину з пероксидазою хрину (постачальник фірма Vector, Burlingame, CA), розріджений до 1:4000 у казеїновому аналітичному буфері. Після цього в лунки поміщали колориметричний субстрат - повільний TMB-ELISA (фірма Pierce) і залишали для реакції протягом 15 хвилин при кімнатній температурі, після чого ферментативну реакцію зупиняли додаванням 25мкл 2N H_2SO_4 . Кількість продукту реакції оцінювали за допомогою приладу Vmax фірми Molecular Devices, який вимірює різницю у поглинанні на 450nm і 650nm.

E. Вимірювання рівнів APP

Було проведено два різних аналізи APP. У першому з них, що отримав назву APP- α /FL, розпізнавалися як форма APP-альфа (α), так і повнодовжинна форма FL (full-length) APP. Другий аналіз був специфічним до APP- α . В аналізі APP- α /FL розпізнавався секретований APP, включаючи перші 12 амінокислот А β .

Оскільки антитіло-репортер (2H3) не є специфічним до α -кліп-сайта, що виникає між амінокислотами 612-613 APP⁶⁹⁵ [Esch et al., Science 248:1122-1124 (1990)], у цьому аналізі також розпізнається повнодовжинний APP (APP-FL). Попередні експерименти, в яких для збіднення мозкових гомогенатів APP-FL використовувалися імібілізовані антитіла проти APP до цитоплазматичного хвоста APP-FL, показали, що приблизно 30-40% суміші APP- α /FL APP є FL (дані не представлені). Антитілом-захоплювачем як в аналізі APP- α /FL, так і в аналізі APP- α було моноклональне антитіло 8E5, вирощене проти амінокислот 444-592 форми APP⁶⁹⁵ [Games et al., див. вище]. Моноклональним антитілом-репортером для аналізу APP- α /FL було mAb 2H3, специфічне до амінокислот 597-608 APP⁶⁹⁵ [Johnson-Wood et al., див. вище], а антитілом-репортером для аналізу APP- α була біотинільована похідна моноклонального mAb 16H9, вирощеного до амінокислот 605-611 APP. Нижня межа чутливості аналізу APP- α /FL складає приблизно 11нг/мл (150пмоль) [Johnson-Wood et al., див. вище], а нижня межа чутливості APP- α -специфічного аналізу складає 22нг/мл (0,3нмоль). В обох видах аналізу APP лунки 96-лункових EIA-планшетів покривали моноклональним антитілом 8E5, як було описано вище для моноклонального антитіла 266. Як еталон для аналізу APP- α й аналізу APP- α /FL використовувався очищений рекомбінантний секретований APP- α [Esch et al., див. вище]. Зразки гомогенатів мозку у 5моль гуанідину розріджували у співвідношенні 1:10 у розріджувачі для зразків для аналізу ELISA (0,014моль фосфатний буфер, pH 7,4, 0,6% альбуміну бичачої сироватки, 0,05% тимерозалу, 0,5моль NaCl, 0,1% NP40). Далі зразки розріджували у співвідношенні 1:4 у розріджувачі для зразків, що містив 0,5моль гуанідину. Розріджені гомогенати після цього піддавали центрифугуванню при 16000xg протягом 15 секунд при кімнатній температурі. У планшети у подвійних аліквотах додавали стандарти APP і зразки, які піддавали інкубуванню протягом 1,5 години при кімнатній температурі. Зі зразками протягом 1 години при кімнатній температурі інкубували біотинільоване антитіло-репортер 2H3 або 16H9. В лунках протягом 1 години при кімнатній температурі інкубували стрептавідин-лужну фосфатазу (фірма Boehringer Mannheim), розріджену до 1:1000 розріджувачем для зразків. Протягом 30 хвилин інкубування при кімнатній температурі додавали флуоресцентний субстрат - 4-метилгідроксикумаринфосфат, і планшети зчитували на флуориметрі Cytofluor™ 2350 (фірма Millipore) при збудженні на 365нм і випромінюванні на 450нм.

F. Імуногістохімічні дослідження

Узятий у тварин мозок фіксували протягом 3 днів при 40°C у 4% параформальдегіді в PBS і зберігали протягом 1-7 днів при 4°C в 1% параформальдегіді, PBS до готування зрізів. На вібротомі перед імуногістохімічним процесінгом готували вінцеподібні зрізи завтовшки 40мкм, які зберігали у кріопротекторі (30% гліцерол, 30% етиленгліколю у фосфатному буфері) при температурі 20°C. Від кожного мозку б зрізів на рівні дорсального гіпокампу, що відстояли один від одного на відстані 240мкм, інкубували протягом ночі з одним із таких антитіл: (1) біотинільованим антитілом проти A β (моноклональним 3D6, специфічним до людського A β), розрідженим у концентрації 2мкг/мл у PBS і 1% конячої сироватки; (2) біотинільованим моноклональним антитілом 8E5, специфічним до людського APP, розрідженим у концентрації 3мкг/мл у PBS і 1,0% конячої сироватки; (3) моноклональним антитілом, специфічним до гліального фібрилярного кислотного білка (GFAP; Sigma Chemical Co.), розрідженим у співвідношенні 1:500 0,25% Тритону X-100 і 1% конячої сироватки у тріс-забуференому соляному розчині, pH 7,4 (TBS); (4) моноклональним антитілом, специфічним до CD11b, антигена MAC-1, (фірма Chemicon International), розрідженим до 1:100 0,25% Тритону X-100 і 1% кролячої сироватки в TBS; (5) моноклональним антитілом (фірма Pharmingen), специфічним до антигена MHC II, розрідженим у співвідношенні 1:100 0,25% Тритону X-100 і 1% кролячої сироватки в TBS; (6) моноклональним антитілом щура (фірма Pharmingen), специфічним до CD 43, розрідженим у співвідношенні 1:100 1% кролячої сироватки в PBS; (7) моноклональним антитілом щура (фірма Pharmingen), специфічним до CD 45RA, розрідженим у співвідношенні 1:100 1% кролячої сироватки в PBS; (8) моноклональним антитілом щура (фірма Pharmingen), специфічним до CD 45RB, розрідженим у співвідношенні 1:100 1% кролячої сироватки в PBS; (9) моноклональним антитілом щура (фірма Pharmingen), специфічним до CD 45, розрідженим у співвідношенні 1:100 1% кролячої сироватки в PBS; (10) біотинільованим поліклональним антитілом хом'яка (фірма Pharmingen), специфічним до CD3e, розрідженим у співвідношенні 1:100 1% кролячої сироватки в PBS; (11) моноклональним антитілом щура (фірма Serotec), специфічним до CD3, розрідженим у співвідношенні 1:100 1% кролячої сироватки в PBS; (12) розчином PBS без первинного антитіла, що містив 1% звичайної конячої сироватки.

