

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044647**(13) **B9**

**(12) ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К  
ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(15)** Информация об исправлении  
**Версия исправления: 1 (W1 B1)**  
**исправления в описании**  
**исправления в формуле: п.36**

**(51)** Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)

**(48)** Дата публикации исправления  
**2023.10.24, Бюллетень №10'2023**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.09.20**

**(21)** Номер заявки  
**201691060**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.12.22**

**(54) ТЕРАПИЯ ТРАНСТИРЕТИНОВОГО (ТТР) АМИЛОИДОЗА АНТИТЕЛАМИ, А ТАКЖЕ  
АНТИТЕЛА, ПОЛУЧЕННЫЕ ОТ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ УКАЗАННОЙ ТЕРАПИИ**

**(31)** 13199251.3**(32)** 2013.12.20**(33)** EP**(43)** 2016.12.30**(86)** PCT/EP2014/079094**(87)** WO 2015/092077 2015.06.25

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

**(72)** Изобретатель:  
**Гримм Ян, Мишалон Обен (CH)**

**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

**(56)** WO-A1-2010030203  
WO-A1-2008081008

TERAZAKI HISAYASU ET AL.:  
"Immunization in familial amyloidotic  
polyneuropathy: counteracting deposition by  
immunization with a Y78F TTR mutant",  
LABORATORY INVESTIGATION, NATURE  
PUBLISHING GROUP, THE UNITED STATES

AND CANADIAN ACADEMY OF PALHOLOGY,  
INC, vol. 86, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01),  
pages 23-31, XP002531715, ISSN: 0023-6837,  
DOI: 10.1038/LABINVEST.3700365 [retrieved on  
2005-11-07], page 27, right-hand column, line 22 –  
page 30, left-hand column, last paragraph

GOLDSTEINS G. ET AL.: "Exposure of  
cryptic epitopes on transthyretin only in amyloid  
and in amyloidogenic mutants", PROCEEDINGS  
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES,  
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol.  
96, no. 6, 16 March 1999 (1999-03-16), pages  
3108-3113, XP002987251, ISSN: 0027-8424, DOI:  
10.1073/PNAS.96.6.3108, page 3108, right-hand  
column, paragraph 4 - page 3111, right-hand column,  
last paragraph

KONEN OBAYASHI ET AL.: "Impact  
of antibodies against amyloidogenic transthyretin  
(ATTR) on phenotypes of patients with  
familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) ATTR  
Valine30Methionine", CLINICA CHIMICA ACTA,  
vol. 419, 1 April 2013 (2013-04-01), pages 127-131,  
XP055119245, ISSN: 0009-8981, DOI: 10.1016/  
j.cca.2013.02.002, the whole document

**(57)** Предложены новые антитела, полученные от человека, специфичные к транстиретину (ТТР), предпочтительно способные к связыванию с неправильно свернутыми, неправильно собранными и/или агрегированными формами ТТР, а также способы на основе указанных антител. Кроме того, предложены способы диагностики и/или контроля заболеваний и варианты лечения заболеваний, связанных с ТТР амилоидозом. Также предложены анализы и наборы на основе антител, специфичных к ТТР или отложениям и агрегатам ТТР. Новые антитела против ТТР можно применять в фармацевтических и диагностических композициях для нацеленной иммунотерапии и диагностики ТТР.

**B9****044647****044647****B9**

### Область техники

Настоящее изобретение, в целом, относится к терапии транстиретинового (ТТР) амилоидоза антителами. В частности, настоящее изобретение относится к новым молекулам, которые специфично связываются с транстиретином человека (ТТР) и его антигенами, в особенности, к полученным от человека рекомбинантным антителам, а также фрагментам, производным и вариантам указанных антител, которые распознают неправильно свернутые, неправильно собранные или агрегированные формы ТТР либо фрагменты указанных форм и которые являются подходящими для лечения заболеваний и состояний, вызванных такими патогенными изоформами ТТР.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим и диагностическим композициям, содержащим такие связывающие молекулы, антитела и миметики указанных антител, которые являются ценными в качестве диагностического инструмента для обнаружения заболеваний, связанных с ТТР амилоидозом, а также при стратегии пассивной вакцинации для лечения нарушений, родственных заболеваниям, связанным с ТТР амилоидозом, таких как семейная амилоидная полинейропатия (САП), семейная амилоидная кардиомиопатия (САК), старческий системный амилоидоз (ССА), системный семейный амилоидоз, лептоменингеальный амилоидоз/амилоидоз центральной нервной системы (ЦНС), в том числе болезнь Альцгеймера, связанный с ТТР амилоидоз глаз, связанный с ТТР амилоидоз почек, связанная с ТТР гипертироксинемия, связанный с ТТР амилоидоз связок, включая синдром запястного канала, разрывы ротаторной манжеты и стеноз позвоночного канала поясничного отдела, а также предэклампися.

Более того, настоящее изобретение относится к способу диагностики заболевания или состояния, вызванного патогенными изоформами ТТР, такими как неправильно свернутый и/или агрегированный ТТР, присутствующий в отложениях амилоида, причем в образце жидкости организма от субъекта анализируют уровни патологических изоформ ТТР после введения антитела против ТТР, и причем наличие или изменение уровня патогенных изоформ ТТР, который определяют, например, по наличию иммунного комплекса ТТР и антитела против ТТР, по сравнению с контрольным образцом, отобранном перед введением, свидетельствует о заболевании и/или состоянии.

### Уровень техники

Транстиретин (ТТР), который ранее называли преальбумином, представляет собой растворимый белок длиной 127 аминокислот (эталонная последовательность NCBI: NP\_000362.1), который вовлечен в транспорт тироксина и ретинола в организме. ТТР секретируется в кровь печенью, а в спинномозговую жидкость (СМЖ) - сосудистым сплетением, а также экспрессируется в определенных тканях, таких как альфа-клетки поджелудочной железы или эпителий сетчатки. Синтез ТТР начинается на стадии зародыша и продолжается в течение всей жизни. ТТР присутствует в высокой концентрации в плазме (3,6-7,2 мкМ) и СМЖ (0,04-0,4 мкМ) и, как правило, образует в физиологических условиях растворимый гомотетрамер молекулярной массой ~55 кДа.

При определенных условиях, которые еще плохо изучены и могут включать кислое значение pH, окислительный стресс и локальные факторы, белок ТТР принимает альтернативную трехмерную конформацию и становится токсичным.

Токсичность неправильно свернутого белка ТТР исследовали посредством изучения редкого ауто-сомно-доминантного нейродегенеративного расстройства, названного семейной амилоидной полинейропатией (САП), поражающего взрослых людей в зрелом возрасте (Plante-Bordeneuve et al., *Lancet Neurol.* 10 (2011), 1086-1097). САП характеризуется прогрессирующими сенсорными, моторными и вегетативными патологиями, приводящими к смерти в течение десяти лет после постановки диагноза. Повреждения нервов вызваны накоплением аморфных агрегатов и амилоидных фибрилл, состоящих из белка ТТР. Замена Val30Met представляет собой наиболее частую мутацию, вызывающую САП, в особенности в областях, в которых заболевание является эндемическим, таких как северная Португалия, однако в гене ТТР уже были обнаружены более 100 различных мутаций; см. табл. IV ниже. Существующий патофизиологический механизм является идентичным для всех патогенных мутаций и заключается в том, что мутации изменяют структурную стабильность тетрамера ТТР, что способствует нарушению свертывания ТТР и приводит к образованию токсичных форм ТТР (Saraiva et al, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012), 2304-2311).

Токсичность ТТР также наблюдается вследствие мутации Val122Ile, которую обнаруживают с высокой частотой (3-5%) в популяциях афроамериканцев и западноафриканцев. Данная мутация связана с семейной амилоидной кардиомиопатией (САК) - состоянием, при котором обширное накопление ТТР в миокарде приводит к сердечной слабости и, в конечном итоге, к сердечной недостаточности (Ruberg et al., *Circulation.* 126 (2012), 1286-1300).

Мутации в последовательности белка ТТР не являются единственной причиной токсичности ТТР, ведь белок ТТР дикого типа также характеризуется тенденцией к нарушению свертывания и образованию токсичных агрегатов. Например, старческий системный амилоидоз (ССА) характеризуется сердечной слабостью и накоплением в миокарде агрегатов ТТР дикого типа (Ikeda, *Amyloid.* 18 Suppl 1 (2011), 155-156; Dzungu et al., *Heart.* 98 (2012), 1546-1554). Отложения ТТР дикого типа также наблюдаются во многих случаях воспаления связок и сухожилий, включая синдром запястного канала, разрывы ротатор-

ной манжеты и стеноз позвоночного канала поясничного отдела (Sueyoshi et al, Hum. Pathol. 42 (2011), 1259-1264; Gioeva et al, Amyloid. 20 (2013), 1-6). Более того, недавно сообщалось о ТТР амилоидозе в плаценте матерей, страдающих от предэклампсии (Kalkunte et al., Am. J. Pathol. 183 (2013) 1425-1436).

Варианты лечения заболеваний, связанных с ТТР амилоидозом, являются ограниченными и, главным образом, инвазивными, причем лечение преимущественно проводят, исходя из симптомов. В случае САП варианты лечения основываются на применении анальгетических средств для терапии нейропатической боли, на трансплантации печени для удаления основного источника мутантного белка ТТР и на лечении тафамидисом. Тафамидис представляет собой малую молекулу, которая связывается с тетрамером ТТР и стабилизирует его конформацию. Действие тафамидиса препятствует диссоциации тетрамера ТТР - лимитирующей стадии нарушения пути сворачивания, которая приводит к образованию токсичных форм ТТР. Тафамидис был одобрен для лечения САП в Европе, но не был одобрен в США, и терапевтическая эффективность данного препарата является ограниченной, в лучших случаях, замедляющей прогрессирование заболевания. На сегодняшний день доступное лечение, нацеленное на неправильно свернутый белок ТТР, отсутствует.

С учетом вышеизложенного необходимы новые терапевтические стратегии для эффективной и безопасной терапии заболеваний, связанных с ТТР амилоидозом.

Данная техническая проблема решается благодаря вариантам реализации, охарактеризованным в формуле изобретения и дополнительно описанным ниже, а также проиллюстрированным в примерах и фигурах.

### **Краткое описание изобретения**

В настоящем изобретении предложены антитела против транстиретина (ТТР) и эквивалентные ТТР-связывающие молекулы для применения при профилактическом или терапевтическом лечении заболеваний и состояний, связанных с ТТР амилоидозом. Более конкретно предложены подходящие для терапии рекомбинантные антитела, полученные от человека, а также фрагменты и производные указанных антител, которые распознают неправильно свернутые, неправильно собранные или агрегированные формы ТТР.

Агрегаты неправильно свернутого ТТР связаны с маркерами клеточного стресса, окислительного стресса, воспалительного ответа и апоптоза за много лет до манифестации симптома (Macedo et al., Mol. Med. 13 (2007), 584-91). Природная способность организма распознавать и расщеплять неправильно свернутые белки является защитным фактором, и различия в способности пациентов устранять токсичные белки ТТР, разумеется, приводят к различиям в возрасте манифестации заболевания и скорости прогрессирования заболевания. В поддержку данной гипотезы было показано, что у пациентов, получивших пересадку печени от донора с САП, быстро образуются антитела против патогенного белка ТТР (Ando et al., Transplantation. 73 (2002), 751-755), и что у пациентов с САП с высокими титрами антител против мутантного белка ТТР наблюдается более поздняя манифестация заболевания, чем у пациентов без таких антител (Obayashi et al., Clin. Chim. Acta. 419 (2013), 127-131). Кроме того, было показано, что активная иммунизация против патогенной конформации ТТР практически полностью устраняет отложения ТТР у трансгенных мышей с САП (Terazaki et al., Lab. Invest. 86 (2006), 23-31).

Однако, несмотря на то, что исследование стратегии терапевтического вмешательства на основе иммунитета может показаться заманчивым, до настоящего времени применение антител против ТТР для лечения связанных с ТТР заболеваний не проводилось. Например, в международной заявке ТТР для применения в скрининге САП и при исследовании и лечении связанных заболеваний. Однако, поскольку моноклональные антитела мыши вызывают ответ в форме образования антител человека против антител мыши (НАМА), такие антитела не подходят для терапии у людей. Следовательно, поскольку срок действия данной международной заявки истек, а последующая заявка, являющаяся развитием предыдущей заявки, не была опубликована, очевидно, что подход на основе терапевтических антител не получил развития. В некоторой степени, на сегодняшний день была дополнительно исследована диагностическая применимость антител против ТТР только для пациентов с ТТР амилоидозом; см., например, публикацию Phay M. et al., Rejuvenation Res. 2013 Oct 28 [предварительная электронная публикация].

Напротив, проведенные в соответствии с настоящим изобретением эксперименты по выделению полученных от человека моноклональных ТТР-специфичных антител, которые созрели в организме человека и являются специфичными в отношении неправильно свернутых, неправильно собранных, мутантных и/или агрегированных форм ТТР и/или фрагментов указанных форм, были успешными. У субъектов и пациентов, которые представляют собой людей, соответственно, являющихся источником В-клеток, из которых были выделены полученные от человека моноклональные антитела против ТТР и кДНК, кодирующая вариabельный домен указанных антител, соответственно, не наблюдалось значительных количеств неправильно свернутого ТТР, и указанные лица являлись асимптоматическими в отношении состояний, связанных с патогенными изоформами. Однако согласно другому варианту реализации настоящего изобретения источник В-клеток, из которых могут быть выделены полученные от человека моноклональные антитела против ТТР и кДНК, кодирующая вариabельный домен указанных антител, соответственно, представляет собой пациентов, у которых наблюдаются симптомы заболевания и/или нарушения, связанного с ТТР амилоидозом. Вследствие этого логично ожидать, что моноклональ-

ные антитела человека против ТТР согласно настоящему изобретению и производные указанных антител помимо того, что являются неиммуногенными у человека, демонстрируют терапевтически благоприятный эффект.

Вследствие этого настоящее изобретение направлено на полученные от человека рекомбинантные антитела, антигенсвязывающие фрагменты и аналогичные антигенсвязывающие молекулы, способные специфично распознавать ТТР. Если не указано обратное, под "специфично распознающим ТТР" антителом, "антителом, специфичным к ТТР/ в отношении ТТР", и "антителом против ТТР" подразумеваются антитела, которые специфично, совокупно и совместно связываются с нативной мономерной формой ТТР; антитела, связывающиеся специфично с любыми формами ТТР, например, мутантным ТТР, олигомерным, фибриллярным и/или нефибриллярным ТТР. В настоящей заявке предложены антитела, полученные от человека, селективные в отношении полноразмерных форм ТТР и/или фрагментов и/или неправильно свернутых, неправильно собранных и/или агрегированных форм ТТР.

Как было указано выше, антитело против ТТР согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой рекомбинантное антитело, причем по меньшей мере одна, предпочтительно две или более предпочтительно все три области, определяющие комплементарность (CDR), варибельной области тяжелой и/или легкой цепи и/или по существу вся варибельная область кодируется кДНК, которая была получена из мРНК, полученной из В-клетки памяти человека, которая продуцирует антитело против ТТР. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения антитело против ТТР согласно настоящему изобретению демонстрирует, в любой комбинации, еще одно из свойств связывания и биологических свойств, которые продемонстрированы для заявленных антител, проиллюстрированных в прилагаемых примерах и фигурах, предпочтительно еще одно из свойств связывания и биологических свойств, которые продемонстрированы для иллюстративных антител NI-301.59.F1, NI-301.35G11 и NI-301.37F1.

Согласно в особенности предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения антитело против ТТР или ТТР-связывающий фрагмент указанного антитела демонстрирует иммунологические характеристики связывания антитела, которое характеризуется варибельными областями  $V_H$  и/или  $V_L$ , представленными на фиг. 1.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела может представлять собой одноцепочечный Fv-фрагмент, F(ab')-фрагмент, F(ab)-фрагмент и F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент или любой другой антигенсвязывающий фрагмент. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения (см. ниже) антитело или фрагмент антитела представляет собой антитело человека изотипа IgG. В качестве альтернативы, антитело представляет собой химерное антитело человека - антитело грызуна или родентизированное антитело, такое как антитело мыши или муринизированное антитело, антитело крысы или ратинизированное антитело, причем версии, полученные от грызунов, являются в особенности подходящими для способов диагностики и исследований на животных.

Более того, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим антитело согласно настоящему изобретению или активные фрагменты указанного антитела, а также к иммунотерапевтическим и иммунодиагностическим способам применения таких композиций для предотвращения, диагностики или лечения нарушений, связанных с ТТР амилоидозом, причем эффективное количество композиции вводят пациенту, который нуждается в таком введении.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим по меньшей мере варибельную область иммуноглобулиновой цепи антитела согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, указанная варибельная область содержит по меньшей мере одну область, определяющую комплементарность (CDR), варибельной области  $V_H$  и/или  $V_L$ , представленной на фиг. 1. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения полинуклеотид представляет собой кДНК, которая, предпочтительно, была получена из мРНК, полученной из В-клеток памяти человека, которые продуцируют антитела, взаимодействующие с мутантными, неправильно свернутыми, неправильно собранными и/или агрегированными формами ТТР.

Соответственно, настоящее изобретение также включает векторы, содержащие указанные полинуклеотиды, и клетки-хозяева, трансформированные указанными векторами, а также применение указанных векторов и клеток-хозяев для продукции антитела и эквивалентных связывающих молекул, которые являются специфичными к ТТР. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения антитела или связывающие молекулы способны к связыванию с неправильно свернутыми, неправильно собранными или агрегированными формами ТТР либо фрагментами указанных форм. Средства и способы рекомбинантного получения антител и миметиков антител, а также способы скрининга конкурирующих связывающих молекул, которые могут представлять собой антитела или могут являться отличными от антител, известны в данной области техники. Однако, как описано в настоящей заявке, в частности, в отношении терапевтических применений у человека, антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело человека в том смысле, что применение указанного антитела по существу не вызывает иммунного ответа, направленного против такого антитела, в других случаях наблюдаемого при применении химерных и даже гуманизированных антител.

Более того, в настоящей заявке раскрыты композиции и способы, которые можно применять для

обнаружения ТТР, в частности мутантных, неправильно свернутых, неправильно собранных или агрегированных форм или фрагментов ТТР в образцах и/или *in vivo*. Раскрытые антитела против ТТР и связывающие фрагменты указанных антител можно применять для скрининга крови, плазмы, сыворотки, слюны, перитонеальной жидкости, спинномозговой жидкости ("СМЖ") и мочи человека для определения наличия ТТР и/или мутантных, неправильно свернутых, неправильно собранных или агрегированных форм или фрагментов ТТР в образцах, например, с применением анализа на основе ELISA (enzyme linked immunosorbent assay, твердофазный иммуноферментный анализ) или адаптированного к поверхности анализа. Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу диагностики или контроля прогрессирования нарушения, связанного с мутантными, неправильно свернутыми, неправильно собранными или агрегированными формами ТТР либо фрагментами указанных форм у субъекта, причем указанный способ включает определение наличия мутантных, неправильно свернутых, неправильно собранных или агрегированных форм или фрагментов ТТР в образце от субъекта для проведения диагностики с применением по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению или ТТР-связывающей молекулы и/или связывающих молекул против неправильно свернутых, неправильно собранных или агрегированных форм или фрагментов ТТР, характеризующихся по существу такой же специфичностью связывания с любой из перечисленных форм, причем наличие неправильно свернутых, неправильно собранных или агрегированных форм или фрагментов ТТР свидетельствует о нарушении.

Более того, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены антитела против ТТР и ТТР-связывающие молекулы, содержащие по меньшей мере одну CDR антитела согласно настоящему изобретению, для получения композиции для проведения обнаружения *in vivo* (также называемого визуализацией *in vivo*) или для нацеливания терапевтического и/или диагностического средства на ТТР, в частности, на мутантные, неправильно свернутые, неправильно собранные или агрегированные формы или фрагменты ТТР в организме человека или животного. Способы и композиции, раскрытые в настоящей заявке, могут оказывать помощь при нарушениях, связанных с ТТР амилоидозом и характеризующихся, например, появлением форм ТТР, и указанные способы и композиции можно применять для контроля прогрессирования заболевания и терапевтической эффективности терапии, предложенной субъекту, например, в диагностических способах, связанных с визуализацией *in vivo*. Вследствие этого, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело против ТТР и/или ТТР-связывающая молекула согласно настоящему изобретению, причем указанное обнаружение (визуализация) *in vivo* включает скинтиграфию, позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭКТ), оптическую визуализацию в ближней инфракрасной (ИК) области или магнитно-резонансную визуализацию (МРВ).

Соответственно, конкретной целью настоящего изобретения является обеспечение способов лечения, диагностики или предотвращения заболевания, связанного с ТТР амилоидозом. Указанные способы включают введение эффективной концентрации антитела, предпочтительно антитела человека, или производного антитела субъекту, причем указанное антитело нацелено на ТТР либо фрагменты ТТР, предпочтительно, неправильно свернутые, неправильно собранные или агрегированные формы ТТР либо фрагменты указанных форм.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предложен пептид, содержащий эпитоп ТТР, предпочтительно неправильно свернутых, неправильно собранных или агрегированных форм ТТР либо фрагментов указанных форм, который специфично распознается антителом согласно настоящему изобретению. Указанный пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной ниже в подробном описании и в примерах, или из модифицированной указанной последовательности, в которой были заменены, удалены и/или добавлены одна или несколько аминокислот, при условии, что указанный пептид все еще распознается когнатным антителом. Как было упомянуто, такой пептид можно применять в качестве антигена, т.е. указанный пептид может являться иммуногеном и вследствие этого может быть подходящим для вызова иммунного ответа у субъекта и стимуляции продукции антител согласно настоящему изобретению *in vivo*. Соответственно, пептид согласно настоящему изобретению является в особенности подходящим в качестве вакцины.

Помимо этого в настоящем изобретении предложен способ диагностики заболеваний, связанных с ТТР амилоидозом, у субъекта, включающий этап определения наличия антитела, которое связывается с указанным пептидом, в биологическом образце от указанного субъекта.

Согласно следующему аспекту настоящее изобретение относится к способу диагностики заболевания, связанного с ТТР амилоидозом, контроля лечения заболевания антителом против ТТР или определения диагностической или терапевтической применимости антитела против ТТР, причем указанный способ включает проведение анализа уровня неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце, например, крови, полученном от субъекта после введения указанному субъекту антитела против ТТР, причем наличие или увеличенный уровень неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце субъекта по сравнению с контролем, таким как образец, полученный от субъекта перед введением антитела против ТТР, свидетельствует о заболевании, связанном с ТТР амилоидозом.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, в частности, при применении животных, отличных от человека, для исследования рекомбинантных антител, полученных от

человека, и других антител против ТТР, предназначенных для применения у человека, как проиллюстрировано в примере 13, как правило, уровень неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце анализируют посредством определения комплекса, образовавшегося между антителами против ТТР и неправильно свернутым и/или агрегированным ТТР, например, посредством иммунопреципитации с антителами против IgG человека или антиидиотипическим антителом.