Зрізи, що реагували з розчинами антитіл, перелічені в пп. 1, 2 і 6-12 вище, були попередньо піддані обробці 1,0% Тритону X-100, 0,4% перекису водню в PBS протягом 20 хвилин при кімнатній температурі для блокування ендогенної пероксидази. Після цього їх інкубували протягом ночі при 4°C з первинним антитілом. Зрізи, що прореагували з моноклональними антитілами 3D6, 8E5, CD3E, були піддані реакції протягом 1 години при кімнатній температурі з комплексом "пероксидаза хрину-авідин-біотин" з компонентами набору "A" і "B", розрідженими у співвідношенні 1:75 у PBS (стандартний набір Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA). Зрізи, що піддавалися обробці антитілами, специфічними до CD 45RA, CD 45RB, CD 45, CD3, і розчином PBS без первинного антитіла, були інкубовані протягом 1 години при кімнатній температурі біотинільованим IgG проти щура (фірма Vector), розрідженим 1:75 у PBS, або біотинільованим IgG проти миші (фірма Vector), розрідженим 1:75 у PBS, відповідно. Далі зрізи піддавалися обробці протягом 1 години при кімнатній температурі комплексом "пероксидаза хрину-авідин-біотин" з компонентами набору "A" і "B", розрідженим у співвідношенні 1:75 у PBS (стандартний набір Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA).

Зрізи були розвинені в 0,01% перекису водню, 0,05% 3,3'-діамінбензидині (DAB) при кімнатній температурі. Зрізи, призначені для інкубування з GFAP-, MAC-1- і MHC-II специфічними антитілами, були піддані попередній обробці 0,6% перекису водню при кімнатній температурі для блокування ендогенної пероксидази, після чого вони інкубувалися протягом ночі з первинним антитілом при 4°C. Зрізи, що піддавалися обробці GFAP-антитілом, інкубувалися протягом 1 години при кімнатній температурі з біотинільованим IgG проти миші, виробленим у коні (Vector Laboratories; набір Vectastain Elite ABC Kit), розрідженим у співвідношенні 1:200 сольовим розчином TBS. Після цього зрізи піддавали реакції протягом 1 години з комплексом "авідин - біотин - пероксидаза" (Vector Laboratories; набір Vectastain Elite ABC Kit),

розрідженим 1:1000 розчином TBS. Зрізи, інкубовані з MAC4- або MHC II-специфічними моноклональними антитілами, що виконували роль первинного антитіла, після цього піддавалися реакції протягом 1 години при кімнатній температурі з біотинільованим IgG проти щура, виробленим у кролику, розрідженому зі співвідношенням 1:200 розчином TBS, з наступним інкубуванням протягом 1 години з авідин-біотин-пероксидазним комплексом, розрідженим 1:1000 розчином TBS. Зрізи, інкубовані з GFAP-, MAC-1- і MHC II-специфічними антитілами, були візуалізовані обробкою 0,05% діамінбензидину, 0,01% перекису водню, 0,04% хлориду нікелю, розчином TBS протягом 4 і 11 хвилин, відповідно, при кімнатній температурі.

Імуномічені зрізи поміщали на предметні стекла мікроскопу (VWR, стекла Superfrost), піддавали природній сушці протягом ночі, занурювали у пропар (Propar, фірма Anatech) і накривали накривними стеклами, використовуючи як заливне середовище пермаунт (Permount, фірма Fisher).

Для контрастного забарвлення Аβ-бляшок підгрупу GFAP-позитивних зрізів поміщали на стекла Superfrost і інкубували у водному розчині 1% тіофлавіну (Thioflavin S, фірма Sigma) протягом 7 хвилин, після чого була проведена імуногістохімічна обробка. Далі зрізи були дегідратовані і очищені в пропарі, а потім накріті накривними стеклами із заливним середовищем пермаунт.