В отношении диагностического аспекта, в частности, для субъектов и пациентов, которые представляют собой людей, наличие и увеличенный уровень неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР и комплекса последнего с антителом против ТТР, соответственно, свидетельствует о наличии отложений амилоида ТТР в организме человека, например в сердце, периферической нервной системе (ПНС), глазах, мышцах, желудочно-кишечном тракте, почках, сосудистой системе и центральной нервной системе (ЦНС) пациента или субъекта. Таким образом, способ согласно настоящему изобретению, с одной стороны, позволяет проводить обнаружение и определение заболевания, связанного с ТТР амилоидозом, в организме человека и, с другой стороны, удаление отложений ТТР из организма пациента, что также позволяет определить терапевтический прогресс проводимого лечения и эффективность лекарственного препарата для лечения ТТР амилоидоза, такого как антитело против ТТР.

Следовательно, как продемонстрировано в примере 13, антитело против ТТР согласно настоящему изобретению способно к связыванию с неправильно свернутым и/или агрегированным ТТР с достаточной аффинностью для изменения стабильности отложений патологического ТТР, например, для захвата и удаления неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР из отложений в жидкость организма, в частности, в кровь. Точный интервал времени после введения, т.е. временную рамку, после которой измеряют уровень патологического ТТР и комплекса с антителом против ТТР, соответственно, определяет практикующий врач. Обычно используют интервал времени, составляющий менее недели. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения уровень патологического ТТР в образце от пациента или субъекта после введения антитела против ТТР или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела пациенту или субъекту определяют через 48 ч или менее; см. также пример 13.

Настоящее изобретение также относится к применению любого антитела против ТТР и ТТР-связывающей молекулы в способе, описанном выше. Однако благодаря характеризующимся преимуществами свойствам и, в частности, поскольку данное антитело получено от человека, применение антитела против ТТР согласно изобретению, раскрытому в настоящей заявке, является предпочтительным. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения антитело демонстрирует по существу такое же связывание и биологические активности, как и любое антитело, выбранное из NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1, NI-301.2F5, NI-301.28B3, NI-301.119C12, NI-301.5D8, NI-301.9D5, NI-301.104F5, NI-301.21F10, NI-301.9G12, NI-301.12D3, NI-301.37F1-PIMC, NI-301.44E4, NI-301.18C4, NI-301.11A10, NI-301.3C9, NI-301.14D8, NI-301.9X4 и NI-301.14C3. Антитело против ТТР можно также изменить для облегчения проведения манипуляций в рамках способов диагностики, включая мечение антитела, как подробно описано ниже.

Дополнительные варианты реализации настоящего изобретения будут очевидными из следующего описания и примеров.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1: Аминокислотные последовательности переменных областей антител человека NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1, NI-301.2F5, NI-301.28B3, NI-301.119C12, NI-301.5D8, NI-301.9D5, NI-301.104F5, NI-301.21F10, NI-301.9G12, NI-301.12D3, NI-301.37F1-PIMC, NI-301.44E4, NI-301.18C4, NI-301.11A10, NI-301.3C9, NI-301.14D8, NI-301.9X4 и NI-301.14C3.

Показаны каркасные области (FR, framework region) и области, определяющие комплементарность (CDR), причем CDR подчеркнуты. Использовали схему нумерации согласно Кэботу (сравните: <http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

Фиг. 2: Связывание с агрегированным ТТР, ТТР дикого типа и мутантным ТТР методом прямого ELISA. А, В, С: Планшеты для ELISA сенсibilизировали агрегированным ТТР человека дикого типа (●), агрегированным рекомбинантным V30M-ТТР (▼) и бычьим сывороточным альбумином (BSA) (■) в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали со следующими моноклональными антителами человека в диапазоне концентраций от 4 пМ до 400 нМ: А) NI-301.59F1, В) NI-301.35G11 и С) NI-301.37F1.

Значения  $EC_{50}$  определяли посредством аппроксимации единичных значений методом наименьших квадратов.

NI-301.59F1: для агрегированного ДТ-ТТР  $EC_{50}$  = 3,0 нМ, для агрегированного V30M-ТТР  $EC_{50}$  = 15,5 нМ

NI-301.35G11: для агрегированного ДТ-ТТР  $EC_{50}$  = 3,9 нМ, для агрегированного V30M-ТТР  $EC_{50}$  = 5,0 нМ

NI-301.37F1: для агрегированного ДТ-ТТР  $EC_{50}$  = 0,35 нМ, для агрегированного V30M-ТТР  $EC_{50}$  = 0,15 нМ

Фиг. 3: Специфичность в отношении агрегированного ТТР методом дот-блота.

Белок ТТР человека дикого типа в нативной (1) или агрегированной (2) конформациях и агрегиро-

ванный рекомбинантный белок V30M-ТТР (3) наносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали со следующими антителами: А) коммерческим поликлональным антителом кролика против ТТР (Dako-A0002; 150 нг/мл), В) NI-301.59F1 С) NI-301.35G11 и D) NI-301.37F1 (В, С и D: моноклональные антитела человека в концентрации 50 нМ).

Фиг. 4: Специфичность в отношении агрегированного ТТР методом вестернблоттинга.

Белок ТТР человека дикого типа (300 нг) в нативной (1) или агрегированной (2) конформациях и экстракт печени мыши дикого типа (10 мкг суммарного белка) (3) наносили на гель ДСН-ПААГ (полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия) и обрабатывали для проведения анализа методом вестернблоттинга со следующими антителами: А) коммерческим поликлональным антителом кролика против ТТР (Dako-A0002; 150 нг/мл), В) NI-301.59F1 С) NI-301.35G11 и D) NI-301.37F1 (В, С и D: моноклональные антитела человека в концентрации 50 нМ). Для предотвращения диссоциации высокомолекулярных агрегатов образец агрегированного ТТР перед нанесением на гель перекрестно сшивали с глутаральдегидом (1%, 5 мин.).

Фиг. 5: Отсутствие связывания с ТТР плазмы человека методом вестернблоттинга.

Образцы плазмы (0,5 мкл) от контролен (n=5), носителей бессимптомных мутаций (n=5) и пациентов с САП (n=4) наносили на гель ДСН-ПААГ и обрабатывали для проведения анализа методом вестернблоттинга со следующими антителами: А) коммерческим поликлональным антителом кролика против ТТР (Dako-A0002; 150 нг/мл), В) исключительно вторичным антителом (иммуноглобулин против IgG человека-ПХ (пероксидаза хрена), разведение 1/10000), С) NI-301.35G11 и D) NI-301.37F1 (С и D: моноклональные антитела человека в концентрации 50 нМ).

Фиг. 6: Отсутствие связывания с ТТР плазмы человека методом дот-блота.

Чистый белок ТТР дикого типа и мутантный белок ТТР в нативной и агрегированной конформациях и образцы плазмы от контролей, носителей бессимптомных мутаций и пациентов с САП наносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали со следующими антителами: А) коммерческим поликлональным антителом кролика против ТТР (Dako-A0002; 150 нг/мл), В) исключительно вторичным антителом (антитело против IgG2a мыши-ПХ, разведение 1/10000) и С) химерным антителом мыши NI-301.mur35G1 1 (10 нМ). Образцы 1-6: 150 нг 1) агрегированного ДТ-ТТР, 2) нативного ДТ-ТТР, 3) БСА, 4) нативного V30M-ТТР, 5) нативного L55P-ТТР и 6) нативного Y78F-ТТР. Образцы 7-18: 2 мкл плазмы, отобранной от контролей 7-10) (n=4), носителей бессимптомных мутаций 11-14) (n=4) и пациентов с САП 15-18) (n=4).

Фиг. 7: Специфичное связывание с агрегированным ТТР в растворе.

Белок ТТР человека дикого типа и рекомбинантный белок ТТР в нативной и агрегированной конформациях и образец плазмы человека в 3 различных разведениях использовали для иммунопреципитации (ИП) ТТР с применением следующих антител: А) коммерческого поликлонального антитела кролика против ТТР (Dako-A0002), В) NI-301.35G11 и С) NI-301.37F1. Проводили анализ иммунопреципитированных белков методом электрофореза в ДСН-ПААГ и обнаруживали данные белки методом вестернблоттинга (ВБ) с применением антитела Dako-A0002 (150 нг/мл).

Дорожки 1-2: контроли нанесения ВБ: 300 нг 1) ДТ-ТТР человека, 2) рекомбинантного ДТ-ТТР

Дорожки 3-6: ИП чистого белка ТТР: 3) нативного ДТ-ТТР человека, 4) агрегированного ДТ-ТТР человека, 5) рекомбинантного нативного ДТ-ТТР и 6) рекомбинантного агрегированного ДТ-ТТР

Дорожки 7-10: ИП плазмы человека, разведенной ФБР 7) в 10 раз, 8) в 100 раз, 9) в 1000 раз, и 10) ФБР самого по себе.

Фиг. 8: Специфичное связывание с ТТР на ткани мыши с САП.

Трансгенные мыши, экспрессирующие аллель V30M-ТТР человека на фоне нокаута (НА) ТТР, воспроизводят гистопатологические признаки САП, включая аморфные и амилоидные отложения ТТР в различных тканях. Срезы тканей печени и кишечника, отобранных от А) мышей с САП и В) мышей ТТР-НА, обрабатывали для проведения анализа методом иммуногистохимии с применением следующих антител: 1) коммерческого поликлонального антитела кролика против ТТР (Dako-A0002; разведение 1/1000), 2) NI-301.35G11 и 3) NI-301.37F1 (2 и 3: моноклональные антитела человека в концентрации 50 нМ).

Фиг. 9: Специфичное связывание с отложениями неправильно свернутого ТТР, но не нативного ТТР, в ткани человека.

Способность антител к связыванию с ТТР исследовали на гистологических срезах от биопсии кожи пациента с САП и здоровой контрольной поджелудочной железы: неправильно свернутые накопления ТТР, характерные для САП, присутствовали в биопсии кожи пациента, тогда как в альфа-клетках поджелудочной железы наблюдалась эндогенная экспрессия ТТР. Срезы обрабатывали для проведения анализа методом иммуногистохимии с применением следующих антител: 1А) коммерческого поликлонального антитела кролика против ТТР (Dako-A0002; разведение 1/1000), 1В) конъюгированного с ПХ антитела против IgG кролика (разведение 1/125), 2А) химерного антитела мыши NI-301.mur35G11 (50 нМ), 2В) конъюгированного с ПХ антитела против IgG2a мыши (разведение 1/125), 3А) NI-301.37F1 (50 нМ) и 3В) конъюгированного с ПХ антитела против IgG человека (разведение 1/125).

Фиг. 10: Связывающие эпитопы ТТР оценивали методом анализа Pepscan.

Связывающие антитело эпитопы ТТР определяли с применением метода пептидного сканирования. Помимо пептидов, перекрывающих полную последовательность ТТР человека дикого типа (споты 1-29), на мембране были также представлены избранные мутации ТТР (споты 30-44). Мембрану для пептидного сканирования инкубировали со следующими антителами в концентрации 50 нМ: А) NI-301.59F1, В) NI-301.35G11 и С) NI-301.37F1. Как обобщено в табл. D):

NI-301.59F1 связывается с EEEFVEGIY (ТТР 61-69);

NI-301.35G11 связывается с GELHGLTTEEE (ТТР 53-63);

мутация L55P предотвращает связывание антитела; и

NI-301.37F1 связывается с WEPFA (ТТР 41-45); мутация E42G предотвращает связывание антитела.

Затем с целью определения требований к последовательности упомянутых эпитопов связывающие антитело эпитопы ТТР обнаруживали с применением способа сканирования аланином. Целая последовательность белка ТТР человека дикого типа была представлена на мембране в виде набора из 151 последовательного пептида длиной 15 аминокислот, начиная с каждой аминокислоты белка ТТР. В каждом пептиде аминокислоту в положении 10 заменяли аланином либо глицином или пролином, когда исходная аминокислота представляла собой аланин. Мембрану для пептидного сканирования инкубировали со следующими антителами в концентрации 20 нМ: E) NI-301.59F1, F) NI-301.35G11 и G) NI-301.37F1. Как обобщено в табл. H):

NI-301.59F1 связывается с EEFXEGIY (ТТР 62-69).

NI-301.35G11 связывается с ELXGLTXE (ТТР 54-61).

NI-301.37F1 связывается с WEPFA (ТТР 41-45), где X означает аминокислоту;

замена E42 на аланин не предотвращает связывания, но замена на гуанин предотвращает связывание антитела, как показано в С.

Фиг. 11: Оценка кинетики связывания антитела с белком ТТР в растворе методом поверхностного плазмонного резонанса.

Кинетику связывания антитела NI-301.37F1 с белком ТТР измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Антитело NI-301.37F1 захватывали на сенсор с помощью антитела против IgG человека, и над поверхностью сенсора пропускали раствор белка ТТР в концентрациях, варьирующих от 3,2 до 316 нМ. Для аппроксимации результатов и получения соответствующих констант ассоциации ( $k_a$ ), диссоциации ( $k_d$ ) и аффинности ( $KD$ ) использовали простую модель связывания 1:1. Свойства связывания определяли для А) белка ТТР человека дикого типа в нативной конформации, В) денатурированного белка ТТР человека дикого типа (неправильно свернутая конформация) и С) рекомбинантного мутантного белка ТТР-L55P.

Нативный ТТР дикого типа:  $k_a$  = не определена,  $k_d$  = не определена,  $KD > 316$  нМ. Денатурированный ТТР дикого типа:  $k_a = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ,  $k_d = 2,6 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ ,  $KD = 1,2$  нМ. Рекомбинантный ТТР-L55P:  $k_a = 3,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ,  $k_d = 4,6 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ ,  $KD = 1,4$  нМ.

Фиг. 12: Хроническое лечение антителом против ТТР уменьшает отложение патологического ТТР на модели САП на мышах.

Мышам с САП (Tg(6.0hMet30)×muTTR-KO) еженедельно вводили химерное антитело мыши NI-301.37F1 или антитело контроля изотипа в дозе 3 мг/кг и.п. (интраперитонеально) в течение 12 недель. По окончании периода лечения ткани отбирали, и степень отложения ТТР количественно определяли методом иммунофлуоресценции. А) Эффект лечения у мышей в возрасте 7 месяцев (n=14-15 мышей на группу); В) Эффект лечения у мышей в возрасте 17 месяцев (n=10 мышей на группу). Сравнения групп с применением двустороннего неспаренного t-критерия.

Фиг. 13: Связывание антитела с патологическими отложениями ТТР *in vivo*.

Связывание с мишенью характеризовали у взрослых мышей с САП (7 месяцев) через 48 часов после введения единичной дозы 30 мг/кг антитела NI-301.37F1 и.п. или ФБР. Патологические отложения ТТР и локализацию инъецированного антитела обнаруживали одновременно методом иммунофлуоресценции. А, D) Патологические отложения ТТР в почках мышей, которым инъецировали (А) NI-301.37F1 или (D) ФБР. В, E) Обнаружение антитела человека у мышей, которым инъецировали (В) NI-301.37F1 или (E) ФБР. С, F) Наложение изображений, демонстрирующее (С) солокализацию ТТР и NI-301.37F1 и (F) отсутствие неспецифичного окрашивания.

Фиг. 14: Бестканевое обнаружение неправильно свернутого ТТР *in vivo*.

Взрослым мышам с САП однократно вводили NI-301.37F1 или антитела контроля изотипа в дозе 3 мг/кг и.п. Образцы крови отбирали до инъекции антитела (t=0) и через 48 ч после инъекции антитела (t=48 ч). Образцы плазмы обрабатывали методом иммунопреципитации с антителами против IgG человека и анализировали методом вестернблоттинга с применением для обнаружения: А) поликлонального антитела против ТТР, не зависящего от конформации (Dako A0002, 150 нг/мл), и В) NI-301.37F1 (20 нМ). Параллельно образец плазмы, отобранный от мыши с САП, не получившей инъекции, инкубировали с антителом NI-301.37F1 *in vitro* перед обработкой.

Фиг. 15: Специфичность антитела к агрегированным белкам оценивали методом ELISA

Специфичность антитела в отношении белка ТТР изучали посредством измерения связывания с из-



бранными агрегированными белками методом прямого ELISA. Связывание антитела изучали в концентрации 4 и 20 нМ, и интенсивность сигнала выражали в виде кратности изменения относительно фоновых уровней, измеренных в каждом анализе при отсутствии антитела против ТТР. А-В) анализ связывания NI-301.37F1 в концентрациях 20 (А) и 4 нМ (В); С-Д) анализ связывания NI-301.44E4 в концентрациях 20 (С) и 4 нМ (D).

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение, в целом, относится к иммунотерапии и неинвазивным способам обнаружения заболеваний и состояний, связанных с наличием патологических, часто мутантных и/или неправильно свернутых изоформ транстиретина (ТТР). Более конкретно, настоящее изобретение относится к рекомбинантным моноклональным антителам, полученным от человека, и антигенсвязывающим фрагментам указанных антител, которые были созданы на основе информации о последовательности, полученной из избранных популяций донора человека, и которые способны к связыванию с такими изоформами ТТР и антигенами указанных изоформ. Рекомбинантное моноклональное антитело, полученное от человека, согласно настоящему изобретению преимущественно характеризуется специфичным связыванием с неправильно свернутыми, неправильно собранными, мутантными и/или агрегированными формами ТТР и/или фрагментами указанных форм, что обеспечивает нацеливание для лечения и/или диагностики патологически измененных форм ТТР. Логично ожидать, что благодаря получению от человека созданные в результате рекомбинантные антитела согласно настоящему изобретению будут эффективными и безопасными в качестве терапевтического средства, а также высокоспецифичными в качестве диагностического реактива для обнаружения патологического ТТР, не дающего ложноположительных результатов.

Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению, а также производные указанного антитела можно применять после трансплантации органов для комбинированной терапии пациентов, которые, несмотря на трансплантацию, подвержены риску развития ТТР амилоидоза вследствие, например, отложений ТТР, например, наследственных мутаций в ТТР или дефекта продукции ТТР в печени. Таким образом, в качестве конкретного, характеризующегося преимуществом варианта реализации настоящее изобретение относится к моноклональному антителу человека и к любым производным указанного антитела, описанным в настоящей заявке, для применения при лечении пациентов в режиме монотерапии или при лечении пациентов, получающих, например, иммуносупрессивные лекарственные препараты после трансплантации органов или другие средства, применяемые при симптомах, связанных с ТТР амилоидозом, причем антитело согласно настоящему изобретению и любое из производных указанного антитела сконструировано для введения одновременно с иммуносупрессивным лекарственным препаратом и/или средством, подавляющим последующие побочные эффекты, либо последовательно до или после введения указанного препарата. В данном контексте антитела против ТТР и ТТР-связывающий фрагмент согласно настоящему изобретению предпочтительно являются по существу неиммуногенными у человека. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие как моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению или любое производное указанного антитела, так и один или несколько иммуносупрессивных лекарственных препаратов и/или препаратов, применяемых при симптомах, связанных с ТТР амилоидозом.

#### **I. Определения**

Если не указано обратное, определение терминов в настоящей заявке дано в соответствии с Оксфордским словарем биохимии и молекулярной биологии (Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, пересмотрен в 2000 г. и переиздан в 2003 г., ISBN 0198506732).

Следует отметить, что термин, обозначающий объект в единственном числе, означает один или несколько таких объектов; например, понимают, что "антитело" представляет собой одно или несколько антител. В связи с этим термины, означающие объект в единственном числе, а также термины, означающие объект, в сочетании с фразами "один или несколько" и "по меньшей мере один", можно применять в настоящей заявке взаимозаменяемо.

Если конкретно не указано обратное, термин "ТТР" используют взаимозаменяемо для конкретного обозначения различных форм транстиретина (ТТР). Термин "ТТР" также используют для обозначения в общем виде других конформеров ТТР, например олигомеров и/или неправильно свернутых, неправильно собранных и/или агрегированных форм ТТР. Термин "ТТР" также используют для совокупного обозначения всех типов и форм ТТР, таких как мутантный ТТР. Добавление букв перед термином ТТР используют для обозначения организма, из которого был получен конкретный ортолог, например, чТТР для ТТР человека или мТТР для ТТР, полученного из мыши. Кроме того, если не указано обратное, система нумерации для аминокислотной последовательности ТТР в настоящей заявке относится к зрелому белку ТТР, т.е. белку ТТР, секретлируемому клетками после отщепления сигнального пептида. Данная нумерация используется для определения мутаций ТТР, обнаруженных у пациентов, таких как ТТР-V30M или ТТР-L55P, но отличается от нумерации, используемой для последовательности белка-предшественника транстиретина (эталонная последовательность NCBI: NP\_000362.1). В данном контексте положение и замещенную аминокислоту в мутантном ТТР можно указать различными, но эквивалентными способами; см., например, "ТТР-V30M" и "V30M-ТТР".

Антитела против ТТР, раскрытые в настоящей заявке, специфично связываются с ТТР и эпитопами

ТТР, а также с различными конформациями ТТР и эпитопами указанных конформаций. Например, в настоящей заявке раскрыты антитела, которые специфично связываются с патологически измененными формами ТТР либо фрагментами указанных форм, такими как олигомеры/фибриллы, и/или с мутантными, неправильно свернутыми, неправильно собранными и/или агрегированными формами ТТР либо фрагментами указанных форм. Термины "(патологически) мутантный", "неправильно свернутый, неправильно собранный агрегированный ТТР"/"агрегаты ТТР" используют взаимозаменяемо для конкретного обозначения вышеуказанных форм. Термин (патологические) "агрегированные формы" или "агрегаты" в настоящей заявке означает продукты накопления или кластерообразования в результате неправильно/патологического взаимодействия ТТР друг с другом. Данные агрегаты, накопления или кластерные формы могут по существу состоять или состоять из как ТТР и/или фрагментов ТТР, так и из нефибриллярных олигомеров и/или фибриллярных олигомеров и их фибрилл. В настоящей заявке упоминание антитела, которое "специфично связывается", "селективно связывается" или "предпочтительно связывается" с ТТР, означает антитело, которое не связывается с другими неродственными белками. В одном примере антитело против ТТР, раскрытое в настоящей заявке, может связываться с ТТР или эпитопом ТТР и не демонстрирует связывания, превышающего сигнал фона приблизительно в 2 раза, с другими белками. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению по существу не распознает неродственные образующие амилоид белки, выбранные из группы, включающей альфа-синуклеин ( $\alpha$ -syn), Таи, трансактивный ответ ДНК-связывающий белок 43 (transactive response DNA-binding protein 43, TDP-43), сывороточный амилоид А (serum amyloid A, SAA), белок гентингтин (huntingtin, НТТ); см., например, фиг. 15. Антитело, которое "специфично связывается" или "селективно связывается" с конформером ТТР, означает антитело, которое связывается не со всеми конформациями ТТР, т.е. не связывается с по меньшей мере одним другим конформером ТТР.

Например, в настоящей заявке раскрыты антитела, которые могут предпочтительно связываться с неправильно свернутыми, неправильно собранными и/или агрегированными формами ТТР как *in vitro*, так и в тканях, полученных от пациентов, которые страдают от заболеваний, связанных с ТТР амилоидозом, или которые характеризуются риском развития заболеваний, связанных с ТТР амилоидозом. Поскольку последовательности антител против ТТР согласно настоящему изобретению были получены от субъектов-людей, антитела против ТТР согласно настоящему изобретению можно также называть "ауто-антителами человека" или "антителами, полученными от человека", чтобы подчеркнуть, что данные антитела изначально действительно были экспрессированы субъектами и не являются синтетическими конструкциями, полученными, например, с применением фаговых библиотек, экспрессирующих иммуноглобулин человека, которые до настоящего времени представляли собой распространенный способ получения антител, подобных антителам человека.