G. Аналіз зображень

Для кількісної оцінки імунореактивних слайдів використовувався аналізатор зображень Videometric 150 Image Analysis System (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD), підключений до мікроскопу Nikon Microphot-FX через ПЗС-відеокамеру (ПЗС: прилади із зарядовим зв'язком) і монітор Trinitron фірми Sony. Зображення зрізу зберігалося у відеобуфері, а для обчислення загальної площі елементів зображення (пікселів), зайнятої імуноміченими структурами, був визначений поріг кольоровості і насиченості. Для кожного зрізу вручну окреслювали гіпокамп і обчислювали загальну площу пікселів, зайняту цим гіпокампом. Відсоткове амілоїдне навантаження вимірювали за формулою: (частина площі гіпокампу, що містить Аβ-відкладення, імунореактивні по відношенню до моноклонального 3D6)×100. Подібним чином відсоткове неврितне навантаження обчислювали за формулою: частина площі гіпокампу, що містить дистрофічні неврити, котрі реагують з моноклональним антитілом 8E5)×100. До мікроскопу Nikon Microphot-FX, через камеру Optonics був підключений С-зображувальна система (фірма Compix, Inc., Cranberry Township, PA), що приводив у дію прикладну програму Simple 32 Software, і використовувався для кількісної оцінки відсотка ретроспленіальної кори головного мозку, зайнятої GFAP-позитивними астроцитами і MAC-1- та MHC II-позитивними мікрогліями. Зображення імунопрореагованого зрізу зберігалося у відеобуфері, а для обчислення загальної площі пікселів, зайнятої імуноміченими клітинами, був визначений поріг монохромності. Для кожного зрізу вручну окреслювали ретроспленіальну кору головного мозку (RSC) і обчислювали повну площу пікселів, зайняту RSC. Відсоток астроцитозу визначали за формулою: (частина RSC, зайнята GFAP-реактивними астроцитами)×100. Подібним чином відсоток мікрогліозу визначали за формулою: (частина RSC, зайнята MAC-1- або MHC II-реактивними мікрогліями)×100. В усіх випадках аналізу зображень для кожної тварини проводили кількісну оцінку шести зрізів на рівні дорсального гіпокампу, розділених між собою інтервалами 240мкм. В усіх випадках оператору-досліднику стан лікування тварин не був відомий.

Поданий тут опис винаходу має своєю ціллю лише роз'яснення суті винаходу і жодною мірою не обмежує можливих його модифікацій у межах його об'єму, визначеного доданою нижче формулою винаходу. Всі зазначені тут публікації і патентні документи, а також текстові частини фігур креслення і перелік послідовностей включені в даний опис шляхом посилання в усій їхній повноті і для всіх цілей як при наявності, так і при відсутності такого визначення індивідуально для кожного з них.

Із вищевикладеного очевидно, що винаходом передбачені численні застосування і серед них, наприклад, застосування будь-яких описаних вище антитіл проти Аβ у лікуванні, профілактиці і діагностиці амілоїдогенних хвороб, а також у виготовленні медикаментів чи діагностичних композицій для таких застосувань.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Ньюерелеб Лімітед

<120> Гуманізовані антитіла, що
розпізнають бета-амілоїдний пептид

<130> ELN-002PC

<150> 60/251,892

<151> 2000-12-06

<160> 63

<170> FastSEQ для Windows версія 4.0

<210> 1

<211> 396

<212> ДНК

<213> Mus м'яз

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(396)

<221> сигн.-пептид

<222> (1)... (60)

<400> 1

atg atg aqt cct gcc caq ttc ctg ttt ctg tta qtq ctc tqg att cgg 48
Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Val Leu Trp Ile Arg
-20 -15 -10 -5

gaa acc aac qgt tat gtt qtq atg acc caq act cca ctc act ttg tcg 96
Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
1 5 10

gtt acc att gga caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc 144
Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
15 20 25

ctc tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg 192
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
30 35 40

cca ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac 240
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
45 50 55 60

tct gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttt 288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

aca ctg aaa atc agc aga ata gag gct gag gat ttg gga ctt tat tat 336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Ile Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr
80 85 90

tgc tgg caa ggt aca cat ttt cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag 384
 Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 95 100 105

ctg gaa atc aaa 396
 Leu Glu Ile Lys
 110

<210> 2
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mus м'яз

<220>
 <221> Сигнал
 <222> (1) . . . (20)

<400> 2
 Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
 -20 -15 -10 -5
 Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
 1 5 10
 Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 15 20 25
 Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
 30 35 40
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 45 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Ile Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr
 80 85 90
 Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 95 100 105
 Leu Glu Ile Lys
 110

<210> 3
 <211> 414
 <212> ДНК
 <213> Mus м'яз

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) . . . (414)

<221> сигн. пептид
 <222> (1) . . . (57)

<400> 3
 atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gtc ctt gtt tta aaa ggt 48
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 -15 -10 -5
 qtc caq tqt qaa qtq aaq ctq qtq qaq tct qqq qqa qqc tta qtq aaq 96
 Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 1 5 10

cct gga gcg tct ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 15 20 25
 agt aac tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag aat tca gac aag agg ctg 192
 Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu
 30 35 40 45
 gag tgg gtt gca tcc att agg agt ggt ggt ggt aga acc tac tat tca 240
 Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
 50 55 60
 gac aat qta aag qgc cga ttc acc atc tcc aqa gac aat qcc aag aac 288
 Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn
 65 70 75
 acc ctg tac ctg caa atg aqt aqt ctg aag tct qag qac acq qcc ttg 336
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu
 80 85 90
 tat tat tgt gtc aga tat gat cac tat agt ggt agc tcc gac tac tgg 384
 Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
 95 100 105
 qgc caq qgc acc act qtc aca qtc tcc tca 414
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 4
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Mus м'яз

<220>
 <221> Сигнал
 <222> (1) . . . (19)

<400> 4
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 -15 -10 -5
 Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 1 5 10
 Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 15 20 25
 Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu
 30 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
 50 55 60
 Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn
 65 70 75
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
 95 100 105
 Gly Gln Gly Thr Thr Ile Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 5
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> СИГНАЛ
 <222> (1). . . (20)

<223> змінна ділянка легкого ланцюга гуманізованого 3D6

<400> 5
 Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
 -20 -15 -10 -5
 Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 1 5 10
 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 15 20 25
 Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys
 30 35 40
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 45 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 80 85 90
 Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 95 100 105
 Val Glu Ile Lys
 110

<210> 6
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Людина

<220>
 <221> Сигнал
 <222> (1). . . (19)

<400> 6
 Met Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val
 -15 -10 -5
 Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala
 1 5 10
 Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr
 15 20 25
 Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu
 30 35 40 45
 Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
 65 70 75
 Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr
 80 85 90
 Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 95 100 105

<210> 7
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Людина

<400> 7
 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 Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Mfet Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro
 100

<210> 8
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Змінна ділянка важкого ланцюга гуманізованого 3D6

<221> Сигнал
 <222> (1). . . (19)