Термин "пептид" понимают как включающий термины "полипептид" и "белок" (которые иногда могут использоваться в настоящей заявке взаимозаменяемо) в пределах их значения. Аналогично, также предусмотрены фрагменты белков и полипептидов, которые могут обозначаться в настоящей заявке как "пептиды". Однако термин "пептид" предпочтительно означает полимер аминокислот, содержащий по меньшей мере 5 смежных аминокислот, предпочтительно, по меньшей мере 10 смежных аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 15 смежных аминокислот, еще более предпочтительно по меньшей мере 20 смежных аминокислот и, в особенности предпочтительно по меньшей мере 25 смежных аминокислот. Кроме того, пептид в соответствии с настоящим изобретением, как правило, содержит не более 100 смежных аминокислот, предпочтительно менее 80 смежных аминокислот, более предпочтительно менее 50 смежных аминокислот и еще более предпочтительно не более 15 смежных аминокислот полипептида ТТР.

### Полипептиды

В настоящей заявке термин "полипептид" предназначен для включения единственного числа "полипептид", а также множественного числа "полипептиды", и означает молекулу, состоящую из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" означает любую цепь или цепи, состоящие из двух или более аминокислот, и не указывает на конкретную длину продукта. Так, "пептиды", "дипептиды", "трипептиды", "олигопептиды", "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей, состоящих из двух или более аминокислот, включены в определение "полипептид", и термин "полипептид" может использоваться вместо любого из данных терминов или взаимозаменяемо с любым из данных терминов.

Термин "полипептид" также предназначен для обозначения продуктов постэкспрессионных модификаций полипептида, включая, без ограничения, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование и дериватизацию с применением известных защитных/блокирующих групп, протеолитическое расщепление или модификацию несуществующими в природе аминокислотами. Полипептид может быть получен из природного биологического источника или может быть получен с применением рекомбинантной технологии, но не обязательно транслирован с последовательности указанной нуклеиновой кислоты. Полипептид может быть получен любым способом, включая получение посредством хи-

мического синтеза.

Полипептид согласно настоящему изобретению может составлять в длину приблизительно 3 аминокислоты или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 25 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 200 или более, 500 или более, 1000 или более или 2000 аминокислот или более. Полипептиды могут обладать определенной трехмерной структурой, хотя и не обязательно обладают такой структурой. Полипептиды с определенной трехмерной структурой называют свернутыми, а полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, но вполне могут принимать большое количество различных конформаций, называют развернутыми. В настоящей заявке термин "гликопротеин" означает белок, соединенный с по меньшей мере одной углеводной группой, которая присоединена к белку посредством кислородсодержащей или азотсодержащей боковой цепи остатка аминокислоты, например, остатка серина или остатка аспарагина.

Под "выделенным" полипептидом или фрагментом, вариантом или производным указанного полипептида понимают полипептид, который лишен своего природного окружения. Какого-либо конкретного уровня очистки не требуется. Например, выделенный полипептид может быть удален из своего нативного или природного окружения. Полученные рекомбинантным способом полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей настоящего изобретения, поскольку представляют собой нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были выделены, фракционированы или частично или по существу очищены посредством любой подходящей методики.

"Рекомбинантные пептиды, полипептиды или белки" означают пептиды, полипептиды или белки, полученные посредством методик рекомбинантной ДНК, т.е. полученные из клеток микробов или млекопитающих, трансформированных экзогенной экспрессирующей конструкцией рекомбинантной ДНК, кодирующей слитый белок, включая целевой пептид. Белки или пептиды, экспрессируемые в большинстве бактериальных культур, как правило, не содержат гликанов. Характер гликозилирования белков или полипептидов, экспрессируемых в дрожжах, может отличаться от такового белков или полипептидов, экспрессируемых в клетках млекопитающих.

К полипептидам согласно настоящему изобретению относятся фрагменты, производные, аналоги или варианты вышеуказанных полипептидов, а также любые их комбинации. Термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог" включают пептиды и полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, по существу подобную аминокислотной последовательности природного пептида. Термин "по существу подобная" означает первую аминокислотную последовательность, которая содержит достаточное или минимальное количество идентичных или эквивалентных аминокислотных остатков по сравнению со второй аминокислотной последовательностью так, что первая и вторая аминокислотные последовательности содержат общий структурный домен и/или обладают общей функциональной активностью. Например, аминокислотные последовательности, которые содержат общий структурный домен, которые по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или по меньшей мере приблизительно на 100% идентичны, обозначают как по существу подобные. Предпочтительно, варианты будут по существу подобными аминокислотной последовательности предпочтительных пептидов согласно настоящему изобретению, в частности, ТТР, вариантам, производным или аналогам любого из ТТР. Такие варианты, как правило, сохраняют функциональную активность пептидов согласно настоящему изобретению. Варианты включают пептиды, которые отличаются аминокислотной последовательностью от нативного пептида и пептида дикого типа (ДТ), соответственно, на одну или несколько делеций, добавлений и/или замен аминокислот. Такие варианты могут представлять собой существующие в природе, а также сконструированные искусственным способом варианты.

Более того, термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог" в отношении антител или полипептидов антитела согласно настоящему изобретению включают любые полипептиды, которые сохраняют по меньшей мере некоторые из антигенсвязывающих свойств соответствующей нативной связывающей молекулы, антитела или полипептида. Фрагменты полипептидов согласно настоящему изобретению включают протеолитические фрагменты, а также делеционные фрагменты, помимо конкретных фрагментов антитела, которые обсуждаются где-либо в настоящей заявке. Варианты антител и полипептидов антитела согласно настоящему изобретению включают фрагменты, описанные выше, а также полипептиды с аминокислотной последовательностью, измененной вследствие замен, делеций или вставок аминокислот. Варианты могут существовать в природе или не существовать в природе. Не существующие в природе варианты могут быть получены с применением известных в данной области техники методик мутагенеза. Варианты полипептидов могут содержать консервативные или неконсервативные замены, делеции или добавления аминокислот. Производные молекул, специфично связывающихся с ТТР,

например, антител и полипептидов антитела согласно настоящему изобретению, представляют собой полипептиды, которые были изменены для получения дополнительных свойств, не обнаруживаемых в нативном полипептиде. Примеры включают слитые белки. Варианты полипептидов могут также обозначаться в настоящей заявке как "аналоги полипептидов". В настоящей заявке "производное" связывающей молекулы или фрагмента указанной молекулы, антитела или полипептида антитела означает заявляемый полипептид, содержащий один или несколько остатков, дериватизованных химическим способом посредством реакции с функциональной боковой группой. Также к "производным" относятся те пептиды, которые содержат одно или несколько существующих в природе аминокислотных производных двадцати стандартных аминокислот. Например, 4-гидроксипролин может заменить пролин; 5-гидроксилизин может заменить лизин; 3-метилгистидин может заменить гистидин; гомосерин может заменить серин; и орнитин может заменить лизин.

#### Определение подобия и/или идентичности молекул

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

"Подобие" между двумя полинуклеотидами определяют посредством сравнения последовательности нуклеиновой кислоты одного полинуклеотида с последовательностью другого полинуклеотида. Нуклеиновая кислота одного полинуклеотида подобна соответствующей нуклеиновой кислоте второго полинуклеотида, если первая нуклеиновая кислота является идентичной или, в случае, когда нуклеиновая кислота представляет собой часть кодирующей последовательности, если соответствующий триплет, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирует ту же аминокислоту или кодирует консервативную замену аминокислоты.

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

Определение процента идентичности или подобия проводят со стандартными параметрами программ BLASTn для поисков полинуклеотидов BLAST и программ BLASTp для поисков белков BLAST, как рекомендуется на веб-странице NCBI и в руководстве "BLAST Program Selection Guide" в отношении последовательностей определенной длины и состава.

Поиски полинуклеотидов BLAST проводят с помощью программы BLASTn. В случае общих параметров для параметра "Max Target Sequences" можно установить значение 100, в окне "Short queries" можно поставить отметку, для параметра "Expect threshold" можно установить значение 1000, и для параметра "Word Size" можно установить значение 7, как рекомендуется на веб-странице NCBI в случае коротких последовательностей (менее 20 оснований). Для более длинных последовательностей для параметра "Expect threshold" можно установить значение 10, и для параметра "Word Size" можно установить значение 11. Для параметров оценивания "Match/mismatch Scores" можно установить значение 1, -2, а в окне "Gap Costs" можно выбрать вариант "linear". Для параметров Filters и Masking в окне "Low complexity regions" отметку можно не ставить, в окне "Species-specific repeats" отметку можно не ставить, в окне "Mask for lookup table only" отметку можно поставить, в окне "DUST Filter Settings" отметку можно поставить и в окне "Mask lower case letters" отметку можно не ставить. В целом, в данном случае можно использовать поиск "Search for short nearly exact matches", который обеспечивает большинство из вышеуказанных настроек. Дополнительную информацию о данном вопросе можно найти в руководстве "BLAST Program Selection Guide", опубликованном на веб-странице NCBI.

Поиски белков BLAST проводят с помощью программы BLASTp. В случае общих параметров для параметра "Max Target Sequences" можно установить значение 100, в окне "Short queries" отметку можно поставить, для параметра "Expect threshold" можно установить значение 10, и для параметра "Word Size" можно установить значение "3". Для параметров оценивания в окне "Matrix" можно выбрать вариант "BLOSUM62", в окне "Gap Costs" можно выбрать вариант "Existence: 11 Extension: 1", в окне "Compositional adjustments" выбрать вариант "Conditional compositional score matrix adjustment". Для параметров Filters и Masking в окне "Low complexity regions" отметку можно не ставить, в окне "Mask for lookup table only" отметку можно не ставить, и в окне "Mask lower case letters" отметку можно не ставить.

Модификации обеих программ, например, в зависимости от длины искомым последовательностей, осуществляют в соответствии с рекомендациями, изложенными в руководстве "BLAST Program Selection Guide", опубликованном в HTML- и PDF-версиях на веб-странице NCBI.

### Полинуклеотиды

Термин "полинуклеотид" предназначен для обозначения одной нуклеиновой кислоты, а также множества нуклеиновых кислот и означает выделенную молекулу или конструкцию нуклеиновой кислоты, например, матричную РНК (мРНК) или плазмидную ДНК (пДНК). Полинуклеотид может содержать стандартную фосфодиэфирную связь или нестандартную связь (например, амидную связь, такую как обнаруженная в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Термин "нуклеиновая кислота" означает любые один или несколько сегментов нуклеиновой кислоты, например, фрагменты ДНК или РНК, присутствующие в полинуклеотиде. Под "выделенной" нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом понимают молекулу нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая была извлечена из своего нативного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий антитело, содержащийся в векторе, считают в контексте настоящего изобретения выделенным. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, поддерживаемые в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или по существу) полинуклеотиды в растворе. Выделенные молекулы РНК включают РНК-транскрипты полинуклеотидов согласно настоящему изобретению *in vivo* или *in vitro*. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением также включают такие молекулы, полученные синтетическим способом. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота может представлять собой или может содержать регуляторный элемент, такой как промотор, сайт связывания рибосомы или терминатор транскрипции.

В настоящей заявке "кодирующая область" представляет собой часть нуклеиновой кислоты, состоящую из кодонов, которые транслируются в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) не транслируется в аминокислоту, его можно считать частью кодирующей области, однако любые фланкирующие последовательности, например, промоторы, сайты связывания рибосомы, терминаторы транскрипции, интроны и т.п., не являются частью кодирующей области. Две или более кодирующих областей согласно настоящему изобретению могут находиться в одной полинуклеотидной конструкции, например, в одном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например, в отдельных (различных) векторах. Более того, любой вектор может содержать одну кодирующую область или может содержать две или более кодирующих областей, например, один вектор может отдельно кодировать переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина и переменную область легкой цепи иммуноглобулина. Кроме того, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может кодировать гетерологичные кодирующие области, слитые или не слитые с нуклеиновой кислотой, кодирующей связывающую молекулу, антитело или фрагмент, вариант или производное указанного антитела. Гетерологичные кодирующие области включают, без ограничения, специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В случае ДНК полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, обычно может содержать промотор и/или другие контрольные элементы транскрипции или трансляции, функционально связанные с одной или несколькими кодирующими областями. Функциональная связь представляет собой связь, при которой кодирующая область для продукта гена, например, полипептида, связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями таким образом, чтобы экспрессия продукта гена находилась под влиянием или контролем регуляторной последовательности (или последовательностей). Два фрагмента ДНК (такие как область, кодирующая полипептид, и промотор, связанный с указанной областью) являются "функционально связанными", если индукция функции промотора приводит к транскрипции мРНК, кодирующей целевой продукт гена, и если природа связи между двумя фрагментами ДНК не препятствует способности регулирующих последовательностей направлять экспрессию продукта гена или не препятствует способности матрицы ДНК к транскрипции. Таким образом, область промотора может быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если промотор способен обеспечивать транскрипцию данной нуклеиновой кислоты. Промотор может представлять собой клеточно-специфичный промотор, который обеспечивает транскрипцию ДНК по существу только в определенных клетках. Помимо промотора, для обеспечения клеточно-специфичной транскрипции с полинуклеотидом могут быть функционально связаны другие контрольные элементы транскрипции, например, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции. Подходящие промоторы и другие контрольные области транскрипции раскрыты в настоящей заявке.

Специалистам в данной области техники известно множество контрольных областей транскрипции. Данные области включают, без ограничения, контрольные области транскрипции, которые функционируют в клетках позвоночных, такие как, но не ограничиваясь указанными, сегменты промотора и энхансера цитомегаловирусов (немедленно-ранний промотор в сочетании с интроном-А), вируса обезьян 40 (ранний промотор) и ретровирусов (таких как вирус саркомы Рауса). Другие контрольные области транскрипции включают таковые, полученные из генов позвоночных, таких как актин, белок теплового шока, бычий гормон роста и  $\beta$ -глобин кролика, а также другие последовательности, способные контролировать экспрессию гена в эукариотических клетках. Дополнительные подходящие контрольные области транскрипции включают тканеспецифичные промоторы и энхансеры, а также индуцируемые лимфокинами

промоторы (например, промоторы, индуцируемые интерферонами или интерлейкинами).

Аналогично, средним специалистам в данной области техники известно множество контрольных элементов трансляции. Таковые включают, но не ограничены указанными, сайты связывания рибосомы, кодоны инициации и терминации трансляции и элементы, полученные из пикорнавирусов (в частности, участок внутренней посадки рибосомы, или IRES (internal ribosome entry site), также означаемый как последовательность CITE (cap-independent translation enhancer, кэп-независимый энхансер трансляции)).

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

Полинуклеотид и нуклеиновая кислота, кодирующие области согласно настоящему изобретению, могут быть связаны с дополнительными кодирующими областями, которые кодируют секреторные или сигнальные пептиды, направляющие секрецию полипептида, кодируемого полинуклеотидом согласно настоящему изобретению. В соответствии с сигнальной гипотезой, белки, секретируемые клетками млекопитающих, содержат сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, которая отщепляется от зрелого белка после начала экспорта растущей белковой цепи через гранулярный эндоплазматический ретикулум. Средним специалистам в данной области техники известно, что полипептиды, секретируемые клетками позвоночных, как правило, содержат сигнальный пептид, слитый с N-концом полипептида, который отщепляется от целого или "полноразмерного" полипептида с получением секретируемой или "зрелой" формы полипептида. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения используют нативный сигнальный пептид, например, сигнальный пептид тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина либо функциональное производное данной последовательности, которые сохраняют способность направлять секрецию полипептида, функционально связанного с данным сигнальным пептидом или производным. В качестве альтернативы, можно использовать гетерологичный сигнальный пептид млекопитающих или функциональное производное указанного пептида. Например, лидерную последовательность дикого типа можно заменить лидерной последовательностью тканевого активатора плазминогена (tissue plasminogen activator, ТРА) человека или  $\beta$ -глокуронидазы мыши.

Термин "связывающая молекула" в контексте настоящего изобретения относится преимущественно к антителам и фрагментам антител, но может также означать другие молекулы, отличные от антител, которые связываются с ТТР, включая, но не ограничиваясь указанными, гормоны, рецепторы, лиганды, молекулы основного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС), шапероны, такие как белки теплового шока (heat shock proteins, HSP), а также молекулы межклеточной адгезии, такие как члены суперсемейств кадгеринов, интегринов, лектинов С-типа и иммуноглобулинов (Ig). Таким образом, исключительно во избежание двусмысленного толкования и без ограничения объема настоящего изобретения, большинство следующих вариантов реализации обсуждаются в отношении антител и антитело-подобных молекул, которые представляют собой предпочтительные связывающие молекулы для разработки терапевтических и диагностических средств.

#### **Антитела**

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

Как обсуждается более подробно ниже, термин "иммуноглобулин" включает различные широкие классы полипептидов, которые можно отличить друг от друга биохимическим способом. Специалистам в данной области техники известно, что тяжелые цепи подразделяют на гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), с выделением среди них некоторых подклассов (например,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Природа данной цепи определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA, IgE, соответственно. Подклассы иммуноглобулинов (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д. хорошо охарактеризованы; известно, что подклассы определяют функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из данных классов и изотипов очевидны специалисту в данной области техники, принимая во внимание настоящее изобретение, и, соответственно, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов, безусловно, находятся в пределах объема настоящего изобретения; следующее обсуждение, главным образом, относится к классу молекул иммуноглобулинов IgG. В случае IgG стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи молекулярной массой приблизительно 23000 Дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи, как правило, соединены дисульфидными связями в "Y"-конфигурации, в которой легкие цепи обхватывают тяжелые цепи, начиная у раздвоения "Y" и продолжая через вариабельную область.

Легкие цепи подразделяют на каппа или лямбда ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Каждый класс тяжелых цепей может быть связан с легкой цепью каппа или лямбда. Как правило, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с

другом, и "хвостовые" участки двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины получают с применением гибридом, В-клеток или сконструированных методами генной инженерии клеток-хозяев. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности располагаются от N-конца на раздвоенных концах Y конфигурации до C-конца внизу каждой цепи.

Легкая и тяжелая цепи разделены на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константный" и "вариабельный" используют функционально. В этой связи следует принимать во внимание, что вариабельные домены участков легкой ( $V_L$ ) и тяжелой ( $V_H$ ) цепей определяют распознавание антигена и специфичность. И наоборот, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, способность проходить через плаценту, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и т.п. Обычно нумерация доменов константной области увеличивается по мере того, как домены становятся более дистальными от антигенсвязывающего сайта или аминоконца антитела. N-концевой участок представляет собой вариабельную область, и в C-концевом участке находится константная область; домены CH3 и CL фактически содержат карбокси-конец тяжелой и легкой цепей соответственно.

Как указано выше, вариабельная область позволяет антителу селективно распознавать и специфично связываться с эпитопами на антигенах. То есть домен  $V_L$  и домен  $V_H$  или подгруппа областей, определяющих комплементарность (CDR), антитела объединяются с образованием вариабельной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Данная четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя CDR на каждой из цепей  $V_H$  и  $V_L$ . Любое антитело или фрагмент иммуноглобулина, который содержит достаточную структуру для специфичного связывания с ТТР, обозначен в настоящей заявке взаимозаменяемо как "связывающий фрагмент" или "иммуноспецифичный фрагмент".

В существующих в природе антителах антитело содержит шесть гипервариабельных областей, которые иногда называют "областями, определяющими комплементарность", или "CDR", присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, которые являются короткими, несмежными последовательностями аминокислот, расположенными определенным образом так, чтобы образовывать антигенсвязывающий домен, когда антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водном окружении. "CDR" фланкированы четырьмя относительно консервативными "каркасными" областями или "FR" (framework region), которые демонстрируют меньшую внутримолекулярную вариабельность. Каркасные области преимущественно принимают конформацию  $\beta$ -слоя, и CDR образуют петли, которые соединяют и, в некоторых случаях, образуют часть структуры  $\beta$ -слоя. Таким образом, каркасные области выступают для образования скелета, который обеспечивает размещение CDR в надлежащей ориентации посредством внутрицепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный в результате ориентирования CDR, определяет комплементарность поверхности эпитопу на иммунореактивном антигене. Данная комплементарная поверхность стимулирует нековалентное связывание антитела с когнатным эпитопом. Средний специалист в данной области техники может легко идентифицировать аминокислоты, составляющие CDR и каркасные области, соответственно, для любой данной вариабельной области тяжелой или легкой цепи, поскольку такие аминокислоты были точно определены; см. публикации "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, J. Mol. Biol, 196 (1987), 901-917.

В случае, когда существует два или более определений термина, который используют и/или который принят в данной области техники, подразумевают, что определение термина, используемое в настоящей заявке, включает все такие значения, если однозначно не указано обратное. Конкретным примером является применение термина "область, определяющая комплементарность" ("CDR"), для описания несмежных антигенсвязывающих сайтов, обнаруженных в пределах вариабельной области полипептидов тяжелой и легкой цепей. Данная конкретная область была описана в публикациях Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) и Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте и в которых определения включают перекрытия подгрупп аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Несмотря на это, подразумевают, что применение любого определения для обозначения CDR антитела или вариантов антитела входит в объем термина, определенного и применяемого в настоящей заявке. Соответствующие аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как определено в каждом из источников, на которые даны ссылки выше, изложены в табл. I ниже в качестве сравнения. Точные номера остатков, которые охватывают конкретную CDR, варьируют в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут обычным способом определить, какие остатки составляют конкретную гипервариабельную область или CDR антитела человека подтипа IgG, учитывая аминокислотную последовательность вариабельной области антитела.

Таблица I: Определения CDR	Согласно Кэботу	Согласно Чотия
CDR1 VH	31-35	26-32
CDR2 VH	50-65	52-58
CDR3 VH	95-102	95-102
CDR1 VL	24-34	26-32
CDR2 VL	50-56	50-52
CDR3 VL	89-97	91-96

<sup>1</sup> Нумерация всех определений CDR в табл. I соответствует правилам нумерации, изложенными в публикации Kabat et al. (см. ниже).

Кэбот с соавт. также определили систему нумерации для последовательностей переменного домена, которая применима к любому антителу. Средний специалист в данной области техники может однозначно применить данную систему "нумерации согласно Кэботу" к последовательности любого переменного домена, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо последовательности самой по себе. В настоящей заявке "нумерация согласно Кэботу" означает систему нумерации, изложенную в публикации Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983). Если не указано обратное, ссылки на нумерацию конкретных положений остатков аминокислот в антителе или антигенсвязывающем фрагменте, варианте или производном указанного антитела согласно настоящему изобретению соответствуют системе нумерации согласно Кэботу, которая, однако, является теоретической и не может одинаково применяться к каждому антителу согласно настоящему изобретению. Например, в зависимости от положения первой CDR, следующие CDR могут быть сдвинуты в любом направлении.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, иммуноспецифичные фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению включают, но не ограничены указанными, поликлональные, моноклональные, мультиспецифичные антитела, антитела человека, гуманизированные, приматизированные, муринизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидными связями Fv (sdFv), фрагменты, содержащие домен V<sub>L</sub> или V<sub>H</sub>, фрагменты, полученные с применением библиотеки, экспрессирующей Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела против антител, раскрытых в настоящей заявке). Молекулы ScFv известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 5,892,019. Молекулы иммуноглобулина или антитела согласно настоящему изобретению могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекул иммуноглобулинов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению не является IgM или производным указанного иммуноглобулина с пентавалентной структурой. В частности, при конкретных вариантах применения настоящего изобретения, в особенности при терапевтическом применении, IgM являются менее подходящими, чем IgG и другие бивалентные антитела или соответствующие связывающие молекулы, поскольку IgM в связи с пентавалентной структурой и отсутствием аффинного созревания часто демонстрируют неспецифичные перекрестные реактивности и очень низкую аффинность.