<400> 8
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 -15 -10 -5
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 1 5 10
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 15 20 25
 Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 30 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
 50 55 60
 Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 65 70 75
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
 95 100 105
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 9
<211> 121
<212> PRT
<213> Людина

<400> 9
Glu Val Gln Leu Leu 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
Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala 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 Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Asn Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 98
<212> PRT
<213> Людина

<400> 10
Glu Val Gln Leu Leu 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
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Lys

<210> 11
<211> 132
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> Сигнал
<222> (1) . . . (20)

<223> змінна ділянка легкого ланцюга гуманізованого 3D6

<400> 11

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
-20 -15 -10 -5
Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
1 5 10
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
15 20 25
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys
30 35 40
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
45 50 55 60
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
80 85 90
Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
95 100 105
Val Glu Ile Lys
110

<210> 12

<211> 138

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> змінна ділянка легкого ланцюга гуманізованого 3D6

<221> Сигнал

<222> (1) . . . (19)

<400> 12

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
-15 -10 -5
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
1 5 10
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
15 20 25
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
30 35 40 45
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
50 55 60
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
65 70 75
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
80 85 90
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
95 100 105
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 13

<211> 393

<212> ДНК

<213> Mus м'яз

<220>

<221> CDS

<222> (1) - . . (393)

<221> сигн. пептид

<222> (1) . .

<400> 13

atq aag ttg cct gtt aag ctg ttg gta ctg atg ttc tgg att cct gct 48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
-15 -10 -5

tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
1 5 10

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag aac att 144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile
15 20 25

ata cat agt aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca 192
Ile His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
30 35 40 45

ggc cag tct cca aag ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
50 55 60

ggg gtc cca gac aag ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75

ctc aag atc aag aaa gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc 336
Leu Lys Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
80 85 90

ttt caa ggt tca cat gtt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg 384
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
95 100 105

gag ctg gaa 393
Glu Leu Glu
110

<210> 14

<211> 131

<212> PRT

<213> Mus м'яз

<220>

<221> Сигнал

<222> (1) . . . (19)

<400> 14

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
-15 -10 -5
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
1 5 10

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile
 15 20 25
 He His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 30 35 40 45
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 65 70 75
 Leu Lys Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
 80 85 90
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 95 100 105
 Glu Leu Glu
 110

<210> 15
 <211> 426
 <212> ДНК
 <213> Mus m'яз

<220>
 <221> CDS
 <222> (1). . . (426)

<221> сигн. пептид
 <222> (1). . . (57)

<400> 15
 atg gac agg ctt act tcc tca ttc ctg ctg ctg att gtc cct gca tat 48
 Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 -15 -10 -5
 gtc ctg tcc cag gct act ctg aaa gag tct ggc cct gga ata ttg cag 96
 Val Leu Ser Gln Ala Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
 1 5 10
 tcc tcc cag acc ctc agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tca ctg 144
 Ser Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 15 20 25
 agc act tct ggt atg gga gtg agc tgg att cgt cag cct tca gga aag 192
 Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 30 35 40 45
 qgt ctg gag tgg ctg gca cac att tac tgg gat gat gac aag cgc tat 240
 Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
 50 55 60
 aac cca tcc ctg aag agc cgg ctc aca atc tcc aag gat acc tcc aga 288
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg
 65 70 75
 aag cag gta ttc ctc aag atc acc agt gtg gac cct gca gat act gcc 336
 Lys Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala
 80 85 90

aca tac tac tgt qtt cqa aqg ccc att act ccg qta cta gtc gat gct 384
 Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala
 95 100 105

atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 426
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

<210> 16
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Mus м'яз

<220>
 <221> СИГНАЛ
 <222> (1). . . (19)

<400> 16
 Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 -15 -10 -5
 Val Leu Ser Gln Ala Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
 1 5 10
 Ser Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 15 20 25
 Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 30 35 40 45
 Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Lys Arg Tyr
 50 55 60
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg
 65 70 75
 Lys Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala
 80 85 90
 Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala
 95 100 105
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

<210> 17
 <211> 136
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер

<400> 17
 tccgcaagct tgccgccacc atggacatgc gcgtgcccgcc ccagctgctg ggctgctga 60
 tgctgtgggt gtccggctcc tccggctacg tggatgatgac ccagtcctcc ctgtccctgc 120
 ccgtgacccc cggcga 136

<210> 18
 <211> 131
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер

<400> 18
 ctgggggggac tggccgggct tctgcagcag ccagttcagg taggtcttgc cgtcggagtc 60
 cagcaggggac tgggaggact tgcaggagat ggaggcgggc tcgccggggg tcacgggcag 120
 ggacaggggg g 131

<210> 19
 <211> 146
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер

<400> 19
 acctgaactg gctgctgcag aagcccggcc agtccccca gcgcctgac tacctggtgt 60
 ccaagctgga ctccggcgtg cccgaccgct tctccggctc cggctccggc accgacttca 120
 ccctgaagat ctcccgcgtg gaggcc 146

<210> 20
 <211> 142
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер

<400> 20
 aattctagga tccactcacg ctgatctcc accttggtgc cctggccgaa ggtgcggggg 60
 aagtgggtgc cctgccagca gtagtacag cccacgtcct cggcctccao gcgggagatc 120
 ttcagggtga agtcggtgcc gg 142

<210> 21
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер

<400> 21
 ctgggggggac tggccg 16

<210> 22
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер

<400> 22
 acctgaactg gctgctgcag aa 22

<210> 23
 <211> 138
 <212> ДНК

<210> 28	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 28	
ctggagtggg tggcctccat	20
<210> 29	
<211> 19	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 29	
tccgcaagct tgccgssac	19
<210> 30	
<211> 29	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 30	
aattctagga tccactcacg ctgatctc	29
<210> 31	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 31	
acagaaaagct tgccgssacc atg	23
<210> 32	
<211> 22	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 32	
ctgcaaggat ccactcaccg ga	22
<210> 33	
<211> 10	
<212> PRT	

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> внутрішній пептид

<400> 33

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
1 5 10

<210> 34

<211> 402

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VL гуманізованого h3D6 версії 1

<400> 34

```
atqgacatgc qcgtqccccq ccaqctqctg qgcctqctga tqctgtqggt qtccqgctcc 60
tccqgctacg tqgtgatgac ccaqtcccc ctgtccctgc ccgtgacccc cggcgaqccc 120
qcctccatct cctgcaagtc ctccaagtcc ctgctggact ccgacgqcaa qacctacctg 180
aactggctgc tgcagaagcc cggccagtcc cccagcgcc tgatctacct ggtgtccaag 240
ctggaactcc qcgtqccccq ccgtttctcc qgctccgqct ccgqcaccga cttcaccctg 300
aaqatctccc qcgtggaagg cgaqgacgtg qgcgtgtact actgctgqca qggcaccac 360
ttcccccgca ccttcggcca gggcaccagg gtggagatca ag 402
```

<210> 35

<211> 402

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VL гуманізованого h3D6 версії 2

<400> 35

```
atqgacatgc qcgtqccccq ccaqctqctg qgcctqctga tqctgtqggt qtccqgctcc 60
tccqgctacg tqgtgatgac ccaqtcccc ctgtccctgc ccgtgacccc cggcgaqccc 120
qcctccatct cctgcaagtc ctccaagtcc ctgctggact ccgacgqcaa qacctacctg 180
aactggctgc tgcagaagcc cggccagtcc cccagcgcc tgatctacct ggtgtccaag 240
ctggaactcc qcgtqccccq ccgtttctcc qgctccgqct ccgqcaccga cttcaccctg 300
aaqatctccc qcgtggaagg cgaqgacgtg qgcgtgtact actgctgqca qggcaccac 360
ttcccccgca ccttcggcca gggcaccagg gtggagatca ag 402
```

<210> 36

<211> 414

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VH гуманізованого h3D6 версії 1

<400> 36

```
atqgaatttg qgctgaqctg qctttttctt gtgctatatt taaaaggtgt ccaqtgtgaq 60
gtgcagctgc tggagtcggg cggcgccctg gtgcagcccg gcggctccct gcgcctgtcc 120
tgcqccqctt ccgqcttcac cttctccaac tacggcatgt cctggtgtcg ccaqgcccc 180
qgcaagqgqc tqgaqtgqgt qgcctccatc cgtccgqcg qcqgcccac ctactactcc 240
qacaacgtga aqgqccgctt caccatctcc cgcgacaacg ccaagaactc cctgtacctg 300
cagatgaact ccctgcgcgc cgaggacacc gccctgtact actgctgtcg ctacgaccac 360
```

<210> 37

<211> 414

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VH гуманізованого h3D6 версії 2

<400> 37

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaagggtgt ccaagtgtgag 60
 gtgcagctgc tggagtccgg cgccggcctg gtgcagcccg gcggctccct gcgcctgtcc 120
 tgccgcgcct ccggcttcac cttctccaac tacggcatgt cctgggtgcg ccaggccccc 180
 ggcaagggcc tggagtgggt ggcctccatc cgctccggcg gcggccgcac ctactactcc 240
 gacaacgtga agggccgctt caccatctcc cgcgacaact ccaagaacac cctgtacctg 300
 sagatgaact ccctgcgcgc cgaggacacc gccgtgtact actgcgtgcg ctacgaccac 360
 tactccggct cctccgacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgtc

<210> 38

<211> 770

<212> PRT

<213> Людина

<400> 38

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
 1 5 10 15
 Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
 20 25 30
 Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
 35 40 45
 Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
 50 55 60
 Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65 70 75 80
 Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 85 90 95
 Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 100 105 110
 Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
 115 120 125
 Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140
 Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160
 Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175
 Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190
 Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195 200 205
 Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210 215 220
 Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255
 Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285
 Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
 290 295 300
 Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
 305 310 315 320
 Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
 325 330 335
 Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
 340 345 350
 Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
 355 360 365
 Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp
 370 375 380
 Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
 385 390 395 400
 Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
 405 410 415
 Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
 420 425 430
 Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
 435 440 445
 Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
 450 455 460
 Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
 465 470 475 480
 Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
 485 490 495
 Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
 500 505 510
 Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
 515 520 525
 Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser
 530 535 540
 Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
 545 550 555 560
 Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
 565 570 575
 Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
 580 585 590
 Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
 595 600 605
 Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
 610 615 620
 Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
 625 630 635 640
 Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
 645 650 655
 Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
 660 665 670
 Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
 675 680 685
 Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
 690 695 700
 Leu Met Val Gly Gly Val Val He Ala Thr Val He Val He Thr Leu
 705 710 715 720
 Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser He His His Gly Val Val
 725 730 735

Glu	Val	Asp	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Glu	Glu	Arg	His	Leu	Ser	Lys	Met
			740					745					750		
Gln	Gln	Asn	Gly	Tyr	Glu	Asn	Pro	Thr	Tyr	Lys	Phe	Phe	Glu	Gln	Met
		755					760					765			
Gln	Asn														
	770														

<210> 39
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймери

<400> 39
 acttatatct gtttt 15

<210> 40
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймери

<400> 40
 acttatacac tttgt 15

<210> 41
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймери

<400> 41
 acttatgttc attst 15

<210> 42
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймери

<400> 42
 acttatgccc attggt 16

<210> 43
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймери

<400> 43 acttatatat attgt		15
<210> 44 <211> 14 <212> ДНК <213> <213> Штучна послідовність		
<220> <223> Праймери		
<400> 44 acttatgkyy attg		14
<210> 45 <211> 15 <212> ДНК <213> <213> Штучна послідовність	• "	
<220> <223> Праймери		
<400> 45 acttatgtat acauw		15
<210> 46 <211> 15 <212> ДНК <213> <213> Штучна послідовність		
<220> <223> Праймери		
<400> 46 acttatggct ymtct		15
<210> 47 <211> 13 <212> ДНК <213> <213> Штучна послідовність	"	
<220> <223> Праймери		
<400> 47 acttatcccc att	'	13
<210> 48 <211> 14 <212> ДНК <213> <213> Штучна послідовність		
<220> <223> Праймери		
<400> 48 acttatatgt tctc		14