Согласно в особенности предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению не является поликлональным антителом, т.е. данное антитело по существу состоит из одного конкретного вида антитела, а не является смесью, полученной из образца иммуноглобулинов плазмы.

Фрагменты антител, включая одноцепочечные антитела, могут содержать переменную область (области) сами по себе или в комбинации со следующими структурами целиком либо участками указанных структур: шарнирная область, домены CH1, CH2 и CH3. Также в настоящее изобретение включены ТТР-связывающие фрагменты, которые содержат любую комбинацию переменной области (областей) с шарнирной областью, доменами CH1, CH2 и CH3. Антитела или иммуноспецифичные фрагменты указанных антител согласно настоящему изобретению могут быть получены из любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения переменная область может быть получена от хрящевых рыб (например, акул).

Согласно одному аспекту антитело согласно настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело человека, выделенное от человека. Необязательно каркасная область антитела человека выровнена и приспособлена в соответствии с последовательностью соответствующей переменной области зародышевой линии человека в базе данных; см., например, базу Vbase (<http://vbase.mrc-sre.cam.ac.uk/>), организованную Центром белковой инженерии Совета по медицинским исследованиям (MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Например, аминокислоты, которые, как считают,



потенциально отличаются от истинной последовательности зародышевой линии, можно встроить в процессе клонирования благодаря последовательностям праймеров для ПНР. По сравнению с антителами, подобными антителам человека, полученными искусственным способом, такими как одноцепочечные фрагменты антитела (scFv) из библиотеки антител фагового дисплея или из ксеногенных мышей, моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению характеризуется тем, что указанное антитело (i) было получено с применением иммунного ответа человека вместо такового животных-заменителей, т.е. антитело было образовано в ответ на природный ТТР в соответствующей конформации в организме человека, (ii) защитило индивидуума, или, по меньшей мере, является существенным в случае наличия ТТР, и (iii) поскольку антитело было получено от человека, риски перекрестной реактивности против аутоантигенов минимизированы. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением термины "моноклональное антитело человека", "моноклональное аутоантитело человека", "антитело человека" и т.п. используют для обозначения ТТР-связывающей молекулы, которая была получена от человека, т.е. которая была выделена из клетки человека, такой как В-клетка или ее гибридома, или кДНК которой была непосредственно клонирована из мРНК клетки человека, например, В-клетки памяти человека. Антитело человека все еще является "человеческим", т.е. полученным от человека, даже если в данное антитело введены замены аминокислот, например, для улучшения характеристик связывания.

Согласно одному варианту реализации антитела, полученные от человека, согласно настоящему изобретению содержат гетерологичные области по сравнению с существующими в природе антителами, например, замены аминокислот в каркасной области, константную область, слитую экзогенным способом с вариабельной областью, различные аминокислоты на С- или N- концах и т.п.

Антитела, полученные из библиотек иммуноглобулинов человека или от животных, трансгенных по одному или нескольким иммуноглобулинам человека, которые не экспрессируют эндогенные иммуноглобулины, как описано выше и, например, в патенте США № 5939598 Kucherlapati et al., представляют собой указанные антитела, подобные антителам человека, с целью отличить их от истинных антител человека согласно настоящему изобретению.

Например, спаривание тяжелой и легкой цепей антител, подобных антителам человека, таких как синтетические и полусинтетические антитела, как правило, выделенные методом фагового дисплея, не обязательно отражает исходное спаривание, происходящее в исходной В-клетке человека. Соответственно, фрагменты Fab и scFv, полученные из рекомбинантных экспрессирующих библиотек, широко применяемых в известном уровне техники, можно считать искусственными со всеми сопутствующими возможными эффектами на иммуногенность и стабильность.

Напротив, в настоящем изобретении предложены выделенные антитела с созревшей аффинностью, полученные от избранных субъектов-людей, причем указанные антитела характеризуются терапевтической применимостью и толерантностью у людей.

В настоящей заявке термин "родентизированное антитело" или "родентизированный иммуноглобулин" означает антитело, содержащее одну или несколько CDR из антитела человека согласно настоящему изобретению; и каркасную область человека, которая содержит замены и/или делеции и/или вставки аминокислот, основанные на последовательности антитела грызуна. При упоминании грызунов предпочтительно используют последовательности, полученные от мышей и крыс, причем антитела, содержащие такие последовательности, называют "муринизированными" или "ратинизированными", соответственно. Иммуноглобулин человека, из которого была получена CDR, называют "родительским" или "акцепторным", а антитело грызуна, из которого были взяты изменения каркасной области, называют "донорным". Константные области необязательно должны присутствовать, но, в случае наличия, константные области обычно по существу идентичны константным областям антитела грызуна, т.е. идентичны по меньшей мере приблизительно на 85%-90%, предпочтительно, идентичны приблизительно на 95% или более. Следовательно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полноразмерная тяжелая или легкая цепь муринизированного иммуноглобулина человека содержит константную область мыши, CDR человека и по существу каркасную область человека, которая содержит определенное количество "муринизирующих" замен аминокислот. Как правило, "муринизированное антитело" представляет собой антитело, содержащее муринизированную вариабельную область легкой цепи и/или муринизированную вариабельную область тяжелой цепи. Например, муринизированное антитело не будет включать типичное химерное антитело, например, поскольку вся вариабельная область химерного антитела является областью, отличной от области мыши. Модифицированное антитело, которое было "муринизировано" в результате процесса "муринизации", связывается с тем же антигеном, что и родительское антитело, из которого была получена CDR, и является обычно менее иммуногенным у мышей по сравнению с родительским антителом. Приведенное выше пояснение в отношении "муринизированного" антитела аналогичным образом применяется для "родентизированного" антитела, такого как "ратинизированные антитела", в которых последовательности крысы используют вместо последовательностей мыши.

В настоящей заявке термин "участок тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, полученные из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий участок тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один из следующих доменов: домен CH1, шарнирный (например, верхняя, средняя и/или нижняя шарнирная область) домен, домен CH2, домен CH3 или вариант или фрагмент ука-

занных доменов.

Например, связывающий полипептид для применения в настоящем изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую домен СН1; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере, участок шарнирного домена и домен СН2; полипептидную цепь, содержащую домен СН1 и домен СН3; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере, участок шарнирного домена и домен СН3, или полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере, участок шарнирного домена, домен СН2 и домен СН3. Согласно другому варианту реализации полипептид согласно настоящему изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен СН3. Также в связывающем полипептиде для применения в настоящем изобретении может отсутствовать, по меньшей мере, участок домена СН2 (например, весь домен СН2 или его часть). Как изложено выше, средний специалист в данной области техники понимает, что данные домены (например, участки тяжелой цепи) могут быть модифицированы таким образом, что аминокислотная последовательность данных доменов будет отличаться от последовательности молекулы иммуноглобулина, существующей в природе.

В определенных антителах или антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных указанных антител, раскрытых в настоящей заявке, участки тяжелой цепи одной полипептидной цепи мультимера идентичны таковым на второй полипептидной цепи мультимера. В качестве альтернативы, мономеры, содержащие участок тяжелой цепи согласно настоящему изобретению, не идентичны. Например, каждый мономер может содержать отличный сайт связывания мишени, образующий, например, биспецифичное антитело или диатело.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител, раскрытые в настоящей заявке, состоят из одной полипептидной цепи, такой как scFv, и экспрессируются внутриклеточным способом (интратела) для потенциальных терапевтических и диагностических применений *in vivo*.

Участки тяжелой цепи связывающего полипептида для применения в способах диагностики и лечения, раскрытых в настоящей заявке, могут быть получены из различных молекул иммуноглобулинов. Например, участок тяжелой цепи полипептида может содержать домен СН1, полученный из молекулы IgG1, и шарнирную область, полученную из молекулы IgG3. В другом примере участок тяжелой цепи может содержать шарнирную область, частично полученную из молекулы IgG1 и частично полученную из молекулы IgG3. В другом примере участок тяжелой цепи может содержать химерную шарнирную область, частично полученную из молекулы IgG1 и частично полученную из молекулы IgG4.

В настоящей заявке термин "участок легкой цепи" включает аминокислотные последовательности, полученные из легкой цепи иммуноглобулина. Предпочтительно участок легкой цепи содержит по меньшей мере один из доменов V<sub>L</sub> или C<sub>L</sub>.

Минимальный размер пептидного или полипептидного эпитопа для антитела, как считают, составляет приблизительно от четырех до пяти аминокислот. Пептидные или полипептидные эпитопы предпочтительно содержат по меньшей мере семь, более предпочтительно, по меньшей мере девять и, наиболее предпочтительно, от по меньшей мере приблизительно 15 до приблизительно 30 аминокислот. Поскольку CDR может распознавать антигенный пептид или полипептид в третичной форме, аминокислоты, составляющие эпитоп, не обязательно должны быть смежными, а в некоторых случаях могут даже располагаться на разных пептидных цепях. В настоящем изобретении пептидный или полипептидный эпитоп, распознанный антителами согласно настоящему изобретению, содержит последовательность по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, более предпочтительно по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или от приблизительно 15 до приблизительно 30 смежных или несмежных аминокислот ТТР.

Под "специфичным связыванием" или "специфичным распознаванием", которые используются в настоящей заявке взаимозаменяемо, как правило, понимают, что связывающая молекула, например, антитело, связывается с эпитопом посредством антигенсвязывающего домена указанной молекулы, и что связывание подразумевает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. В соответствии с данным определением говорят, что антитело "специфично связывается" с эпитопом, когда указанное антитело связывается с данным эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена легче, чем указанное антитело связывалось бы со случайным неродственным эпитопом. Термин "специфичность" используют в настоящей заявке для оценки относительной аффинности, благодаря которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно сказать, что антитело "А" характеризуется более высокой специфичностью к данному эпитопу, чем антитело "В", или можно сказать, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью, чем специфичность указанного антитела в отношении родственного эпитопа "D".

В случае наличия термин "иммунологические характеристики связывания" или другие характеристики связывания антитела с антигеном во всех его грамматических формах означает специфичность, аффинность, перекрестную реактивность и другие характеристики связывания антитела.

Под "предпочтительным связыванием" подразумевают, что связывающая молекула, например, антитело, специфично связывается с эпитопом легче, чем указанное антитело связывалось бы с родствен-

ным, подобным, гомологичным или аналогичным эпитопом. Таким образом, антитело, которое "предпочтительно связывается" с данным эпитопом, будет более вероятно связываться с данным эпитопом, чем с родственным эпитопом, даже если такое антитело может являться перекрестно-реактивным в отношении родственного эпитопа.

В качестве неограничивающего примера можно считать, что связывающая молекула, например, антитело, предпочтительно связывается с первым эпитопом, если данная молекула связывается с указанным первым эпитопом с константой диссоциации ( $K_D$ ), меньшей, чем  $K_D$  антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывается с первым антигеном, если данное антитело связывается с первым эпитопом с аффинностью, которая по меньшей мере на один порядок величины ниже  $K_D$  антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывается с первым эпитопом, если данное антитело связывается с первым эпитопом с аффинностью, которая по меньшей мере на два порядка величины ниже  $K_D$  антитела для второго эпитопа.

В другом неограничивающем примере можно считать, что связывающая молекула, например, антитело, предпочтительно связывается с первым эпитопом, если данная молекула связывается с первым эпитопом со скоростью диссоциации ( $k(\text{off})$ ), меньшей, чем  $k(\text{off})$  антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывается с первым эпитопом, если данное антитело связывается с первым эпитопом с аффинностью, которая по меньшей мере на один порядок величины ниже  $k(\text{off})$  антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывается с первым эпитопом, если данное антитело связывается с первым эпитопом с аффинностью, которая по меньшей мере на два порядка величины ниже  $k(\text{off})$  антитела для второго эпитопа.

Можно сказать, что связывающая молекула, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, раскрытые в настоящей заявке, связывается с ТТР либо фрагментом, вариантом или конкретной конформацией ТТР со скоростью диссоциации ( $k(\text{off})$ ), меньшей или равной  $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{ c}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$  или  $10^{-3} \text{ c}^{-1}$ . Более предпочтительно можно сказать, что антитело согласно настоящему изобретению связывается с ТТР либо фрагментом, вариантом или конкретной конформацией ТТР со скоростью диссоциации ( $k(\text{off})$ ), меньшей или равной  $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ c}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$  или  $10^{-5} \text{ c}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ c}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$  или  $10^{-7} \text{ c}^{-1}$ .

Можно сказать, что связывающая молекула, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, раскрытые в настоящей заявке, связывается с ТТР либо фрагментом, вариантом или конкретной конформацией ТТР со скоростью ассоциации ( $k(\text{on})$ ), большей или равной  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ,  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ,  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  или  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ . Более предпочтительно, можно сказать, что антитело согласно настоящему изобретению связывается с ТТР либо фрагментом, вариантом или конкретной конформацией ТТР со скоростью ассоциации ( $k(\text{on})$ ), большей или равной  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ,  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  или  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ , или  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ .

Говорят, что связывающая молекула, например, антитело, конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом, если указанная молекула предпочтительно связывается с данным эпитопом до такой степени, что блокирует, в некоторой степени, связывание эталонного антитела с данным эпитопом. Конкурентное ингибирование можно определить любым способом, известным в данной области техники, например, с помощью конкурентных анализов ELISA. Можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 50%.

В настоящей заявке термин "аффинность" означает степень прочности связывания отдельного эпитопа с CDR связывающей молекулы, например, молекулы иммуноглобулина; см., например, руководство Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988), стр. 27-28. В настоящей заявке термин "авидность" означает общую стабильность комплекса, образованного между совокупностью иммуноглобулинов и антигеном, то есть, функциональную совокупную прочность смеси иммуноглобулинов с антигеном; см., например, руководство Harlow, стр. 29-34. Авидность связана с аффинностью отдельных молекул иммуноглобулина в популяции со специфичными эпитопами, а также с валентностью иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между бивалентным моноклональным антителом и антигеном с часто повторяющейся эпитопной структурой, такой как полимер, представляет собой взаимодействие с высокой авидностью. Аффинность или авидность антитела в отношении антигена можно определить экспериментальным путем с применением любого подходящего способа; см., например, публикации Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kubly, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), и способы, описанные в настоящей заявке. Общие методики измерения аффинности антитела в отношении антигена включают ELISA, РИА (радиоиммунный анализ) и поверхностный плазмонный резонанс. Измеренная аффинность конкретного взаимодействия антитело-антиген может варьировать, если ее измеряли в различных условиях, например, концентрации соли, рН. Таким

образом, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров, например,  $K_D$ ,  $IC_{50}$ , предпочтительно проводят со стандартизированными растворами антитела и антигена и со стандартизированным буфером.

Связывающие молекулы, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению можно также описать или определить в контексте перекрестной реактивности указанных молекул. В настоящей заявке термин "перекрестная реактивность" означает способность антитела, специфичного к одному антигену, взаимодействовать с другим антигеном; меру родства между двумя различными антигенными веществами. Таким образом, антитело является перекрестно-реактивным, если данное антитело связывается с эпитопом, отличным от такового, вызвавшего образование данного антитела. Перекрестно-реактивный эпитоп, как правило, содержит множество одинаковых комплементарных структурных элементов, как и индуцирующий эпитоп, и в некоторых случаях может фактически лучше соответствовать, чем исходный.

Например, определенные антитела обладают некоторой степенью перекрестной реактивности, поскольку данные антитела связываются с родственными, но неидентичными эпитопами, например с эпитопами, обладающими по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 55% и по меньшей мере 50% идентичности (которую рассчитывают с применением способов, известных в данной области техники и описанных в настоящей заявке) с эталонным эпитопом. Можно сказать, что антитело характеризуется низкой перекрестной реактивностью или отсутствием перекрестной реактивности, если данное антитело не связывается с эпитопами, обладающими менее 95%, менее 90%, менее 85%, менее 80%, менее 75%, менее 70%, менее 65%, менее 60%, менее 55% и менее 50% идентичности (которую рассчитывают с применением способов, известных в данной области техники и описанных в настоящей заявке) с эталонным эпитопом. Антитело можно считать "высокоспецифичным" в отношении определенного эпитопа, если указанное антитело не связывается с любым другим аналогом, ортологом или гомологом данного эпитопа.

Связывающие молекулы, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению, можно также описать или определить в контексте аффинности связывания указанных молекул с ТТР и/или мутантными, неправильно свернутыми, неправильно собранными и/или агрегированными формами ТТР и/или фрагментами указанных форм. Предпочтительные аффинности связывания включают таковые с константой диссоциации, или  $K_d$ , составляющей менее  $5 \times 10^{-2} M$ ,  $10^{-2} M$ ,  $5 \times 10^{-3} M$ ,  $10^{-3} M$ ,  $5 \times 10^{-4} M$ ,  $10^{-4} M$ ,  $5 \times 10^{-5} M$ ,  $10^{-5} M$ ,  $5 \times 10^{-6} M$ ,  $10^{-6} M$ ,  $5 \times 10^{-7} M$ ,  $10^{-7} M$ ,  $5 \times 10^{-8} M$ ,  $10^{-8} M$ ,  $5 \times 10^{-9} M$ ,  $10^{-9} M$ ,  $5 \times 10^{-10} M$ ,  $10^{-10} M$ ,  $5 \times 10^{-11} M$ ,  $10^{-11} M$ ,  $5 \times 10^{-12} M$ ,  $10^{-12} M$ ,  $5 \times 10^{-13} M$ ,  $10^{-13} M$ ,  $5 \times 10^{-14} M$ ,  $10^{-14} M$ ,  $5 \times 10^{-15} M$  или  $10^{-15} M$ .

Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению характеризуется  $K_d$  для различных изоформ ТТР, как показано для иллюстративного антитела в табл. V ниже, т.е.  $K_d > 300$  нМ для нативного ТТР дикого типа и/или  $K_d \leq 15$  нМ, предпочтительно,  $\leq 5$  нМ и, наиболее предпочтительно,  $\leq 2$  нМ для денатурированного ТТР, и/или  $K_d \leq 35$  нМ, предпочтительно,  $\leq 20$  нМ для нативного ТТР-V30M, и/или  $K_d \leq 150$  нМ, предпочтительно,  $\leq 5$  нМ, и наиболее предпочтительно,  $\leq 2$  нМ для нативного ТТР-L55P.

Как было отмечено выше, субъединичные структуры и трехмерная конфигурация константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В настоящей заявке термин "домен  $V_H$ " включает аминоконцев вариационного домена тяжелой цепи иммуноглобулина, и термин "домен СН1" включает первую (наиболее аминоконцевую) константную область домена тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен СН1 прилегает к домену  $V_H$  и является аминоконцевым по отношению к шарнирной области тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина.

В настоящей заявке термин "домен СН2" включает участок тяжелой цепи молекулы, который располагается, например, от приблизительно остатка 244 до остатка 360 антитела при использовании общепринятых схем нумерации (остатки с 244 по 360 при нумерации согласно Кэботу; и остатки 231-340 по системе нумерации EU; см. цитируемую публикацию Kabat EA et al.). Домен СН2 уникален тем, что данный домен не спарен непосредственно с другим доменом. Наоборот, две N-связанные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя доменами СН2 интактной нативной молекулы IgG. Также убедительно подтверждено документально, что домен СН3 располагается от домена СН2 до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

В настоящей заявке термин "шарнирная область" включает участок тяжелой цепи молекулы, который соединяет домен СН1 с доменом СН2. Данная шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является подвижной, что позволяет двум N-концам антигенсвязывающих областей двигаться независимо. Шарнирные области можно подразделить на три различных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены; см. публикацию Roux et al., J Immunol. 161 (1998), 4083-4090.

В настоящей заявке термин "дисульфидная связь" включает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовать дисульфидную связь или мостик со второй тиольной группой. В большинстве существующих в природе

молекул IgG области CH1 и CL связаны дисульфидной связью, и две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 при использовании системы нумерации согласно Кэботу (положение 226 или 229 по системе нумерации EU).

В настоящей заявке термины "связанный", "слитый" или "слияние" используются взаимозаменяемо. Данные термины означают объединение вместе двух или более элементов или компонентов каким-либо способом, включая химическую конъюгацию или рекомбинантные способы. "Слияние в рамках считывания" означает присоединение двух или более полинуклеотидных открытых рамок считывания (open reading frame, ORF) с образованием непрерывной более длинной ORF, так, чтобы сохранялась правильная трансляционная рамка считывания исходных ORF. Таким образом, рекомбинантный слитый белок представляет собой отдельный белок, содержащий два или более сегментов, которые соответствуют полипептидам, кодируемым исходными ORF (причем указанные сегменты в природе обычно не присоединены таким образом). Хотя рамка считывания, полученная таким образом, является непрерывной на протяжении всех слитых сегментов, сегменты могут быть физически или пространственно разделены, например, линкерной последовательностью, находящейся в рамках считывания. Например, полинуклеотиды, кодирующие CDR варибельной области иммуноглобулина, могут быть слитыми в рамке считывания, но разделенными полинуклеотидом, кодирующим по меньшей мере одну каркасную область иммуноглобулина или дополнительные области CDR, при условии, что "слитые" CDR транслируются совместно в качестве части непрерывного полипептида.

Термин "экспрессия" в настоящей заявке означает процесс, посредством которого с гена продуцируется биохимическое соединение, например, РНК или полипептид. Данный процесс включает любое проявление функционального присутствия гена в клетке, включая, без ограничения, нокдаун гена, а также временную экспрессию и стабильную экспрессию. Данный процесс включает, без ограничения, транскрипцию гена в матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК), малую шпилечную РНК (мшРНК), малую интерферирующую РНК (миРНК) или любой другой РНК-продукт и трансляцию мРНК в полипептид или полипептиды. Если конечным целевым продуктом является биохимическое соединение, экспрессия включает создание данного биохимического соединения и любых предшественников. В результате экспрессии гена образуется "продукт гена". В настоящей заявке продукт гена может представлять собой нуклеиновую кислоту, например, матричную РНК, полученную посредством транскрипции гена, или полипептид, который был транслирован с транскрипта. Продукты генов, описанные в настоящей заявке, также включают нуклеиновые кислоты с посттранскрипционными модификациями, например, полиаденилированием, или полипептиды с посттрансляционными модификациями, например, метилированием, гликозилированием, присоединением липидов, объединением с другими субъединицами белка, протеолитическим расщеплением и т.п.