<210> 49		
<211> 14		
<212> ДНК		
<213> <213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймери		
<400> 49		
acttatacccc attt		14
<210> 50		
<211> 11		
<212> ДНК		
<213> <213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймери		
<400> 50		
ggacsggttgg g		11
<210> 51		
<211> 14		
<212> ДНК		
<213> <213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймери		
<400> 51		
acttataggg tttt	-	14
<210> 52		
<211> 14		
<212> ДНК		
<213> <213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймери		
<400> 52		
acttatgggr tttt		14
<210> 53		
<211> 14		
<212> ДНК		
<213> <213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймери		
<400> 53		
acttatatgt agtt		14
<210> 54		
<211> 13		
<212> ДНК		
<213> <213> Штучна послідовність		

<220>		
<223>	Праймери	
<400>	54	
	acttataatgt gtt	13
<210>	55	
<211>	15	
<212>	ДНК	
<213>	<213> Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймери	
<400>	55	
	acttatacgt atttt	15
<210>	56	
<211>	14	
<212>	ДНК	
<213>	<213> Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймери	
<400>	56	
	acttatctts ttgt	14
<210>	57	
<211>	14	
<212>	ДНК	
<213>	<213> Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймери	
<400>	57	
	acttatrggg tttt	14
<210>	58	
<211>	13	
<212>	ДНК	
<213>	<213> Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймери	
<400>	58	
	acttatgttt ttg	13
<210>	59	
<211>	15	
<212>	ДНК	
<213>	<213> Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймери	

<400> 59
acttatmgtg mtttt

15

<210> 60
<211> 14
<212> ДНК
<213> <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймери

<400> 60
acttatggtc tctt

14

<210> 61
<211> 14
<212> ДНК
<213> <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймери

<400> 61
acttatatgt tttt

14

<210> 62
<211> 14
<212> ДНК
<213> <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймери

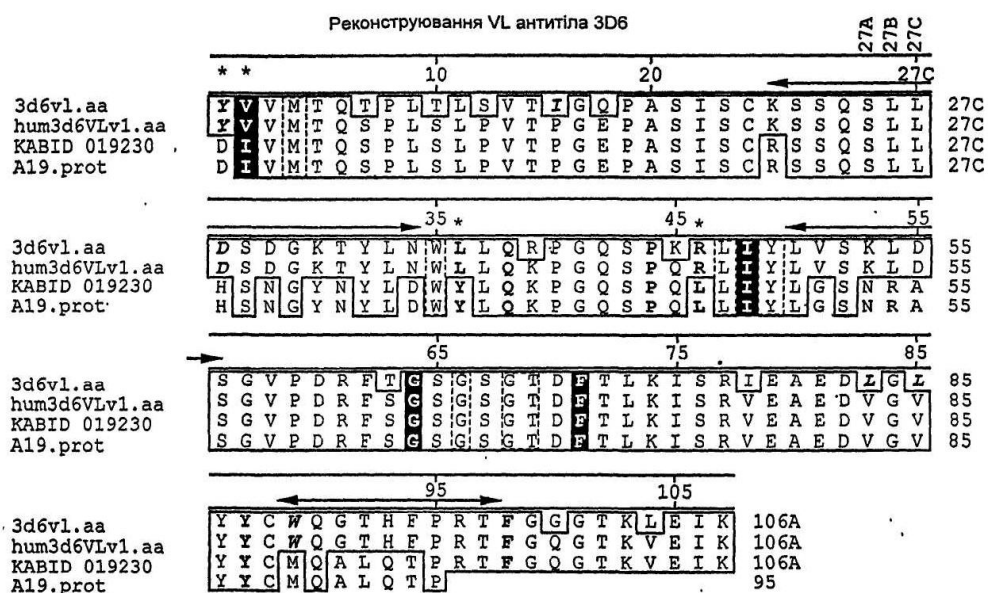
<400> 62
acttattttg ttat

14

<210> 63
<211> 11
<212> ДНК
<213> <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймери

<400> 63
ggacgggaca g



Декорування №1: Залишки в блоці, що точно співпадають з амінокислотною послідовністю гуманізованого hum3D6VLv1. Нумерація залишків за Кабатом

3d6v1.aa – Донорна мишача послідовність
KABID 019230 – Каркас людського акцептора

Hum3d6VLv1 aa – Гуманізоване 3d6
A19.prot – VH людської зародкової лінії

Реконструювання VH антибіла 3D6

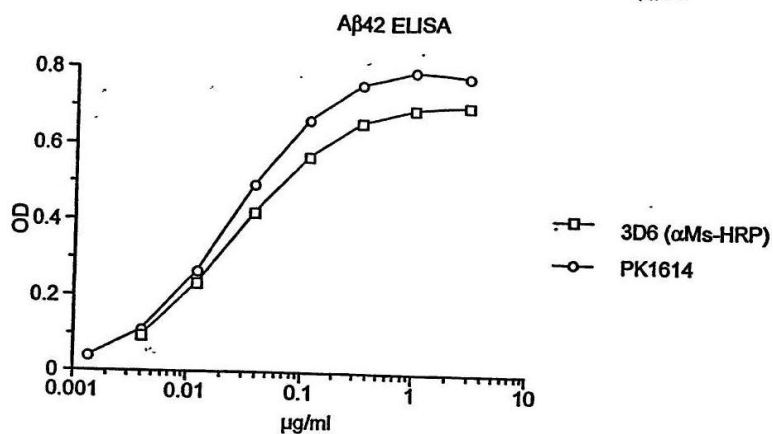
		10	20	30	40	*																																													
3d6vh.aa	E	V	K	L	V	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G	A	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	Y	G	M	S	W	V	R	Q	N	S	D	K	R	L	E	W	V	A	S	50
hum3d6VHv1.aa	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	50
KABID 045919	E	V	Q	L	L	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	S	Y	A	V	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	50
VH3-23.prot	E	V	Q	L	L	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	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	50

	60	70	80	90	**																																													
3d6yh.aa	I	R	S	G	G	R	T	Y	Y	S	D	N	V	K	G	R	F	T	I	S	R	E	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D	T	A	L	Y	Y	C	V	R	Y	D	96
hum3d6VHv1.aa	I	R	S	G	G	R	T	Y	Y	S	D	N	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	S	S	L	R	A	E	D	T	A	L	Y	Y	C	V	R	Y	D	96
KABID 045919	I	S	G	S	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	S	S	L	R	A	E	D	T	A	L	Y	Y	C	A	K	D	N	96
VH3-23.prot	I	S	G	S	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	94		

	100A	100B	100C	100D	110																	
3d6vh.aa	H	Y	S	G	S	S	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	113
hum3d6VHv1.aa	H	Y	S	G	S	S	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	113
KABID 045919	Y	D	F	W	S	G	T	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	113
VH3-23.prot																						

Декорування №1: Залишки в блоці, що точно співпадають з амінокислотною послідовністю гуманізованого hum3D6VHv1. Нумерація залишків за Кабатом.
 3d6vh.aa – Донорна мишача послідовність
 hum3d6VHv1.aa – VH гуманізованого 3d6.
 KABID 019230 – Каркас людського акцептора
 VH3-23.prot – VH людської зародкової лінії

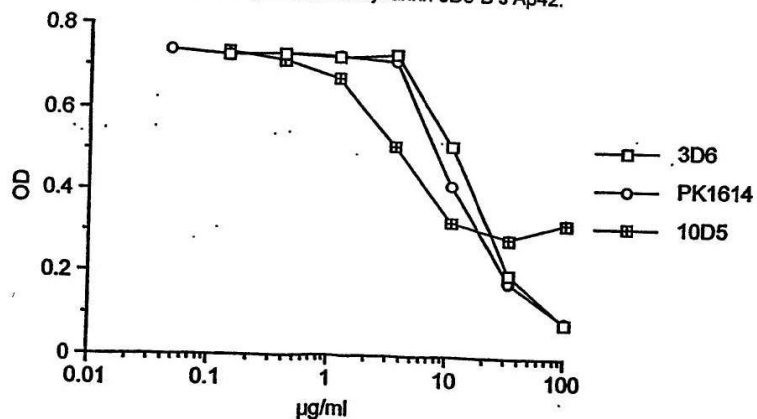
ФІГ. 2



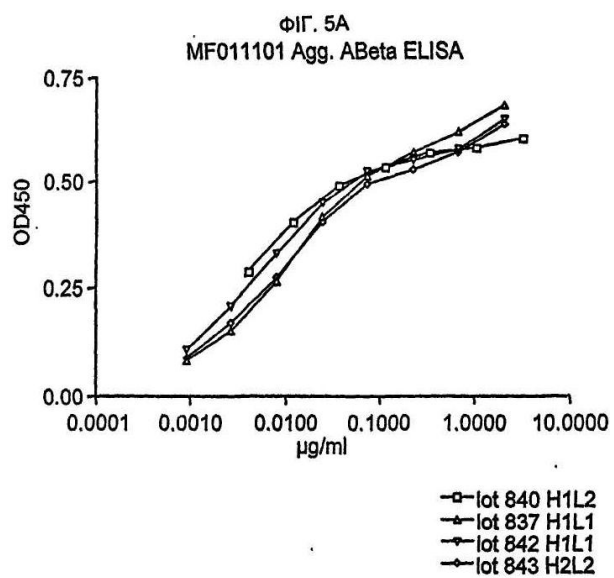
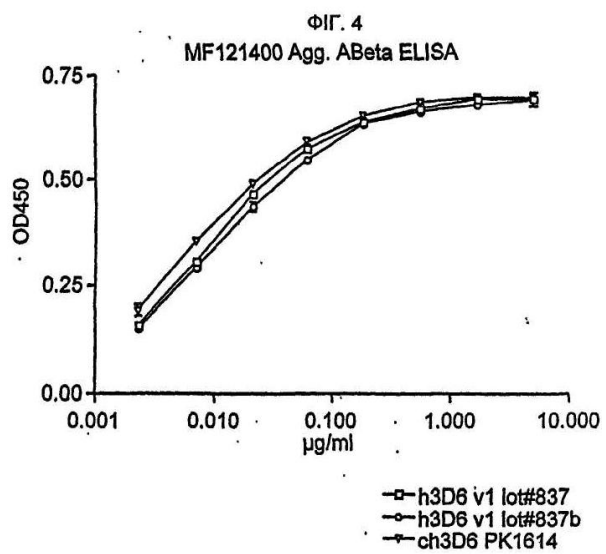
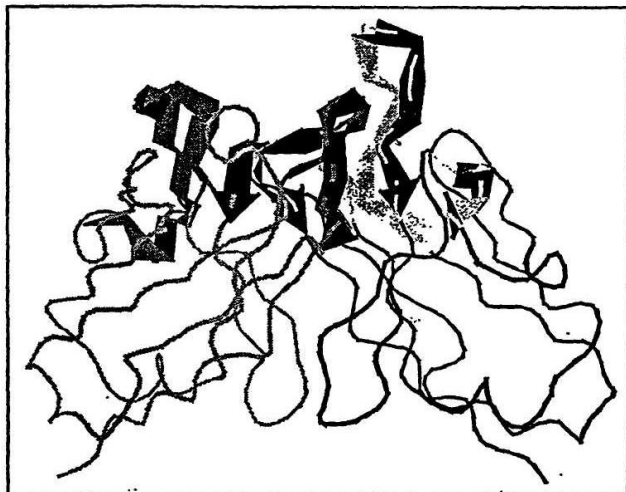
ФІГ. 3А

ELISA-аналіз

на конкурентне зв'язування 3D6-В з Аβ42.