В настоящей заявке термин "образец" означает любой биологический материал, полученный от субъекта или пациента. Согласно одному аспекту образец может содержать кровь, перитонеальную жидкость, СМЖ, слюну или мочу. Согласно другим аспектам образец может содержать цельную кровь, плазму крови, сыворотку крови, В-клетки, обогащенные из образцов крови, и культивируемые клетки (например, В-клетки от субъекта). Образец может также включать биопсию или образец ткани, в том числе нервную ткань. Согласно третьим аспектам образец может содержать целые клетки и/или лизат клеток. Образцы крови могут быть отобраны способами, известными в данной области техники. Согласно одному аспекту осадок после центрифугирования можно ресуспендировать посредством перемешивания на вортексе при температуре 4°C в 200 мкл буфера (20 mM Tris, pH 7,5, 0,5% Nonidet, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (фенилметилсульфонил фторид), 0,1 M NaCl, ингибитор протеазы IX Sigma Protease Inhibitor и ингибиторы фосфатазы IX Sigma Phosphatase Inhibitors 1 и 2). Суспензию можно выдерживать на льду в течение 20 мин. с периодическим перемешиванием на вортексе. После центрифугирования при 15000 g в течение 5 мин. при температуре приблизительно 4°C аликвоты супернатанта можно хранить при температуре приблизительно -70°C.

### **Заболевания**

Если не указано обратное, термины "нарушение" и "заболевание", которые используются в настоящей заявке взаимозаменяемо, включают любое нежелательное физиологическое изменение у субъекта, животного, выделенного органа, ткани или клетки/культуры клеток.

Транстиретиновый (ТТР) амилоидоз представляет собой патофизиологический механизм, наблюдаемый при многих различных заболеваниях, которые характеризуются аномальным отложением белка ТТР в различных тканях в результате структурного (т.е. конформационного) изменения белка ТТР. Неправильно свернутый и неправильно собранный белок ТТР является токсичным и часто образуется в результате мутаций в гене ТТР. Токсичность неправильно свернутого ТТР приводит к локальным повреждениям ткани, которые при накоплении в течение времени могут привести к дисфункции органа и даже к недостаточности органа. Существует множество типов тканей и органов, восприимчивых к ТТР амилоидозу, таких как периферическая и автономная нервная система, сердце, мягкая и паутинная оболочки мозга (или лептоменинге), глаза, сухожилия, связки или почки. Широкий диапазон тканей, которые могут быть поражены ТТР амилоидозом, является причиной разнообразия симптомов, которые испытывают пациенты с ТТР амилоидозом. Фактически, пациентов с ТТР амилоидозом клинически относят к

страдающим от различных заболеваний, в зависимости от ткани или органа, наиболее пораженного ТТР амилоидозом, и соответствующих симптомов.

На этом основании ТТР амилоидоз подразделяют на нейропатическую форму, при которой главным образом поражены периферическая и автономная нервная система, и пациенты испытывают преимущественно боль, парестезию, мышечную слабость и вегетативную дисфункцию. Существует также кардиальная форма ТТР амилоидоза, при которой главным образом поражено сердце, и у пациентов наблюдаются преимущественно ортостатическая гипо- или гипертензия, аритмия и кардиомегалия. Данные две формы не являются взаимоисключающими, и у многих пациентов обнаруживают комбинацию обеих форм. Когда ТТР амилоидоз поражает другие ткани, данное заболевание может привести к помутнению стекловидного тела, сухому глазу или глаукоме, протеинурии, гипертироксинемии, синдрому запястного канала или предэкземпсии.

Вследствие этого согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению, связывающие молекулы, которые характеризуются по существу такой же специфичностью связывания, как и любое из указанных антител, полинуклеотиды, векторы, клетки и/или пептиды согласно настоящему изобретению используют для получения фармацевтической или диагностической композиции для профилактического и/или терапевтического лечения заболеваний ТТР амилоидоза, для контроля прогрессирования заболевания и/или ответа на лечение, а также для диагностики заболеваний, связанных с ТТР амилоидозом, включая семейную амилоидную полинейропатию (САП), семейную амилоидную кардиомиопатию (САК), старческий системный амилоидоз (ССА), лептоменингеальный амилоидоз/ амилоидоз центральной нервной системы (ЦНС), в том числе болезнь Альцгеймера, амилоидоз глаз, амилоидоз почек, гипертироксинемия, синдром запястного канала, разрывы роторной манжеты и стеноз позвоночного канала поясничного отдела и предэкземпсию.

#### **Лечение**

В настоящей заявке термины "лечить" или "лечение" означают как терапевтическое лечение, так и профилактические или превентивные меры, целью которых является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или нарушения, такого как развитие дефекта сердца. Полезные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничены указанными, смягчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, отсрочивание или замедление прогрессирования заболевания, смягчение или временное облегчение состояния заболевания и ремиссию (будь то частичную или полную), обнаруживаемые либо необнаруживаемые. "Лечение" может также означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в случае отсутствия лечения. Лица, нуждающиеся в лечении, включают лиц, которые уже страдают от состояния или нарушения, а также лиц, предрасположенных к состоянию или нарушению, или лиц, у которых манифестацию состояния или нарушения необходимо предотвратить.

Если не указано обратное, термины "лекарственный препарат", "медицинский препарат" или "медикамент" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и включают, но не ограничены указанными, все (А) изделия, лекарственные средства и препараты для внутреннего или наружного применения и любые вещества или смеси веществ, предназначенных для применения для диагностики, излечения, смягчения последствий, лечения или предотвращения заболевания человека или других животных; и (В) изделия, лекарственные средства и препараты (отличные от пищи), предназначенные для оказания влияния на структуру или любую функцию организма человека или других животных; и (С) изделия, предназначенные для применения в качестве компонента любого изделия, указанного в пп. (А) и (В). Термин "лекарственный препарат", "медицинский препарат" или "медикамент" должен включать полную формулу препарата, предназначенного для применения у человека или других животных, содержащего одно или несколько "средств", "соединений", "веществ" или "(химических) композиций" и в ином контексте также других фармацевтически неактивных вспомогательных веществ, таких как наполнители, разрыхлители, смазывающие вещества, вещества, способствующие скольжению, связывающие вещества или вещества, обеспечивающие облегченный перенос, распадаемость, разложение, растворение и биологическую доступность "лекарственного препарата", "медицинского препарата" или "медикамента" в предназначенном целевом участке в пределах организма человека или других животных, например, на коже, в желудке или кишечнике. Термины "средство", "соединение" или "вещество" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и включают, в более конкретном смысле, но не ограничены указанными, все фармакологически активные средства, т.е. средства, вызывающие желаемый биологический или фармакологический эффект, или средства, которые изучают или исследуют для определения способности вызывать такой возможный фармакологический эффект посредством способов согласно настоящему изобретению.

Под "субъектом" или "индивидуумом" или "животным", или "пациентом", или "млекопитающим" подразумевают любого субъекта, в частности, млекопитающего субъекта, например, пациента-человека, для которого являются желательными диагностика, прогнозирование, предотвращение или терапия.

#### **Фармацевтические носители**

Фармацевтически приемлемые носители и пути введения можно почерпнуть из соответствующей

литературы, известной специалистам в данной области техники. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены в состав в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники; см., например, руководства Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472, Vaccine Protocols 2nd Edition by Robinson et al., Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2003; Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. 2nd Edition by Taylor and Francis. (2006), ISBN: 0-8493-1630-8. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают фосфатные буферные солевые растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих средств, стерильные растворы и т.д. Композиции, содержащие такие носители, могут быть приготовлены в состав посредством хорошо известных общепринятых способов. Данные фармацевтические композиции можно вводить субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций можно осуществлять различными путями. Примеры включают введение композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, посредством перорального, интраназального, ректального, местного, интраперитонеального, внутривенного, внутримышечного, подкожного, субдермального, трансдермального, интратекального и внутривисцерального способов. Составы на основе аэрозолей, такие как составы назального спрея, включают очищенные водные или другие растворы активного средства с консервирующими средствами и изотоническими средствами. Такие составы предпочтительно доводят до значения pH и изотонического состояния, совместимого со слизистой оболочкой полости носа. Фармацевтические композиции для перорального введения, такие как молекулы однодоменного антигена (например, "нанотела<sup>TM</sup>") и т.д., также предусмотрены в настоящем изобретении. Такие пероральные составы могут находиться в форме таблетки, капсулы, порошка, жидкости или в полутвердой форме. Таблетка может содержать твердый носитель, такой как желатин или вспомогательное средство. Составы для ректального или вагинального введения могут быть предложены в виде суппозитория с подходящим носителем; см. также публикацию O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2(9) (2003), 727-735. Дополнительные указания относительно составов, подходящих для различных типов введения, можно найти в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985) и в соответствующих обновлениях. Обзор способов доставки лекарственного препарата см. в публикации Langer, Science 249 (1990), 1527-1533.

## II. Антигена согласно настоящему изобретению

Настоящее изобретение, как правило, относится к антигенам против ТТР, полученным от человека, и антигенсвязывающим фрагментам указанных антигенов, которые предпочтительно демонстрируют иммунологические характеристики связывания и/или биологические свойства, описанные для антигенов, проиллюстрированных в примерах. В соответствии с настоящим изобретением моноклональные антигена человека, специфичные к ТТР, клонировали из пула здоровых субъектов-людей. Однако согласно другому варианту реализации настоящего изобретения моноклональные антигена человека против ТТР можно также клонировать от пациентов, у которых наблюдаются симптомы заболеваний и/или нарушений, связанных с ТТР амилоидозом.

В ходе экспериментов, проводимых в соответствии с настоящим изобретением, оценивали способность антигенов, присутствующих в кондиционной среде культивируемых В-клеток памяти человека, связываться с ТТР и с более 10 другими белками, включая бычий сывороточный альбумин (БСА). Только супернатанты В-клеток, способные при скрининге к связыванию с белком ТТР, но ни с любым из других белков, были отобраны для последующего анализа, включая определение класса антигена и подкласса легкой цепи. Выбранные В-клетки затем использовали для клонирования антигена.

Вкратце, данное клонирование заключалось в выделении из выбранных В-клеток матричной РНК, обратной транскрипции методом ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией), амплификации областей, кодирующих антигена, методом ПЦР, клонировании в плазмидные векторы и секвенировании. Затем выбранные антигена человека получали посредством рекомбинантной экспрессии в клетках НЕК293 или СНО и очистки, после чего характеризовали антигена для определения способности связываться с белком ТТР человека. Применение комбинации различных тестов, например, рекомбинантной экспрессии антигена в клетках НЕК293 или СНО и последующей характеристики специфичности связывания антигенов в отношении белка ТТР человека и характерного связывания антигенов с патологически неправильно свернутыми, неправильно собранными и/или агрегированными формами ТТР, подтвердило, что впервые были клонированы антигена человека, которые являются высокоспецифичными в отношении ТТР и определенно распознают и селективно связываются с патологически агрегированными формами белка ТТР, такими как фибриллы ТТР. В некоторых случаях также были получены химерные антигена мыши на основе варибельного домена антигена человека согласно настоящему изобретению. Данные химерные антигена мыши продемонстрировали эквивалентную аффинность связывания, специфичность и селективность в отношении ТТР человека, как и антигена человека, как представлено на фиг. 6 и 9 и в примерах 4 и 8.

Таким образом, настоящее изобретение, в целом, относится к рекомбинантным моноклональным антигенам против ТТР, полученным от человека, и связывающим фрагментам, производным и вариантам указанных антигенов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антигена способно к

связыванию с ТТР человека.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение направлено на антитело против ТТР или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела, причем указанное антитело специфично связывается с тем же эпитопом ТТР, что и эталонное антитело, выбранное из группы, включающей NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1 и NI-301.12D3. Картирование эпитопов позволило обнаружить последовательность в пределах ТТР человека, содержащую аминокислоты 61-EEEFVEGIY-69 (SEQ ID NO: 49), в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-301.59F1 согласно настоящему изобретению, последовательность в пределах ТТР человека, содержащую аминокислоты 53-GELHGLTTEEE-63 (SEQ ID NO: 50), в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-301.35G11 согласно настоящему изобретению, последовательность в пределах ТТР человека, содержащую аминокислоты 41-WEPFA-45 (SEQ ID NO: 51), в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом NI-301.37F1 (см. фиг. 10 и пример 9). Вследствие этого, согласно одному варианту реализации предложено антитело согласно настоящему изобретению, причем указанное антитело специфично связывается с эпитопом ТТР, который содержит аминокислотную последовательность EEEFVEGIY (SEQ ID NO: 49), GELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 50) или WEPFA (SEQ ID NO: 51).

В данном контексте, как поясняется в примере 9, эпитопы связывания иллюстративных антител NI-301.59F1, NI301.35G11 и NI-301.37F1 были проанализированы с применением панели из 29 последовательных пептидов длиной 15 аминокислот и с перекрытием в 11 аминокислот (т.е. первый пептид ТТР<sub>AK1-15</sub>; второй пептид ТТР<sub>AK5-19</sub>; и т.д.), причем антитела NI-301.59F1 и 301.35G11 распознают два перекрывающихся пептида (15 и 16) и (13 и 14), соответственно, и антитело NI 301.37F1 распознает три перекрывающихся пептида (9, 10 и 11); см. пример 9 и фиг. 10.

Таким образом, в отношении аминокислотной последовательности зрелого полипептида ТТР и соответствующего пептидного картирования, это означает, что антитело NI-301.59F1, связавшееся с эпитопом EEEFVEGIY (SEQ ID NO: 49), способно распознавать пептиды, содержащие аминокислотную последовательность GLTTEEEFVEGIYKY (SEQ ID NO: 85) и EEEFVEGIYKVEIDT (SEQ ID NO: 86).

Аналогично, антитело против ТТР NI-301.35G11, связавшееся с эпитопом GELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 50), способно распознавать пептиды, содержащие аминокислотную последовательность ISESGELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 87) и GELHGLTTEEEFVEG (SEQ ID NO: 88).

Аналогично, антитело против ТТР NI-301.37F1, которое связывается с эпитопом WEPFA (SEQ ID NO: 51), способно распознавать пептиды с аминокислотной последовательностью FRKAADDIWEPPASG (SEQ ID NO: 89), ADDIWEPPASGKTSE (SEQ ID NO: 90) и WEPPASGKTSESGEL (SEQ ID NO: 91).

Таким образом, антитела, заявленные в настоящем изобретении, проиллюстрированные в примерах, отличаются от антител, которые распознают любой из указанных эпитопов, исключительно в контексте дополнительных N- и/или C-концевых аминокислот. Вследствие этого, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения специфичное связывание антитела против ТТР с эпитопом ТТР, который содержит аминокислотную последовательность EEEFVEGIY (SEQ ID NO: 49), GELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 50) или WEPFA (SEQ ID NO: 51), определяют с последовательными пептидами длиной 15 аминокислот и перекрытием в 11 аминокислот в соответствии с примером 9 и фиг. 10A-D.

В данном контексте было проведено обширное картирование эпитопов в соответствии с настоящим изобретением, результаты которого описаны в примере 9, с применением панели из 151 последовательных пептидов длиной 15 аминокислот и с перекрытием в 14 аминокислот, причем в каждом пептиде аминокислоту в положении 10 заменяли аланином в случае аминокислот, отличных от аланина, тогда как аланины заменяли глицином или пролином. Данный эксперимент позволил выяснить, что антитело NI-301.59F1 связывается с эпитопом EEFXEGIY (ТТР<sub>AK62-69</sub>), и антитело NI-301.35G11 связывается с ELXGLTXE (ТТР<sub>AK54-61</sub>), при этом для эпитопа антитела NI-301.37F1 ни одно дополнительное требование к последовательности определено не было. Соответственно, согласно другому варианту реализации настоящего изобретения определение того, будет ли данное антитело связываться с тем же эпитопом, что и антитела NI-301.59F1, NI301.35G11 и NI-301.37F1, осуществляют согласно примеру 9 и фиг. 10E-H.

Разумеется, что картирование эпитопов и определение того, будет ли данное антитело связываться с тем же эпитопом, что и заявленное антитело, использованное в примере 9 и представленное на фиг. 10, можно также применять к любому другому антителу против ТТР согласно настоящему изобретению, описанному в примерах, с вариативной областью, изображенной на фиг. 1A-1T.

Соответственно, настоящее изобретение, в целом, относится к любому антителу против ТТР и антитело-подобной молекуле, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело, проиллюстрированное в примерах, и которые содержат по меньшей мере CDR и/или вариативные области тяжелой и легкой цепей, изображенные на любой из фиг. 1A-1T.

Согласно следующему варианту реализации антитело специфично связывается с аминокислотной последовательностью GELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 50), но не с GELHGPTTEEE, соответствующей мутантному эпитопу ТТР-L55P, или антитело специфично связывается с аминокислотной последовательностью WEPFA (SEQ ID NO: 51), но не с WGPFA, соответствующей мутантному эпитопу ТТР-E42G.



Более того, не опираясь на исходные экспериментальные наблюдения, продемонстрированные в примерах 3-8 и представленные на фиг. 2, 3, 4, 7 и 9, моноклональные антитела человека NI-301.59F1, NI-301.35G11 и NI-301.37F1 против ТТР согласно настоящему изобретению предпочтительно характеризуются специфичным связыванием с патологическим неправильно свернутым, неправильно собранным или агрегированным ТТР и по существу не распознают ТТР в физиологической форме. Следовательно, в настоящем изобретении предложен набор антител человека против ТТР со свойствам связывания, в особенности подходящими для диагностической и терапевтической целей. Таким образом, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложены антитела, способные специфично связываться с патологически агрегированными формами ТТР.

Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению демонстрирует свойства связывания иллюстративных антител NI-301.59F1, NI-301.35G11 и NI-301.37F1, описанных в примерах. Антитело против ТТР согласно настоящему изобретению предпочтительно распознает патологически измененный ТТР, такой как мутантные, неправильно свернутые, неправильно собранные или агрегированные формы ТТР и фрагменты указанных форм вместо физиологического ТТР. Таким образом, согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению по существу не распознает физиологические формы ТТР.

Термин "по существу не распознавать" при использовании в настоящей заявке для описания аффинности связывания молекулы группы, включающей антитело, фрагмент антитела или связывающую молекулу, в отношении конкретной молекулы-мишени, антигена и/или конформации молекулы-мишени и/или антигена означает, что молекула вышеупомянутой группы связывается с указанной молекулой, антигеном и/или конформацией с аффинностью связывания, которая по меньшей мере в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз или в 9 раз ниже аффинности связывания с молекулой вышеупомянутой группы при связывании с другой молекулой, антигеном и/или конформацией. Очень часто в качестве показателя аффинности связывания используют константу диссоциации (KD). Иногда в специфичном анализе, таком как, например, анализ ELISA, в качестве показателя аффинности связывания используют EC50. Предпочтительно термин "по существу не распознавать" при использовании в настоящей заявке означает, что молекула вышеупомянутой группы связывается с указанной молекулой, антигеном и/или конформацией с аффинностью связывания, по меньшей мере или в 10 раз, в 20 раз, в 50 раз, в 100 раз, в 1000 раз или в 10000 раз меньшей, чем аффинность связывания указанной молекулы вышеупомянутой группы в отношении связывания с другой молекулой, антигеном и/или конформацией.

Кроме того или в качестве альтернативы, антитело против ТТР согласно настоящему изобретению связывается с вызывающими заболевание неправильно свернутыми, неправильно собранными или агрегированными формами ТТР человека. В данном контексте аффинности связывания могут находиться в диапазоне, который был продемонстрирован для иллюстративных антител NI-301.59F1, NI-301.35G11 и NI-301.37F1 на фиг. 2, соответствующей фиг. 10, т.е. половина максимальной эффективной концентрации (EC50) для которых составляет приблизительно от 1 пМ до 500 нМ, предпочтительно, EC50 составляет приблизительно от 50 пМ до 100 нМ, наиболее предпочтительно EC50 составляет приблизительно от 1 нМ до 20 нМ для агрегированного ТТР человека и агрегированного рекомбинантного ТТР, как показано для NI-301.59F1 и NI-301.35G11, или EC50 составляет приблизительно от 100 пМ до 1 нМ для агрегированного ТТР человека и агрегированного рекомбинантного ТТР, как показано для NI-301.37F1.

В частности, антитело против ТТР, связывающий фрагмент или производное указанного антитела характеризуется аффинностью связывания, соответствующей значению  $EC50 \leq 5$  нМ для связывания агрегированного ТТР дикого типа и/или  $EC50 \leq 20$  нМ, предпочтительно  $\leq 10$  нМ и наиболее предпочтительно  $\leq 1$  нМ для связывания агрегированного V30M-ТТР; см. пример 3 и фиг. 2.

Некоторые антитела способны к связыванию с широким массивом биомолекул, например, белков. Как понимает специалист в данной области техники, термин "специфичный" используют в настоящей заявке для обозначения того, что другие биомолекулы, отличные от белков ТТР либо фрагментов указанных белков, по существу не связываются с антигенсвязывающей молекулой, например, с одним из антител согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, уровень связывания с биомолекулой, отличной от ТТР, приводит к аффинности связывания, которая составляет всего лишь не более 20% или менее, 10% или менее, всего лишь 5% или менее, всего лишь 2% или менее или всего лишь 1% или менее (т.е. является по меньшей мере в 5, 10, 20, 50 или в 100 раз ниже, или в любое количество раз ниже, помимо указанных) от аффинности в отношении ТТР, соответственно; см. например, фиг. 2.

Согласно одному варианту реализации антитело против ТТР согласно настоящему изобретению предпочтительно связывается с агрегированными формами ТТР, неправильно свернутым ТТР, неправильно собранным ТТР и/или фрагментами, производными, фибриллами и/или олигомерами указанных форм. Согласно другому варианту реализации антитело против ТТР согласно настоящему изобретению предпочтительно связывается с нативным ТТР и патологически неправильно свернутыми, неправильно собранными или агрегированными формами ТТР.

Как было указано ранее, аморфные и амилоидные отложения ТТР могут привести к различным заболеваниям в зависимости от того, где в организме возникают неправильно свернутые, неправильно соб-

ранные и/или агрегированные формы ТТР либо фрагменты указанных форм. Например, у пациентов, страдающих от семейной амилоидной полинейропатии (САП), отложения ТТР наблюдаются преимущественно в нервных волокнах малого диаметра, и вследствие этого наблюдаются преимущественно симптомы, такие как измененная сенсорная чувствительность и автономные дисфункции, включая желудочно-кишечные дисфункции или импотенцию; у пациентов, страдающих от семейной амилоидной кардиомиопатии (САК) или старческого системного амилоидоза (ССА), отложения ТТР расположены преимущественно в сердце, и вследствие этого наблюдаются симптомы, такие как сердечная недостаточность или сердечная аритмия; у пациентов с отложениями ТТР в почках может наблюдаться почечная дисфункция и протеинурия.

Вследствие этого, согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению подходит для лечения семейной амилоидной полинейропатии (САП), семейной амилоидной кардиомиопатии (САК), старческого системного амилоидоза (ССА), системного семейного амилоидоза, лептоменингеального амилоидоза/ амилоидоза центральной нервной системы (ЦНС), в том числе болезни Альцгеймера, амилоидоза глаза, амилоидоза почек, гипертироксинемии, амилоидоза связок, включая синдром запястного канала, разрывы ротаторной манжеты и стеноз позвоночного канала поясничного отдела, и предэкламсии, а также симптомов указанных заболеваний.

Настоящее изобретение также направлено на антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное антитела, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающий домен, идентичный таковому антитела, выбранного из группы, включающей NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1, NI-301.2F5, NI-301.28B3, NI-301.119C12, NI-301.5D8, NI-301.9D5, NI-301.104F5, NI-301.21F10, NI-301.9G12, NI-301.12D3, NI-301.44E4, NI-301.18C4, NI-301.11A10, NI-301.3C9, NI-301.14D8, NI-301.9X4 и NI-301.14C3.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрирует некоторые связывающие молекулы, например, антитела и связывающие фрагменты указанных антител, которые могут характеризоваться присутствием в вариательной области указанных молекул, например, в связывающем домене, по меньшей мере одной области, определяющей комплементарность (CDR), вариательной области  $V_H$  и/или  $V_L$ , содержащей любую из аминокислотных последовательностей, представленных на фиг. 1. Соответствующие нуклеотидные последовательности, кодирующие вышеуказанные вариательные области, представлены в табл. II ниже. Иллюстративные группы CDR вышеуказанных аминокислотных последовательностей областей  $V_H$  и/или  $V_L$  представлены на фиг. 1. Однако, как обсуждается ниже, специалисту в данной области техники хорошо известно, что дополнительно или в качестве альтернативы можно использовать CDR, которые отличаются по аминокислотной последовательности от таковых, изложенных на фиг. 1, одной, двумя, тремя или даже более аминокислотами в случае CDR2 и CDR3. Вследствие этого, согласно одному варианту реализации предложено антитело согласно настоящему изобретению или ТТР-связывающий фрагмент указанного антитела, содержащее в своей вариательной области по меньшей мере одну область, определяющую комплементарность (CDR), как представлено на фиг. 1, и/или одну или несколько указанных CDR, содержащих одну или несколько замен аминокислот.

Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению представляет собой любое из антител, содержащих аминокислотную последовательность области  $V_H$  и/или  $V_L$ , как представлено на фиг. 1, или указанные области  $V_H$  и/или  $V_L$ , содержащие одну или несколько замен аминокислот. Предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению характеризуется сохранением родственного спаривания тяжелой и легкой цепей, которое присутствовало в В-клетке человека.

Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения антитело против ТТР, ТТР-связывающий фрагмент, синтетический или биотехнологический вариант указанного антитела можно оптимизировать для получения соответствующей аффинности связывания с мишенью и фармакокинетических свойств. Вследствие этого, по меньшей мере одну аминокислоту в CDR или вариательной области, которая имеет тенденцию к модификациям, выбранным из группы, включающей гликозилирование, окисление, дезаминирование, расщепление пептидной связи, образование изоаспартата и/или неспаренный цистеин, замещают мутантной аминокислотой, в которой отсутствует такое изменение, или причем по меньшей мере одна углеводная группа удалена или добавлена к антителу химическим или ферментативным способом. Примеры методик оптимизации аминокислоты можно найти, например, в международных заявках WO 2010/121140 и WO 2012/049570. Дополнительные модификации, оптимизирующие свойства антител, описаны в публикациях Gavel et al., *Protein Engineering* 3 (1990), 433-442 и Helenius et al., *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004), 1019-1049.

В качестве альтернативы, антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, производное или вариант указанного антитела, которое конкурирует за связывание с ТТР с по меньшей мере одним из антител, содержащих область  $V_H$  и/или  $V_L$ , представленную на одной из фиг. 1А-Т.

Результаты экспериментов, представленные на фиг. 2 и в примере 3, свидетельствуют, что некоторые из антител против ТТР согласно настоящему изобретению предпочтительно связываются с вызывающими заболевание неправильно свернутыми, неправильно собранными или агрегированными формами ТТР человека в отличие от физиологических форм белков. Таким образом, согласно одному вари-

анту реализации антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно распознает неправильно свернутый, неправильно собранный и/или агрегированный ТТР и/или фрагмент и/или производное ТТР по сравнению с физиологическим ТТР.

Антитело согласно настоящему изобретению может представлять собой антитело человека, в частности, для терапевтического применения. В качестве альтернативы, антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело грызуна, родентизированное или химерное антитело грызуна - антитело человека, предпочтительно, антитело мыши, муринизированное или химерное антитело мыши - антитело человека или антитело крысы, ратинизированное или химерное антитело крысы - антитело человека, которое является в особенности подходящим для диагностических способов и проведения исследований на животных. Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению представляет собой химерное антитело грызуна - антитело человека или родентизированное антитело.

Более того, согласно одному варианту реализации химерное антитело согласно настоящему изобретению, т.е. содержащее переменные домены антитела человека, например NI-301.35G11, и генерические константные домены легкой и тяжелой цепей мыши, демонстрирует свойства связывания иллюстративных химерных антител мыши NI-301.mur35G11, как описано в примерах. Также химерные антитела мыши согласно настоящему изобретению связываются с большей аффинностью с ТТР человека, как описано в примерах 4 и 8. Предпочтительно аффинность связывания химерных антител подобна аффинности связывания аналогичных антител человека.

Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению получают с применением культур отдельных или олигоклональных В-клеток, которые культивируют, и супернатант культуры, содержащий антитела, полученные посредством указанных В-клеток, подвергают скринингу для определения присутствия и аффинности антител против ТТР в указанном супернатанте. Процесс скрининга включает скрининг для определения связывания с нативными мономерными, фибриллярными или нефибриллярными агрегатами наподобие олигомеров чТТР, полученных из синтетического полно-размерного пептида чТТР, или, например, очищенных из плазмы человека или полученных в результате рекомбинантной экспрессии.

Кроме того или в качестве альтернативы, процесс скрининга для определения присутствия и аффинности антител против ТТР может включать этапы чувствительного анализа иммунореактивности амилоидных бляшек в ткани (tissue amyloid plaque immunoreactivity, TAPIR), такого, как описано в международной заявке WO 2004/095031, содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки. Более того или в качестве альтернативы, можно проводить скрининг для определения связывания с антителами против ТТР на гистологических срезах почек, сердца, например, как аналогично описано в международной заявке WO 2008/081008 для срезов головного мозга и спинного мозга.

Как было упомянуто выше, в связи с образованием в результате иммунного ответа человека, моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению будет распознавать эпителии, которые характеризуются особенной патологической значимостью и которые могут быть не доступными или менее иммуногенными в случае процессов иммунизации для получения, например, моноклональных антител мыши и скрининга библиотек фагового дисплея *in vitro*, соответственно. Соответственно, логично предположить, что эпителий антитела человека против ТТР согласно настоящему изобретению является уникальным, и никакое другое антитело, которое способно к связыванию с эпителием, распознаваемым моноклональным антителом человека согласно настоящему изобретению, не существует; см. также фиг. 10. Дополнительным свидетельством уникальности антител согласно настоящему изобретению является то, что, как указано в примере 8, антитела NI-301.59F1, NI-301.35G11 и NI-301.37F1 согласно настоящему изобретению связываются с эпитопами, специфичными для неправильно свернутой, неправильно собранной и/или агрегированной конформации ТТР, которые, как указано выше, обладают особенной патологической значимостью, и указанные антитела могут не являться получаемыми в результате обычных процессов получения антител, таких как иммунизация или скрининг библиотек *in vitro*.

Вследствие этого, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение также включает, в целом, антитела против ТТР и ТТР-связывающие молекулы, которые конкурируют с моноклональным антителом человека согласно настоящему изобретению за специфичное связывание с ТТР. Настоящее изобретение более конкретно направлено на антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела, причем указанное антитело специфично связывается с тем же эпитопом ТТР, что и эталонное антитело, выбранное из группы, включающей NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1 и/или NI-301.12D3.

Более того, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение также включает, в общем виде, антитела против ТТР и ТТР-связывающие молекулы, которые конкурируют с моноклональным антителом человека согласно настоящему изобретению за специфичное связывание с неправильно свернутыми, неправильно собранными и/или агрегированными формами ТТР либо фрагментами указанных форм. Вследствие этого настоящее изобретение более конкретно также направлено на антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела, причем указанное антитело специфично связывается с тем же эпитопом неправильно свернутых, неправильно собранных или агре-

гированных форм ТТР либо фрагментов указанных форм, что и эталонное антитело, выбранное из группы, включающей NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1 и/или NI-301.12D3.

Конкуренцию между антителами определяют посредством анализа, в котором исследуемый иммуноглобулин ингибирует специфичное связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как ТТР. Известно множество типов анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой ферментный анализ (ИФА), конкурентный "сэндвич"-анализ; см. публикацию Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; твердофазный прямой ИФА на основе биотина-авидина; см. публикации Kirkland et al., *J. Immunol.* 137 (1986), 3614-3619 и Cheung et al., *Virology* 176 (1990), 546-552; твердофазный прямой анализ с использованием метки, твердофазный прямой "сэндвич"-анализ с использованием метки; см. руководство Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); твердофазный прямой РИА с использованием метки  $I^{125}$ ; см. публикации Morel et al., *Molec. Immunol.* 25 (1988), 7-15 и Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32 (1990), 77-82. Как правило, такой анализ включает применение очищенного ТТР или неправильно свернутого, неправильно собранного или агрегированного ТТР, такого как олигомеры и/или фибриллы ТТР, присоединенные к твердой поверхности, или клеток, несущих немеченный исследуемый иммуноглобулин либо меченный эталонный иммуноглобулин, т.е. моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению. Конкурентное ингибирование измеряют посредством определения количества метки, связанной с твердой поверхностью, или клеток в присутствии исследуемого иммуноглобулина. Обычно исследуемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Предпочтительно, анализ конкурентного связывания проводят в условиях, описанных для анализа ELISA в прилагаемых примерах. Антитела, обнаруженные посредством конкурентного анализа (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся с прилежащим эпитопом, по существу проксимальным относительно эпитопа, связываемого эталонным антителом, для возникновения стерического несоответствия. Обычно, когда конкурирующее антитело присутствует в избытке, данное антитело будет ингибировать специфичное связывание эталонного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50 или 75%. Следовательно, настоящее изобретение также направлено на антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела, причем указанное антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела, выбранного из группы, включающей NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1, NI-305.2F5, NI-301.28B3, NI-301.119C12, NI-301.5D8, NI-301.9D5, NI-301.104F5, NI-301.21F10, NI-301.9G12, NI-301.12D3, NI-301.44E4, NI-301.18C4 NI-301.11A10, NI-301.3C9, NI-301.14D8, NI-301.9X4 и/или NI-301.14C3, с ТТР.

Кроме того, настоящее изобретение также направлено на антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела, причем указанное антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела, выбранного из группы, включающей NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1, NI-305.2F5, NI-301.28B3, NI-301.119C12, NI-301.5D8, NI-301.9D5, NI-301.104F5, NI-301.21F10, NI-301.9G12, NI-301.12D3, NI-301.44E4 NI-301.18C4, NI-301.11A10, NI-301.3C9, NI-301.14D8, NI-301.9X4 и/или NI-301.14C3, с неправильно свернутыми, неправильно собранными или агрегированными формами ТТР либо фрагментами указанных форм.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из вариательной области тяжелой цепи иммуноглобулина ( $V_H$ ), причем по меньшей мере одна из  $V_H$ -CDR вариательной области тяжелой цепи или по меньшей мере две из  $V_H$ -CDR вариательной области тяжелой цепи являются по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% идентичными аминокислотной последовательности  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2 или  $V_H$ -CDR3 эталонной тяжелой цепи антител, раскрытых в настоящей заявке. В качестве альтернативы, области  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2 и  $V_H$ -CDR3  $V_H$  являются по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% идентичными аминокислотной последовательности  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2 и  $V_H$ -CDR3 эталонной тяжелой цепи антител, раскрытых в настоящей заявке. Таким образом, в соответствии с данным вариантом реализации вариательная область тяжелой цепи согласно настоящему изобретению содержит полипептидные последовательности  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2 и  $V_H$ -CDR3, близкие к группам, показанным на фиг. 1 соответственно. В то время как на фиг. 1 представлены  $V_H$ -CDR, определенные согласно системе Кэбота, другие определения CDR, например,  $V_H$ -CDR, определенные согласно системе Чотия, также включены в настоящее изобретение и могут быть легко идентифицированы средним специалистом в данной области техники с использованием данных, представленных на фиг. 1.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из вариательной области тяжелой цепи иммуноглобулина ( $V_H$ ), в которой области  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2 и  $V_H$ -CDR3 содержат полипептидные последовательности, идентичные группам  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2 и  $V_H$ -CDR3, показанным на фиг. 1 соответственно.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из вариательной области тяжелой цепи иммуноглобулина ( $V_H$ ), в которой области  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2 и  $V_H$ -CDR3 содержат полипептидные последо-

вательности, идентичные группам  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2 и  $V_H$ -CDR3, показанным на фиг. 1 соответственно, за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти или шести замен аминокислот в любой  $V_H$ -CDR. Согласно определенным вариантам реализации замены аминокислот являются консервативными.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина ( $V_L$ ), причем по меньшей мере одна из  $V_L$ -CDR вариабельной области легкой цепи или по меньшей мере две из  $V_L$ -CDR вариабельной области легкой цепи являются по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% идентичными аминокислотной последовательности  $V_L$ -CDR1,  $V_L$ -CDR2 или  $V_L$ -CDR3 эталонной легкой цепи антител, раскрытых в настоящей заявке. В качестве альтернативы, области  $V_L$ -CDR1,  $V_L$ -CDR2 и  $V_L$ -CDR3  $V_L$  являются по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% идентичными аминокислотной последовательности  $V_L$ -CDR1,  $V_L$ -CDR2 и  $V_L$ -CDR3 эталонной легкой цепи антител, раскрытых в настоящей заявке. Таким образом, в соответствии с данным вариантом реализации вариабельная область легкой цепи согласно настоящему изобретению содержит полипептидные последовательности  $V_L$ -CDR1,  $V_L$ -CDR2 и  $V_L$ -CDR3, близкие к полипептидам, представленным на фиг. 1, соответственно. В то время как на фиг. 1 представлены  $V_L$ -CDR, определенные согласно системе Кэбота, другие определения CDR, например,  $V_L$ -CDR, определенные согласно системе Чотия, также включены в настоящее изобретение.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина ( $V_L$ ), в которой области  $V_L$ -CDR1,  $V_L$ -CDR2 и  $V_L$ -CDR3 содержат полипептидные последовательности, идентичные группам  $V_L$ -CDR1,  $V_L$ -CDR2 и  $V_L$ -CDR3, показанным на фиг. 1, соответственно.

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

Иммуноглобулин или кДНК, кодирующую иммуноглобулин, можно дополнительно модифицировать. Таким образом, согласно следующему варианту реализации способ согласно настоящему изобретению включает любой из этапа или этапов получения химерного антитела, муринизированного антитела, одноцепочечного антитела, Fab-фрагмента, биспецифичного антитела, антитела слияния, меченного антитела или аналога любого из указанных антител. Соответствующие способы известны специалисту в данной области техники и описаны, например, в руководстве Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). Когда производные указанных антител получают посредством методики фагового дисплея, метод поверхностного плазмонного резонанса, который применяется в системе BIAcore, можно применять для увеличения эффективности фаговых антител, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из антител, описанных в настоящей заявке (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995)). Получение химерных антител описано, например, в международной заявке WO 89/09622. Способы получения гуманизированных антител описаны, например, в европейской заявке EP-A1 0 239 400 и международной заявке WO 90/07861. Дополнительные источники антител, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой так называемые ксеногенные антитела. Общий принцип получения ксеногенных антител, таких как антитела, подобные антителам человека, у мышей описан, например, в международных заявках WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 и WO 96/33735. Как обсуждается выше, антитело согласно настоящему изобретению может существовать во множестве форм, помимо полных антител; включая, например, Fv, Fab и F(ab)<sub>2</sub>, а также в одноцепочечной форме; см., например, международную заявку WO 88/09344. Вследствие этого согласно одному варианту реализации предложено антитело согласно настоящему изобретению, которое выбирают из группы, включающей одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv), F(ab')-фрагмент, F(ab)-фрагмент и F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент.

Антитела согласно настоящему изобретению или соответствующую цепь или цепи иммуноглобулинов указанных антител можно дополнительно модифицировать с применением общепринятых методов, известных в данной области техники, например, с применением делеции (или делеций), вставки (или вставок), замены (или замен), добавления (или добавлений) и/или рекомбинации (рекомбинаций) аминокислот и/или любой другой модификации (или модификаций), известных в данной области техники, самой по себе или в комбинации. Способы введения таких модификаций в последовательность ДНК, лежащую в основе аминокислотной последовательности цепи иммуноглобулина, хорошо известны специалисту в данной области техники; см., например, руководства Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. и Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Модификации антитела согласно настоящему изобретению включают химическую и/или ферментативную дериватизацию одной или нескольких составных аминокислот, включая модификации боковой цепи, модификации скелета и модификации N-

и С-конца, включая ацетилирование, гидроксильное, метилирование, амидирование и присоединение углеводных или липидных групп, кофакторов и т.п. Аналогично, настоящее изобретение включает получение химерных белков, которые содержат описанное антитело или некоторый фрагмент указанного антитела на аминоконце, слитое с гетерологичной молекулой, такой как иммуностимулирующий лиганд, на карбоксильном конце; соответствующие технические детали см., например, в международной заявке WO 00/30680.

Помимо этого, настоящее изобретение охватывает пептиды, включая таковые, содержащие связывающую молекулу, описанную выше, например, содержащую область CDR3 варибельной области любого из упомянутых антител, в частности, CDR3 тяжелой цепи, поскольку часто наблюдалось, что CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) представляет собой область, которая содержит большую степень варибельности и которая преимущественно участвует во взаимодействии антиген-антитело. Такие пептиды можно легко синтезировать или получить посредством рекомбинантных способов получения связывающего средства, подходящего в соответствии с настоящим изобретением. Такие способы хорошо известны средним специалистам в данной области техники. Пептиды можно синтезировать, например, с применением автоматизированных синтезаторов пептидов, которые являются коммерчески доступными. Пептиды также можно получить с применением рекомбинантных методов посредством встраивания в вектор экспрессии ДНК, экспрессирующей пептид, и трансформации клеток вектором экспрессии для получения пептида.

Следовательно, настоящее изобретение относится к любой связывающей молекуле, например, антителу или связывающему фрагменту указанного антитела, которая ориентирована в направлении антигенов против ТТР и/или антител, способных к связыванию с мутантными, неправильно свернутыми, неправильно собранными или агрегированными формами ТТР и/или фрагментами указанных форм согласно настоящему изобретению и которая демонстрирует упомянутые свойства, т.е. которая специфично распознает ТТР и/или мутантные, неправильно свернутые, неправильно собранные или агрегированные формы ТТР и/или фрагменты указанных форм. Такие антитела и связывающие молекулы можно исследовать для определения специфичности связывания и аффинности указанных антител методом ELISA и иммуногистохимии, как описано в настоящей заявке, см., например, примеры. Данные характеристики антител и связывающих молекул можно также исследовать методом вестерн-блоттинга.

Иллюстративное антитело человека NI-301.37F1 демонстрирует заметное окрашивание неправильно свернутого ТТР на гистологических срезах биопсии кожи от пациента с САП, при этом в случае здоровой контрольной поджелудочной железы окрашивание не наблюдается, тогда как альфа-клетки поджелудочной железы демонстрируют эндогенную экспрессию ТТР, т.е. нативного ТТР (см. пример 8 и фиг. 9). Иллюстративные антитела NI-301.35G11 и NI-301.37F1 согласно настоящему изобретению также демонстрировали положительные результаты на ткани мыши с САП, что свидетельствует об аномальных отложениях ТТР в различных тканях, включая кишечник; см. фиг. 8. Данная специфичность связывания в отношении патологических форм ТТР в ткани человека и животного, помимо биохимических экспериментов, представленных в настоящей заявке (см. фиг. 10), подчеркивает применимость антител согласно настоящему изобретению при лечении и диагностике заболеваний, связанных с ТТР амилоидозом, которые преимущественно возникают вследствие наличия неправильно свернутых, неправильно собранных и/или агрегированных форм ТТР и/или фрагментов, производных указанных форм.

В качестве альтернативы получению иммуноглобулинов непосредственно из культуры В-клеток или В-клеток памяти, клетки можно использовать в качестве источника реаранжированных локусов тяжелой цепи и легкой цепи для последующей экспрессии и/или генетической манипуляции. Реаранжированные гены антитела можно обратно транскрибировать из подходящих мРНК для получения кДНК. При необходимости константную область тяжелой цепи можно заменить таковой из различных изотипов или удалить полностью. Варибельные области могут быть связаны для кодирования одноцепочечных Fv-областей. Множество Fv-областей можно объединить для обеспечения способности связывания с более одной мишенью; либо можно применять комбинации химерных тяжелой и легкой цепей. Если доступен генетический материал, разработка аналогов, описанных выше, которые сохраняют обе способности к связыванию с желаемой мишенью, не вызывает сложностей. Способы клонирования варибельных областей антитела и получения рекомбинантных антител известны специалисту в данной области техники и описаны, например, в публикациях Gilliland et al., *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20; Doenecke et al., *Leukemia* 11 (1997), 1787-1792.

После того как подходящий генетический материал получен и, при необходимости, модифицирован для кодирования аналога, кодирующие последовательности, включая таковые, которые кодируют, как минимум, варибельные области тяжелой и легкой цепей, можно встроить в системы экспрессии, содержащиеся в векторах, которыми можно трансфицировать стандартные рекомбинантные клетки-хозяева. Можно использовать множество таких клеток-хозяев; однако для эффективного процессинга предпочтительными являются клетки млекопитающих. Типичные линии клеток млекопитающих, подходящие для данной цели, включают, но не ограничены указанными, клетки CHO, клетки HEK 293 или клетки NSO.

Затем получение антител или аналога осуществляют посредством культивирования модифицированного рекомбинантного хозяина в условиях культивирования, подходящих для роста клеток-хозяев и экспрессии кодирующих последовательностей. После этого антитела восстанавливают посредством их

выделения из культуры. Системы экспрессии предпочтительно разрабатывают с введением сигнальных пептидов так, чтобы полученные в результате антитела секретировались в среду; однако также возможна внутриклеточная продукция.

В соответствии с вышесказанным, настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему антитело или эквивалентную связывающую молекулу согласно настоящему изобретению, в случае антитела, предпочтительно, по меньшей мере вариабельную область иммуноглобулиновой цепи антитела, описанного выше. Как правило, указанная вариабельная область, кодируемая полинуклеотидом, содержит по меньшей мере одну область, определяющую комплементарность (CDR), из вариабельной области  $V_H$  и/или  $V_L$  указанного антитела. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полинуклеотид представляет собой кДНК.

Специалист в данной области техники легко понимает, что вариабельный домен антитела, содержащего вышеописанный вариабельный домен, можно применять для конструирования других полипептидов или антител желаемой специфичности и биологической функции. Таким образом, настоящее изобретение также включает полипептиды и антитела, которые содержат по меньшей мере одну CDR вышеописанного вариабельного домена и которые в качестве преимущества характеризуются по существу такими же или подобными свойствами связывания, что и антитело, описанное в прилагаемых примерах. Специалисту в данной области техники известно, что аффинность связывания можно усилить посредством введения замен аминокислот в пределах CDR или в пределах гипервариабельных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917), которые частично перекрываются с CDR, определенными Кэботом; см., например, публикацию Riechmann, et al., *Nature* 332 (1988), 323-327. Таким образом, настоящее изобретение также относится к антителам, в которых одна или несколько из упомянутых CDR содержат одну или несколько, предпочтительно, не более двух замен аминокислот. Предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению содержит в одной или обеих иммуноглобулиновых цепях две или все три из CDR вариабельной области, представленных на фиг. 1.