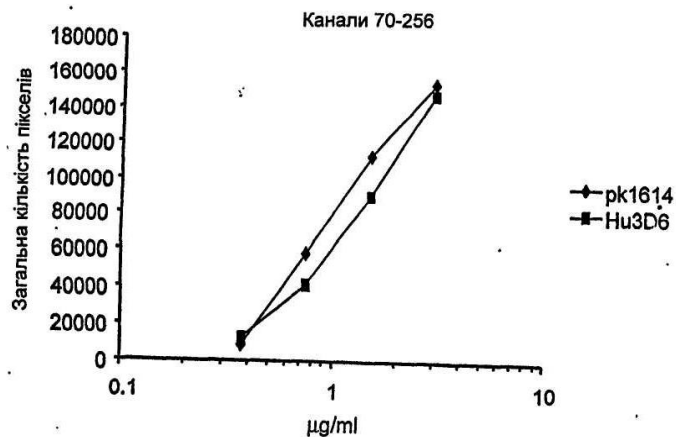
ФІГ. 3В



Фиг. 5B

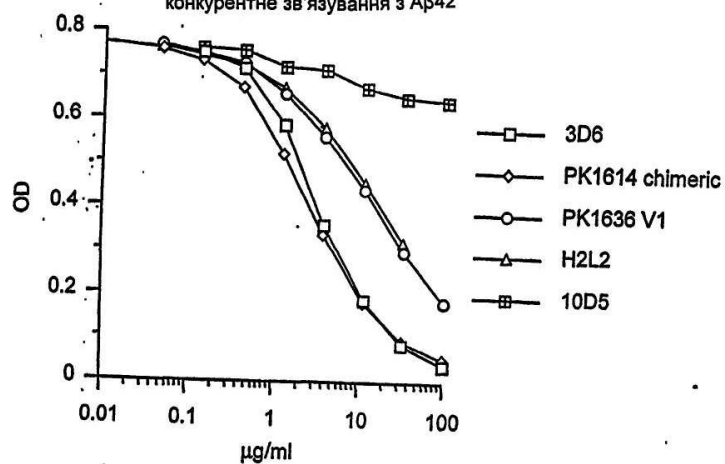
Забарвлення зрізів мозку PDAPP гуманізованим 3D6

Титрування моноклонального антитіла на зрізах мозку мишей PD-APP



ФІГ. 6

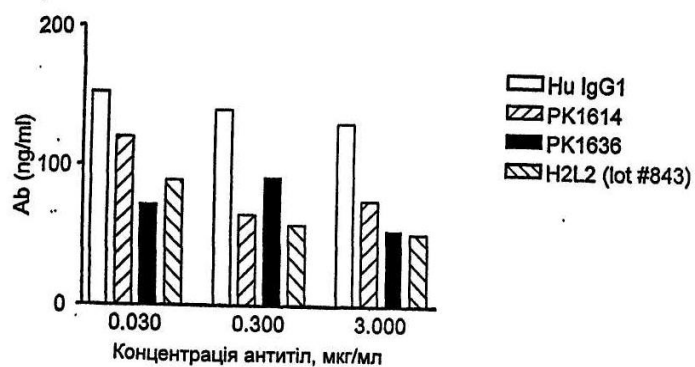
Афінність зв'язування h3D6
конкурентне зв'язування з Aβ42



ФІГ. 7

Аналіз ex-vivo: стимулювання мікрогліального
фагоцитозу гуманізованим 3D6.

266/3D6-B



ФІГ. 8

Фиг. 9

	10	20	
10D5vl.pro	M K L P V R L L - V L M F W I P A S S S D V L M T Q T P L S	29	
3D6vl.pro	M M S P A Q F L F L L V L W I R E T N G Y V V M T Q T P L T	30	
	30	40	50
10D5vl.pro	L P V S L G D Q A S I S C R S S Q N I I H S N G N T Y L E W	59	
3D6vl.pro	L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W	60	
	60	70	80
10D5vl.pro	Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S	89	
3D6vl.pro	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F T G S	90	
	90	100	110
10D5vl.pro	G S G T D F T L K I K K V E A E D L G I Y Y C F Q G S H V P	119	
3D6vl.pro	G S G T D F T L K I S R I E A E D L G L Y Y C W Q G T H F P	120	
	120	130	
10D5vl.pro	L T F G A G T K L E L E	131	
3D6vl.pro	R T F G G G T K L E I K	132	

Фиг. 10

	10	20	30
10D5vh.pro	M D - R L T S S F L L L I V P A Y V L S Q A T L K E S G P G	29	
3D6vh.PRO	M N F G L S L I F L V L V L K G - V Q C E V K L V E S G G G	29	
	40	50	60
10D5vh.pro	I L Q S S Q T L S L T C S F S G F S L S T S G M G V S W I R	59	
3D6vh.PRO	L V K P G A S L K L S C A A S G F T F S N Y G M - - S W V R	57	
	70	80	90
10D5vh.pro	Q P S G K G L E W L A H I Y W D D D K R Y - N P S L K S R L	88	
3D6vh.PRO	Q N S D K R L E W V A S I R S G G G R T Y Y S D N V K G R F	87	
	100	110	120
10D5vh.pro	T I S K D T S R K Q V F L K I T S V D P A D T A T Y Y C V R	118	
3D6vh.PRO	T I S R E N A K N T L Y L Q M S S L K S E D T A L Y Y C V R	117	
	130	140	
10D5vh.pro	R P I T P V L V D A M D Y W G Q G T S V T V S S	142	
3D6vh.PRO	- - - Y D H Y S G S S D Y W G Q G T T V T V S S	138	