Связывающие молекулы, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению, как известно среднему специалисту в данной области техники, могут содержать константную область, которая опосредует одну или несколько эффекторных функций. Например, связывание компонента C1 комплемента с константной областью антитела может активировать систему комплемента. Активация комплемента является важной для опсонизации и лизиса патогенов клеток. Активация комплемента также стимулирует воспалительный ответ и может также быть вовлечена в процессы аутоиммунной гиперчувствительности. Также антитела связываются с рецепторами на различных клетках посредством Fc-области, посредством сайта связывания Fc-рецептора на Fc-области антитела, который связывается с Fc-рецептором (FcR) на клетке. Существует множество Fc-рецепторов, которые являются специфичными к различным классам антител, включая IgG (гамма-рецепторы), IgE (эпсилон-рецепторы), IgA (альфа-рецепторы) и IgM (мю-рецепторы). Связывание антитела с Fc-рецепторами на поверхности клеток запускает множество важных и разнообразных биологических ответов, включая поглощение и разрушение покрытых антителами частиц, выведение иммунных комплексов, лизис покрытых антителами клеток-мишеней клетками-киллерами (называемый антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью или ADCC), высвобождение медиаторов воспаления, перенос через плаценту и контроль продукции иммуноглобулинов.

Соответственно, определенные варианты реализации настоящего изобретения включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела, в котором, по меньшей мере, группа одного или нескольких из доменов константной области была удалена или каким-либо другим способом изменена для обеспечения желаемых биохимических характеристик, таких как уменьшенные эффекторные функции, способность к нековалентной димеризации, увеличенная способность локализоваться в участке агрегации и отложения ТТР, уменьшенный период полужизни в сыворотке или увеличенный период полужизни в сыворотке по сравнению с целым, неизмененным антителом приблизительно такой же иммуногенности. Например, определенные антитела для применения в способах диагностики и лечения, описанных в настоящей заявке, представляют собой антитела с удаленным доменом, которые содержат полипептидную цепь, подобную тяжелой цепи иммуноглобулина, но в которых отсутствует, по меньшей мере, участок одного или нескольких доменов тяжелой цепи. Например, в определенных антителах будет удален один целый домен константной области модифицированного антитела, например, будет удален весь домен CH2 или его часть. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения определенные антитела для применения в способах диагностики и лечения, описанных в настоящей заявке, содержат константную область, например, константную область тяжелой цепи IgG, которая изменена для устранения гликозилирования; данные антитела называют в настоящей заявке агликозилированными или "agly"-антителами. Такие "agly"-антитела можно получить ферментативным способом, а также посредством конструирования консенсусного сайта или сайтов гликозилирования в константной области. Не опираясь на какую-либо теорию, считают, что "agly"-антитела могут обладать улучшенным профилем безопасности и стабильности *in vivo*. Способы получения агликозилированных антител, обладающих желаемыми эффекторными функциями, можно найти, например, в международной заявке WO 2005/018572, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки во всей

своей полноте.

В определенных антителах или антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных указанных антител, описанных в настоящей заявке, Fc-участок можно подвергнуть мутации для уменьшения эффекторной функции с применением методик, известных в данной области техники. Например, делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или другими способами) домена константной области может уменьшить связывание с Fc-рецептором циркулирующего модифицированного антитела и тем самым увеличить локализацию ТТР. В других случаях существует вероятность того, что модификации константной области, соответствующие настоящему изобретению, ослабляют связывание комплемента и тем самым уменьшают период полужизни в сыворотке и неспецифичное связывание конъюгированного цитотоксина. Другие модификации константной области можно использовать для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных групп, которые обеспечивают усиленную локализацию благодаря увеличенной антигенной специфичности или подвижности антитела. Полученный в результате физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты модификаций, такие как локализация ТТР, биораспределение и период полужизни в сыворотке, можно легко измерять и количественно определять с применением хорошо известных иммунологических методик без излишнего экспериментирования.

В определенных антителах или антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных указанных антител, описанных в настоящей заявке, Fc-участок можно подвергнуть мутации или заменить альтернативными последовательностями белка для увеличения клеточного захвата антитела, в качестве примера, посредством усиления рецептор-опосредованного эндоцитоза антител Fc $\gamma$ -рецепторами, LRP-или Thy1-рецепторами или посредством "технологии суперантител", которая, как сообщают, делает возможным перемещение антител в живые клетки и из них без ущерба для клеток (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241). Например, получение слитых белков связывающей области антитела и когнатных белковых лигандов рецепторов поверхности клетки либо би- или мультиспецифичных антител со специфичными последовательностями, связывающимися с ТТР, а также рецептора поверхности клетки, можно осуществить с применением методик, известных в данной области техники.

В определенных антителах или антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных указанных антител, описанных в настоящей заявке, Fc-участок можно подвергнуть мутации или заменить альтернативными последовательностями белка, либо антитело можно химическим способом модифицировать для увеличения эффективности проникновения указанного антитела через гематоэнцефалический барьер.

Модифицированные формы антител или антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных указанных антител согласно настоящему изобретению можно получить из целого предшественника или родительского антитела с применением методик, известных в данной области техники. Примеры методик обсуждаются более подробно в настоящей заявке. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению можно получить или произвести с применением методик, известных в данной области техники. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения молекулы антитела или фрагменты указанных молекул являются "полученными рекомбинантным способом", т.е. полученными с применением технологии рекомбинантной ДНК. Примеры методик для получения молекул антитела или фрагментов указанных антител обсуждаются более подробно в других разделах настоящей заявки.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению также включают производные, которые являются модифицированными, например, посредством присоединения ковалентным способом к антителу любого типа молекулы так, что присоединение ковалентным способом не предотвращает специфичного связывания антитела с когнатным эпитопом. Например, без ограничения, производные антитела включают антитела, которые были модифицированы, например, посредством гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с лигандом клетки или другим белком и т.д. Любую из множества химических модификаций можно осуществлять с применением известных методик, включая, но не ограничиваясь указанными, специфичное химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Помимо этого, производное может содержать одну или несколько неклассических аминокислот.

Согласно в особенности предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению не будут вызывать пагубного иммунного ответа у животного, которое получает лечение, например, у человека. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения связывающие молекулы, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты указанных антител согласно настоящему изобретению получены от пациента, например, пациента-человека, а затем используются у того же вида, от которого указанные антитела были получены, например, человека, смягчая или минимизируя возникновение пагубных иммунных ответов.

Деиммунизацию можно также использовать для уменьшения иммуногенности антитела. В настоя-



шей заявке термин "деиммунизация" включает изменение антитела для модификации эпитопов Т-клетки; см., например, международные заявки WO 98/52976 и WO 00/34317. Например, анализируют последовательности  $V_H$  и  $V_L$  исходного антитела, и получают "карту" эпитопа Т-клетки человека из каждой области  $V$ , демонстрирующую расположение эпитопов относительно областей, определяющих комплементарность (CDR), и других ключевых остатков в пределах последовательности. Индивидуальные эпитопы Т-клетки из карты эпитопов Т-клетки анализируют с целью обнаружить альтернативные замены аминокислот, характеризующиеся низким риском изменения активности итогового антитела. Разрабатывают диапазон альтернативных последовательностей  $V_H$  и  $V_L$ , содержащий комбинации замен аминокислот, и затем данные последовательности встраивают в диапазон связывающих полипептидов, например, ТТР-специфичных антител или иммуноспецифичных фрагментов указанных антител, для применения в способах диагностики и лечения, раскрытых в настоящей заявке, функции которых затем исследуют. Как правило, получают и исследуют от 12 до 24 вариантов антител. Затем полные гены тяжелой и легкой цепей, содержащие модифицированные области  $V$  и  $C$  человека, клонируют в экспрессирующие векторы, и после этого плазмиды вводят в линии клеток для получения целого антитела. Затем антитела сравнивают в подходящих биохимических и биологических анализах и идентифицируют оптимальный вариант.

Моноклональные антитела можно получить с применением широкого множества методик, известных в данной области техники, включая применение гибридомы, рекомбинантных технологий и методик фагового дисплея, или комбинации указанных методик. Например, моноклональные антитела можно получить с применением методик гибридомы, включая методики, известные в данной области техники и изложенные, например, в руководствах Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981); указанные источники включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте. Термин "моноклональное антитело" в настоящей заявке не ограничен антителами, полученными посредством технологии гибридомы. Термин "моноклональное антитело" означает антитело, которое получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не способ, посредством которого было получено данное антитело. Таким образом, термин "моноклональное антитело" не ограничен антителами, полученными посредством технологии гибридомы. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению получены из В-клеток человека, которые стали иммортализованными в результате трансформации вирусом Эпштейна-Барр, как описано в настоящей заявке.

В хорошо известном способе гибридомы (Kohler et al., *Nature* 256 (1975), 495) относительно короткоживущие или смертные лимфоциты млекопитающих, например, В-клетки, полученные от субъекта-человека, как описано в настоящей заявке, сливают с бессмертной линией клеток опухоли (например, линией клеток миеломы), таким образом, получая гибридные клетки или "гибридомы", которые являются бессмертными и способными продуцировать кодируемое генетическим способом антитело В-клетки. Полученные в результате гибриды разделяют на отдельные генетические линии посредством селекции, разведения и возобновления роста, причем каждая индивидуальная линия содержит специфичные гены для образования отдельного антитела. Линии продуцируют антитела, которые являются гомогенными в отношении желаемого антигена

и которые благодаря чистому генетическому происхождению называют "моноклональными".

Клетки гибридомы, полученные таким способом, высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, предпочтительно содержащей одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживаемость неслитых, родительских клеток миеломы. Специалисты в данной области техники понимают, что реактивы, линии клеток и среда для образования, селекции и роста гибридом являются коммерчески доступными из множества источников, и стандартизированные протоколы хорошо отработаны. Как правило, культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, анализируют для определения продукции моноклональных антител против желаемого антигена. Специфичность связывания моноклональных антител, полученных с применением клеток гибридомы, определяют посредством анализов *in vitro*, таких как иммунопреципитация, радиоиммуноанализ (РИА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), как описано в настоящей заявке. После того, как клетки гибридомы, которые продуцируют антитела желаемой специфичности, аффинности и/или активности, были идентифицированы, клоны можно субклонировать посредством процедур предельного разведения и выращивать стандартными способами; см., например, публикацию Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), 59-103. Следует также понимать, что моноклональные антитела, секретируемые субклонами, можно отделить от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки посредством общепринятых процедур очистки, таких как, например, хроматография с белком А, хроматография с гидроксипатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения лимфоциты можно выбрать посредством микроманипуляции и выделения вариабельных генов. Например, мононуклеарные клетки периферической крови можно выделить из иммунизированного млекопитающего или млекопитающего, обладающего иммунитетом, полученным природным способом, человека, и культивировать в течение приблизительно 7 дней *in vitro*. Можно проводить скрининг культуры для обнаружения специ-

фичных IgG, которые соответствуют критериям скрининга. Можно выделить клетки из положительных лунок. Индивидуальные Ig-продуцирующие В-клетки можно выделить методом FACS или посредством обнаружения данных клеток в комплемент-опосредованном гемолитическом анализе бляшек. Ig-продуцирующие В-клетки можно перенести в пробирку, и гены  $V_H$  и  $V_L$  можно амплифицировать с применением, например, ОТ-ПЦР. Гены  $V_H$  и  $V_L$  можно клонировать в вектор, экспрессирующий антитело, и трансфицировать данным вектором клетки (например, эукариотические или прокариотические клетки) для экспрессии.

В качестве альтернативы, антитело-продуцирующие линии клеток можно выбрать и культивировать с применением методик, хорошо известных специалисту в данной области техники. Такие методики описаны во множестве лабораторных руководств и в первичных публикациях. В этом отношении методики, подходящие для применения в настоящем изобретении, как описано ниже, описаны в руководстве *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), которое включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте, включая приложения.

Фрагменты антитела, которые распознают специфичные эпитопы, могут быть получены посредством известных методик. Например, Fab- и  $F(ab')_2$ -фрагменты можно получить рекомбинантным способом или посредством протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с применением ферментов, таких как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения  $F(ab')_2$ -фрагментов).  $F(ab')_2$ -фрагменты содержат вариабельную область, константную область легкой цепи и домен CH1 тяжелой цепи. Такие фрагменты достаточны для применения, например, в процедурах иммунодиагностики, включая спаривание иммуноспецифичных участков иммуноглобулинов с обнаруживающими реактивами, такими как радиоактивные изотопы.

Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну CDR молекулы антитела. Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере две CDR из одной или нескольких молекул антитела. Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере три CDR из одной или нескольких молекул антитела. Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере четыре CDR из одной или нескольких молекул антитела. Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере пять CDR из одной или нескольких молекул антитела. Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере шесть CDR из одной или нескольких молекул антитела. Иллюстративные молекулы антитела, содержащие по меньшей мере одну CDR, которая может быть встроена в заявленные антитела, описаны в настоящей заявке.

Антитела согласно настоящему изобретению можно получить посредством любого способа, известного в данной области техники для синтеза антител, в частности, посредством химического синтеза или, предпочтительно, посредством методик рекомбинантной экспрессии, как описано в настоящей заявке.

Согласно одному варианту реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела согласно настоящему изобретению содержит синтетическую константную область, в которой один или несколько доменов частично или полностью удалены ("антитела с удаленным доменом"). Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения совместимые модифицированные антитела содержат конструкции или варианты с удаленным доменом, причем весь домен CH2 был удален (конструкции  $\Delta$ CH2). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения удаленный домен может быть заменен коротким соединяющим пептидом для обеспечения подвижности и свободы движений вариабельной области. Специалисты в данной области техники понимают, что такие конструкции являются в особенности предпочтительными вследствие регуляторных свойств домена CH2 в отношении скорости катаболизма антитела. Конструкции с удаленным доменом можно получить с применением вектора, кодирующего константный домен IgG<sub>1</sub> человека, см., например, международные заявки WO 02/060955 и WO 02/096948A2. Данный вектор конструируют для удаления домена CH2 и для получения синтетического вектора, экспрессирующего константную область IgG<sub>1</sub> с удаленным доменом.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению представляют собой минитела. Мини-тела можно получить с применением способов, описанных в данной области техники, см., например, патент США № 5837821 или международную заявку WO 94/09817.

Согласно одному варианту реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела согласно настоящему изобретению содержит тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую делецию или замену нескольких или даже одной аминокислоты, при условии, что указанная делеция или замена не препятствует связыванию мономерных субъединиц. Например, мутации одной аминокислоты в выбранных областях домена CH2 может быть достаточно, чтобы по существу уменьшить Fc-связывание и посредством этого увеличить локализацию TTP. Аналогично, может

быть желательно просто удалить участок одного или нескольких доменов константной области, контролирующей эффекторную функцию (например, связывание комплемента), которую необходимо модулировать. Такие частичные делеции константных областей могут улучшить выбранные характеристики антитела (период полужизни в сыворотке), при этом оставляя другие желаемые функции, связанные с заявленным доменом константной области без изменений. Более того, как было упомянуто выше, константные области раскрытых антител могут являться синтетическими в результате мутации или замены одной или нескольких аминокислот, усиливающей профиль полученной в результате конструкции. В этом отношении возможно нарушить активность, которую обеспечивает консервативный сайт связывания (например, Fc-связывания), при этом по существу сохранив конфигурацию и иммуногенный профиль модифицированного антитела. Третьи варианты реализации настоящего изобретения включают добавление одной или нескольких аминокислот к константной области для усиления желаемых характеристик, таких как эффекторная функция, или обеспечения присоединения большего количества цитотоксичных или углеводных. Согласно таким вариантам реализации может быть желательно построить или реплицировать специфичные последовательности, полученные из выбранных доменов константной области.

В настоящем изобретении также предложены антитела, которые содержат, по существу состоят или состоят из вариантов (включая производные) молекул антитела (например, областей  $V_H$  и/или областей  $V_L$ ), описанных в настоящей заявке, причем антитела или фрагменты указанных антител иммуноспецифично связываются с ТТР. Для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, можно применять стандартные методики, известные специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь указанными, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, приводящий к заменам аминокислот. Предпочтительно, варианты (включая производные) кодируют менее 50 замен аминокислот, менее 40 замен аминокислот, менее 30 замен аминокислот, менее 25 замен аминокислот, менее 20 замен аминокислот, менее 15 замен аминокислот, менее 10 замен аминокислот, менее 5 замен аминокислот, менее 4 замен аминокислот, менее 3 замен аминокислот или менее 2 замен аминокислот относительно эталонной области  $V_H$ ,  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2,  $V_H$ -CDR3, области  $V_L$ ,  $V_L$ -CDR1,  $V_L$ -CDR2 или  $V_L$ -CDR3. "Консервативная замена аминокислоты" представляет собой таковую, в которой остаток аминокислоты заменен остатком аминокислоты, содержащим боковую цепь с аналогичным зарядом. Семейства остатков аминокислот, содержащих боковую цепь с аналогичным зарядом, были установлены в данной области техники. Данные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В качестве альтернативы, мутации могут быть введены случайным образом во всю кодирующую последовательность или в ее часть, например, посредством насыщающего мутагенеза, и можно провести скрининг полученных в результате мутантов для определения биологической активности с целью обнаружения мутантов, сохранивших активность (например, способность к связыванию с ТТР и/или неправильно свернутыми, неправильно собранными или агрегированными формами ТТР и/или фрагментами указанных форм).

Например, возможно ввести мутации только в каркасные области или только в области CDR молекулы антитела. Введенные мутации могут представлять собой молчащие или нейтральные миссенс-мутации, например, не оказывающие эффекта или оказывающие незначительный эффект на способность антитела к связыванию с антигеном; в действительности некоторые такие мутации совершенно не изменяют аминокислотную последовательность. Данные типы мутаций могут быть подходящими для оптимизации применения кодонов или для улучшения продукции антител гибридами. Кодирующие области с оптимизированными кодонами, кодирующие антитела согласно настоящему изобретению, раскрыты в настоящей заявке в других разделах. В качестве альтернативы, миссенс-мутации, отличные от нейтральных, могут изменить способность антитела к связыванию с антигеном. Большинство молчащих или нейтральных миссенс-мутаций, вероятно, расположены в каркасных областях, тогда как большинство миссенс-мутаций, отличных от нейтральных, вероятно, расположены в CDR, хотя данная закономерность не является абсолютной. Специалист в данной области техники способен разработать и исследовать мутантные молекулы с желаемыми свойствами, такими как отсутствие изменений в антигенсвязывающей активности или изменение активности связывания (например, улучшение антигенсвязывающей активности или изменение специфичности антитела). После мутагенеза кодируемый белок можно экспрессировать обычными способами, и функциональную и/или биологическую активность кодируемого белка (например, способность к иммуноспецифичному связыванию с по меньшей мере одним эпитопом ТТР и/или мутантными, неправильно свернутыми, неправильно собранными или агрегированными формами ТТР и/или фрагментами указанных форм) можно определить с применением методик, описанных в настоящей заявке, или посредством модификации методик, известных в данной области техники, обычными способами.

### III. Полинуклеотиды, кодирующие антитела

Полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела, может состоять из любого полирибонуклеотида или полидезоксирибонуклеотида, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК либо модифицированную РНК или ДНК. Например, полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела, может состоять из одно- и двухцепочечной ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечной РНК и РНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, гибридной молекулы, содержащей ДНК и РНК, которые могут являться одноцепочечными или, более часто, двухцепочечными, или смеси одноцепочечных и двухцепочечных областей. Кроме того, полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела, может состоять из трехцепочечных областей, содержащих РНК или ДНК либо содержащих как РНК, так и ДНК. Полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела, может также содержать одно или несколько модифицированных оснований или скелетов ДНК или РНК, модифицированных для увеличения стабильности или по другим причинам. "Модифицированные" основания включают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК можно ввести множество модификаций; таким образом, "полинуклеотид" охватывает формы, модифицированные химическим, ферментативным или метаболическим способом.

Выделенный полинуклеотид, кодирующий неприродный вариант полипептида, полученного из иммуноглобулина (например, участок тяжелой цепи или участок легкой цепи иммуноглобулина), можно получить посредством введения одной или нескольких замен, добавлений или делеций нуклеотида в нуклеотидную последовательность иммуноглобулина, в результате чего в кодируемый белок вводят одну или несколько замен, добавлений или делеций аминокислот. Мутации можно ввести посредством стандартных методик, таких как сайт-направленный мутагенез и ПНР-опосредованный мутагенез. Предпочтительно, консервативные замены аминокислот вводят в одном или нескольких заменимых остатках аминокислот.

Хорошо известно, что РНК можно выделить из исходных В-клеток, клеток гибридомы или из других трансформированных клеток посредством стандартных методик, таких как экстракция гуанидинизотиоцианатом и преципитация с последующим центрифугированием или хроматографией. При необходимости, мРНК можно выделить из суммарной РНК посредством стандартных методик, таких как хроматография на олиго-dT-целлюлозе. Подходящие методики известны в данной области техники. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кДНК, кодирующую легкую и тяжелую цепи антитела, можно получить, одновременно или отдельно, с применением обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы в соответствии с хорошо известными способами. ПЦР можно проводить с консенсусными праймерами константной области или с более специфичными праймерами на основе опубликованной аминокислотной последовательности тяжелой и легкой цепей ДНК. Как обсуждается выше, ПЦР также можно использовать для выделения клонов ДНК, кодирующих легкую и тяжелую цепи антитела. В данном случае можно провести скрининг библиотек с применением консенсусных праймеров или более крупных гомологичных зондов, таких как зонды константной области человека.

ДНК, как правило, плазмидную ДНК, можно выделить из клеток с применением известных в данной области техники методик рестрикционного картирования и секвенирования в соответствии со стандартными, хорошо известными способами, подробно изложенными, например, в вышеуказанных источниках относительно методик рекомбинантной ДНК. Разумеется, ДНК может являться синтетической в соответствии с настоящим изобретением на любом этапе в ходе процесса выделения или последующего анализа.

В данном контексте настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему по меньшей мере связывающий домен или вариабельную область иммуноглобулиновой цепи антитела согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина ( $V_H$ ), причем по меньшей мере одна из CDR вариабельной области тяжелой цепи или по меньшей мере две из  $V_H$ -CDR вариабельной области тяжелой цепи являются по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% идентичными аминокислотной последовательности  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2 или  $V_H$ -CDR3 тяжелой цепи эталонных антител, раскрытых в настоящей заявке. В качестве альтернативы, области  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2 или  $V_H$ -CDR3  $V_H$  являются по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% идентичными аминокислотной последовательности  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2 и  $V_H$ -CDR3 тяжелой цепи эталонных антител, раскрытых в настоящей заявке. Таким образом, в соответствии с данным вариантом реализации настоящего изобретения вариабельная область тяжелой цепи согласно настоящему изобретению содержит полипептидные последовательности  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2 или  $V_H$ -CDR3, близкие к полипептидным последовательностям, представленным на фиг. 1.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей

вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина ( $V_L$ ), причем по меньшей мере одна из  $V_L$ -CDR вариабельной области легкой цепи или по меньшей мере две из  $V_L$ -CDR вариабельной области легкой цепи являются по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% идентичными аминокислотной последовательности  $V_L$ -CDR1,  $V_L$ -CDR2 или  $V_L$ -CDR3 легкой цепи эталонных антител, раскрытых в настоящей заявке. В качестве альтернативы, области  $V_L$ -CDR1,  $V_L$ -CDR2 или  $V_L$ -CDR3  $V_L$  являются по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% идентичными аминокислотной последовательности  $V_L$ -CDR1,  $V_L$ -CDR2 и  $V_L$ -CDR3 легкой цепи эталонных антител, раскрытых в настоящей заявке. Таким образом, в соответствии с данным вариантом реализации настоящего изобретения вариабельная область легкой цепи согласно настоящему изобретению содержит полипептидные последовательности  $V_L$ -CDR1,  $V_L$ -CDR2 или  $V_L$ -CDR3, близкие к полипептидным последовательностям, представленным на фиг. 1.

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

Как известно в данной области техники, "идентичность последовательности" между двумя полипептидами или двумя полинуклеотидами определяют посредством сравнения последовательности аминокислот или нуклеиновой кислоты одного полипептида или полинуклеотида с последовательностью второго полипептида или полинуклеотида. При обсуждении в настоящей заявке, то, является ли любой конкретный полипептид по меньшей мере приблизительно на 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичным другому полипептиду, можно определить с применением способов и компьютерных программ/программного обеспечения, известных в данной области техники, таких как, но не ограничиваясь указанными, программа BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). В программе BESTFIT для поиска сегмента максимальной гомологии между двумя последовательностями применяется алгоритм локальной гомологии Смита и Ватермана (Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* (1981), 482-489). При применении BESTFIT или любой другой программы выравнивания последовательности для определения того, является ли конкретная последовательность, например, на 95% идентичной эталонной последовательности в соответствии с настоящим изобретением, параметры, разумеется, устанавливаются, так, чтобы процент идентичности рассчитывался по всей длине последовательности эталонного полипептида и чтобы допускались пропуски в гомологии, составляющие не более 5% от общего количества аминокислот в эталонной последовательности.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения полинуклеотид содержит, по существу состоит или состоит из нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотидную последовательность области  $V_H$  или  $V_L$  антитела против ТТР и/или антитела, распознающего неправильно свернутые, неправильно собранные или агрегированные формы ТТР и/или фрагменты указанных форм, как представлено в табл. II. В этом отношении специалист в данной области техники легко понимает, что полинуклеотиды, кодирующие по меньшей мере вариабельный домен легкой и/или тяжелой цепи, могут кодировать вариабельный домен обеих цепей иммуноглобулина или только одной из них. Вследствие этого согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полинуклеотид содержит, по существу состоит или состоит из нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотидную последовательность областей  $V_H$  и  $V_L$  антитела против ТТР, распознающего неправильно свернутые, неправильно собранные или агрегированные формы ТТР и/или фрагменты указанных форм, как представлено в табл. II.

Таблица II. Нуклеотидные последовательности областей  $V_H$  и  $V_L$  антитела, распознающего мутантные, неправильно свернутые, неправильно собранные или агрегированные формы ТТР и/или фрагменты указанных форм

Антитело	Нуклеотидные последовательности переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL) или переменной области легкой цепи каппа (VK)
NI-301.59F1-VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGGTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACTTTTAGTAATTATTGGATGAG TTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAATATAAA TCAAGATAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCGCATC TCCAGAGACAACCTCAAGAACCTACTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGA GTCGAGGACACGGGCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGCTATTGCAAGTGT GGGAGATGCTCCCGGGTAACAACCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 1</i>
NI-301.59F1-VL	GAAATTGTGTGACGCACTCTCCAGCCACTCTGTCTCTGTCTCCAGGGGAGA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGAAGCAACTAGCCTG GTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCATCATATGTTGCATCC ACCAGGGCCACTGATATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GAATCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAGGATTTGCAAGTGTATT ACTGTCAGCAATATAATAACTGGCCTCCGTACACTTTTGGCCAGGGACCAA AGTGGATATCAAA <i>SEQ ID NO.: 3</i>
NI-301.35G11-VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACTTTTAGCAGCTATGCCATGA GCTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTA GTGGTAGTGGTGATACAACAAAATACACAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGGTGTCTTCTGCAATGAGCAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCCCTATATTACTGTGTGAAAGATGGTAGTGGACG GATCGATCCTTTGCTTTATGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG <i>SEQ ID NO.: 5</i>
NI-301.35G11-VL	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTACCCTGGACAGC CGGCCCTCCATCTCTGCAGTCTAGTCTGATCTCGTATACAGTATGGAAA CATTTACTTGAATTGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCAAAGGCGCTA ATTTATAAGTTTCTAACCGGGACTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAAGTGGCA GTGGGTCCAGACTGACTTCACTGAGAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGG ATGTTGGGGTCTATTACTGCATGCAGGGTACACACTGGCCTAGGACGTTCCG CCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA <i>SEQ ID NO.: 7</i>
NI-301.37F1-VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGGTGGCTCCATCATCAGTAGGAGTTCCTA CTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGG TATCTATCATAGTGGGAACACTTACGACAACCCGTCCCTCAAGAGTCCGACTC ACCATGTCCGTAGACACGTGGAAGAACCAGTCTCCCTGAATCTGAGGTCTG TGACCGCCGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGATAGTCCCGGGGG GTGATGCTTTGATATCTGGGGCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG <i>SEQ ID NO.: 9</i>
NI-301.37F1-VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCAAAATCGCTTCCCGGGCCAGTCAGAGCGTTGGCACCTATTTAAATTG GTATCAGCAGAAAAGAGGGAAAGCCCTAAACTCCTCATCTTTGCTGCATCC AGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACA

	GATTTCACCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTTGCAACTFACT ACTGTCAACAGAGTTACAGTTCTCTCCAACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGT GGAGATCAAA <i>SEQ ID NO.: 11</i>
NI-301.2F5-VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCGGTCTAGGAGGTCC CTGAGACTCTCTGTGCAACCTCTGGATTACCTTCAAGTAACATATGCGATGC ACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCATTATTT CATATGATGGAAACAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCCGATTCA CCGTCTCCAGAGACAATCCAAGAACACATTCTATCTGCAAATGAACAGCCT GAGAATTGAGGACACGGCTGTATATTTTGTGCGAGAGGGAGCGGTAGAGC AGCTCGTCACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGGTCTCC TCG <i>SEQ ID NO.: 13</i>
NI-301.2F5-VL	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCTGGACAGTCA TCACCATCTCTGCACTGGAACAGCAGTACGTTGGTGGTTATAACTATGT CTCCTGGTACCAACAATACCCAGGCAAGGCCCAAGTCAATGTTTTGAT GTTTTTAATCGGCCCTCAGGGGTTCTAATCGCTTCTGGCTCAAAGTCTGG CAACACGGCTCCCTGACCATCTCTGGACTCCAGGCAGAGGACGAGGCTGG TTATTACTGCAGTTCAATACAAGCAGCGTCACTCTCACTGGGTCTCGGC GGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCA <i>SEQ ID NO.: 15</i>
NI-301.28B3 -VH	CAGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTCCGAGACC CTGCCCCTACCTGCACTGTCTCCGGTGGCTCCATCACTAGTAGTAATTTCTA CTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGC TATTTATTCTAGTGAAACACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTGC ACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAAAAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCG TGACCCCGCTGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGACACTCTGTAGTAG TGCCAGCTGCTATCCTCCGGTTTCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACC CTGGTACCCGTCTCTCG <i>SEQ ID NO.: 17</i>
NI-301.28B3 -VL	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGCTCTCCAGGGGAAA GAGCCACCCTCTCTGAGGGCCAGTCAGACTGTAGTTACAACCTAGCCTG GTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCGGCTCCTCATCTATGGCGCTCC ACCAGGGCCACTGGTATCCAGGCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACA GAGTTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTGCAAGTTTAT ACTGTCAGCAATAATAAAGTGGCTCCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCA AGGTGGAAATCAAA <i>SEQ ID NO.: 19</i>
NI-301.119C12-VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAAGACTGGTGAAGCCTTACAGACC CTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGTACTA CTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGATA TATTTCTAATACTGGGAACACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTT ACCATATCGATAGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTCAACTGCGCTCTG TGACTGCCGCGGACACGGCCGACTATTTCTGTGCGAGAGAGATTGTAGTGG TGGTAATTGCTACTCTCGCTTCTACTACTACATGGACGTTCTGGGGCAAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCTCTG <i>SEQ ID NO.: 21</i>
NI-301.119C12-VL	CAGTCTGTGCTGACGCAAGCCGCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGG GTCACCATCTCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGAGGTTATGGTG TACACTGGTACCAGCAACTTTCAGGAACACCCCCAACTCCTCATCTATGG AGACAACAATCGGCCCTCAGGGGTCCTGACCGATTCTTGGCTCCAAGTCT GGCAGCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTC ATTATTACTGCCAGTCTATGACACCCTTGAGTGGTTCGAGGGTTCGG CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCA <i>SEQ ID NO.: 21</i>

	<i>SEQ ID NO.: 23</i>
NI-301.5D8-VH	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACGGTTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACGTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTTCAGTGCTTACTACTGGAA TTGGATCCGCCAGGCCCAAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGTGAAGTCAG TCATGGTGGCAGCAGCAACTACAGCCCGTCCCTCAGGGGTCGAGTCGCCATT TCTTTAGACACGTCCAAGAGCCAGTTCTCCCTGAGGCTGAATTCTGTGACCG CCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGGCAGCCCTGTAGTACTACC AGGTGCCAGATTGACCCCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 25</i>
NI-301.5D8-VL	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTTTCTGGACAGTCGA TCACCATCTCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGGAGTTATAACCTTGT CTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAGCCCCAAACTCTTGATTTATGAG GTCAATAAGCGGCCCTCAGGAGTTTCTACTCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCG GCAACACGGCCTCCCTGACGATCTCTGGGCTCCAGACTGAGGACGAGGCTG ATTATTACTGCTGCTCATATGCAGGTAGTACTAAGGTCTTCGGAATTGGGAC CAAGGTCACCGTCCTA <i>SEQ ID NO.: 27</i>
NI-301.9D5-VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGCCCTGGTGAAGCCTTCAGAGACC CTGTCCCTCACCTGCATTGTCTCTGGTGTCTCCATCAGAAGTGGTGGTTACTA CTGGAGCTGGATCCGGCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGTT CATCTATTACTGGGAACACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGCT ACCATATCAGTAGACACCTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAGGCTGACCGCTG TGACTGCCCGGACACGGCCGTATTACTGTGCGAGAGATTGTAGTGGTGG CAGCTGCCCGAGTCTACTTTGACTCTGGGGTCGGGGCACCCCTGGTCACC GTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 29</i>
NI-301.9D5-VL	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA GAGCCACCCTCTCCTGTAGGGCCAGTCAGAGTGTTCGCAGTTTCTTAGCCTG GTACCAACAGAAATCTGGCCAGGCTCCCCGACTCCTCATCTATGATGCATCC AAGAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTACAGTGGGTCTGGAACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTAGAGACTGAAGACTCTGCGGTTTATT ACTGTGACAGCGTACCAACTGGCCTCCACACCTCACTTTTCGGCGGAGGGAC CAAGGTGGAATCAAA <i>SEQ ID NO.: 31</i>
NI-301.104F5-VH	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGAGAGTCC CTGAGACTCTCCTGTGACGCTCTGGATTACCTTCAGGAGCTATGGCATGC ACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATAT GGTTTGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA CCGTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTCTACTACTGTGCAAGAGATGGTATAGCAGC CACTTATGCGGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 33</i>
NI-301.104F5-VL	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTCGCAGCTACTTAGCCTG GTACCAACAAAACTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCC AACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATT ACTGTGACAACTAGCAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAAAGGACACGAC TGGAGATAAA



	<i>SEQ ID NO.: 35</i>
NI-301.21F10-VH	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGAGGTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC TTGAGACTGTCTGTGCGGTCTCTGGATTACCCCTTAGTAGTCTTAGTCTTA TTACATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC CACTATAAACCCAGGTGGAAGTGAGAAGTCTATGTGGACTCTGTGAAGGG CCGATTACCCGTCTCCAGAGACAACGCCAGGAGCTCAGTATATTTGCAAAATG GACAGCCTGACAGTCGAGGACACGGCTATTTACTGTGCGAGACCAAGA TATTGCAC TAGTGGTGGTGTATTTTGACAAC TGGGGCCAGGGAACCCCTGG TCACCGTCTCCTCG
	<i>SEQ ID NO.: 37</i>
NI-301.21F10-VL	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTCTGGACAGTCAG TCACCATCTCCTGCACTGCAACCAATAGTGATGTTGGCGATTATAAGTCTGT CTCCTGGTACCAACAACCCAGGCAAGCCCCAAACTCATGATTTATGAT GTCGGTAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGTCCAAATCTG ACAACACGGCCTTCTGACCATCTCTGGGCTCCAGACTGAGGATGAAGCTGA TTACTTTTGTGTATATATGTAGGCAGGTCTTCGGTGTTCGGCGGAGGGACC AAGTTGACCGTCTCG
	<i>SEQ ID NO.: 39</i>
NI-301.9G12-VH	CAGGTGCAGTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCGTGTCTCTGGTTTCTCCATCAGCAGTGGTTACTACTG GGGTGGATCCGGCAGCCCCAGGGACGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTAT GTATCATAGTGGGAGGACTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACC ATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTGTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGA CCGCCGACAGACGGCCGTGATTA TACTGTGCGAGGGGCTTCGATACTAGTGG TTCCCATCGGCCCTCTCGACTGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTACC GTCTCCTCG
	<i>SEQ ID NO.: 41</i>
NI-301.9G12-VL	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAG GTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTAT CCTGGTACCAGCAGTCCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATTATGACAA TAATAAGCGACCTCAGGGATTCTGACCGAATCTCTGGCTCCAAGTCTGGC ACGTACGCCACCCTGGGCATACCCGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGAT TATTACTGCGAACCTGGGATAGCAGCCTGAGTGTATGTCTTCGGAAC TG GGACCAAGGTCACCGTCTCA
	<i>SEQ ID NO.: 43</i>
NI-301.12D3-VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGGAACATATGGCATGC ACTGGGTCCCGGGGCCCAAGCAGGGGCTGGAGTGGGTAGCAGTTATAT GGTCTGATGGAAGTGATAAATACTATGCAGACTCCGTGGAGGGCCGATTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGGTGTTCCTCCAAATGAACAGCCT GAGAGCCGACGACACGGCTGTATACTTCTGTGCGAGAGGCCGAGCAGCAC CTGGGCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCCTCTCCTCG
	<i>SEQ ID NO.: 45</i>
NI-301.12D3-VL	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGTCTCTCTGGACAGTCGA TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGGGTTATAACCTTGT CTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAGCCCCAAACTCATGATTTATGAG GACATTAAGGGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGTCTCTGGTCCAAAGTCTG GCAACACGGCCTCCCTGACAATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTG ATTATTTCTGTGCTCATATGCAGGACTGGCACTCTGGTATTCGGCGGAGG

	GACCAAGCTGACCGTCCTA <i>SEQ ID NO.: 47</i>
NI-301.44E4-VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCC CTGAGACTCTCTGTGACGCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGA TCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTA GTGGCAGTGGCAGTACGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCC CCATCTCCAGAGACAAATCCAAGAACACGCTGTCCCTACAAATGAACAGCC TGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCAAAGGGGCATGGGAGA TACCCACCTACTTGACAACCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCCGCTCTCTC G <i>SEQ ID NO.: 54</i>
NI-301.44E4-VK	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGAAA GAGCCACCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGGAACAACCTTAGCCTG GTACCAGCAGAAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATATGGTGCATCC ACCAGGGCCACTGGTATCCAGCCAGGTTCACTGGCACTGGGTCTGGGACA GAGTTCACTCTCATCGTACGACGCTGCACTGTAAGATTTTGCAGTTTATT ACTGTACAGCAGTATAATAACTGGCTCCACGTTGGACGTTCCGCAAGGGA CCAAGTGGAAATCAA <i>SEQ ID NO.: 56</i>
NI-301.18C4-VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAACCTTGGTCCAGCCGGGGGGTCC CTGAGGCTCTCTGCGCAGCGTCGGGATTACATTCAACATTTATGCCATGA CCTGGGTCCGCTGTCTCCAGTGGGGACTGGAGTGGGTCTACTATTAC TAGTGGTGGCGTCAGCATATATTACGCAGACTCCATAAAGGGCCGCTTACC GTCTCCAGAGACAATGCCAAGAATGGTGTCTACAACCTGGACAACCTG ACAGTCGATGACACGGCCATATATTACTGTGGGAAGGACGGAAACTGGGCA GAGACAAGTTGTTACTTAAGGGGATGGAGCTGTTGGGCCAAGGGACACG GTCACCGTCTCTCTG <i>SEQ ID NO.: 61</i>
NI-301.18C4-VL	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTGACGCGCCCAAGCAGAGAAG GTCACCATCTCTGCTCTGGTAGCAGGTCAGACATTGGGTCTAAACTTGTTC CTGGTACCAGGTAATCCAGGAAGAGCCCGGCTCGTCAATTTTGGACT TATAAGCGGCCCTCAGGGGTACCTGCCGCTTCTGCTCCTCAAGTCTGGCA CGTACGCCACCTGGACATCGCCGGCTCCAGCCTGGGGACGAGGCCGAAT ATTTCTGCGGATCATGGGGTAAACAGTGAGAATTTTATTATGTCTTCGGATCT GGGACCCGGGTCACCGTCTCTG <i>SEQ ID NO.: 63</i>
NI-301.11A10-VH	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGAAGTTACT ACTGGGGCTGGATGCGCCAGCCCAAGGGAAGGGCTGGAGTGGATTGGGA GTATTTATTATAGTGGGAGCACCCTCTACAATCCGTCCTCAAGAGTCGAGT CACCATGTCAATAGTCAGTCGAGGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCT GTGACCCCGCGGACACGGCCGTGATTATTGTACCCGAATGGGGGAGGGG GGCGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCCGCTCTCTCTG <i>SEQ ID NO.: 65</i>
NI-301.11A10-VK	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCAACATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGTTGGTGGCCCTG GTATCAGCAGAAACAGGGAAGCCCTAAGGTCCTGATCTATGATGCCTC CAGTTTGGAAAGAGGGGTCCTCAAGGTTCAAGCGGCAAGTGGGTCTGGGAC AGAATTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTCTGCAACTTAT TACTGCCAACACTATAATGGTTATTCAAGGACGTTCCGGCCGGGACCAAG GTGGAATCAA <i>SEQ ID NO.: 67</i>
NI-301.3C9 VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGTCTTCGACAGCC CTGTCCCTCACCTGCACTGTCTGGTGCCTCCTTACCAGGGGTGATTCTTA CTGGAGTTGGATCCGCCAGGTCACAGGGAAGGGCCTGGAATGGATTGGTTA CATATATTCACCTGGGACGCTACTACAATCCGCTCTCAAGAGTCGAGCA AACATCTCGGTGCACACGCCAAGAAGCAGTTCTTCTGAAATGACCTCTT

	TGACTGCCGACACACGGCCGCTATTTTTGTGCCAGGGAAGGACAATATTG TAGCGGTGGTAGTTGCTACCCTGAATACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACC GTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 69</i>
NI-301.3C9 VL	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCAGGACAGACAG CCACCATCACCTGCTCTGGAGATAAATTTGGGACATAAATTTACTTGTGGTA TCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTCTGGTTCATCTAAGATCACAAG CGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCTCCAACCTCTGGGGACACAG CCTACTGTACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGAGTATTACTG TCAGGCGTGGGCTTCCCCTATGTGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACC GTCTCA <i>SEQ ID NO.: 71</i>
NI-301.14D8 VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGACGCTTGGTCCAGCCGGGGGGTCC GTGAGACTCTCTGTATAGCCTCTGGATTCCCTTTAGGAATATTGGATGA GTTGGTCCGCCAGCCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAA AGGAAGATGGCAGTGACAGATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCA CCATCTTTAGAGACAACGCCAAGAATTTCTGAGTCTACAATGAATCGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCGGTATACTTCTGTGCGAGAATTTGAGGGTAAT CCCGTCCGCTGACCCATACTACCTTGACTCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC ACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 73</i>
NI-301.14D8 VL	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTTTGTGGACAGTCCG TCACCATCTCCTGCACCTGGAAACCAGCCTTAACATTGGGACTTACAACCTTAT CTCCTGGTACCAACAACCCAGGCAGAGCCCCAGACTCATCTTTTGTAG GGCAATAGCGCGGCCCCCGGATTCTAATCGCTTCTGTCCCTCAAGCTG GCAACACGGCCTCTTGACAGTCTCTGGGCTGTGGCTGGCAGCAGGCTGA TTATTACTGTTGCTCATTGTCAGGAAGAGTCTCTTGGTGTGGCGGAGGG ACCAAGTTGACCGTCTCA <i>SEQ ID NO.: 75</i>
NI-301.9X4 VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAACCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGCTGGCTCCATCAGTAGTCACTACTGGA ACTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGTCTATCT ATCACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCAACCA TATCAGTAGACAGTCCAAGAACCAGCTCTCCCTGAGGTTGACGCTGTGAC CGCCGACACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGACTACTACTACATG GACGCTGGGGCAAGGGACCACGGTCAACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 77</i>
NI-301.9X4 VL	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTGAGTGTCCCAGGACAGACGG CCAGGATCACCTGCTCTGGAGATGCGTGTCCAGACAAGTATGCTTATTGGTA CCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTATGTTGGTTATATAAGGACAGTGA GAGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGTCCAGTTTGGGGACAACA GTCATGCTGACCATCAGTGGAGTCCAGGCAGAGGACGAGGCTGACTATTAC TGTAATCAGCAGACAGCAGTGGTACTTATTGGGTGTTCCGGCGGGGGACC AAGCTGACCGTCTCA <i>SEQ ID NO.: 79</i>
NI-301.14C3 VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCC CTGAGACTCTCTGTGACGCTCTGGGTTCCACCGTCACTAGCCACTACATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAATATT ATAGCGGTGGTGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCA TCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAAGATCTACAGGTCCGGGTA TACTGGTATTCTTACGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCC TCG <i>SEQ ID NO.: 81</i>
NI-301.14C3 VL	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCAGGACAGACAG CCAGCATCACCTGCTCTGGAGATAAATTTGGGGAGTAAATATGCTTGGTGA TCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTACTGGTCACTATGAAGATAAGAA <i>SEQ ID NO.: 83</i>
	GCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGTCCAACTCTGGGAACACA GCCACTCTGACCATCAGCGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTCT GTCAGGCGTGGGACAGCAGCACTTCTCATGTGGTATTCCGGCGAGGGACCA GGCTGACCGTCTCA <i>SEQ ID NO.: 83</i>

В связи со стратегией клонирования аминокислотная последовательность на N- и C-концах тяжелой цепи и легкой цепи может потенциально содержать вызванные праймером изменения в FR1 и FR4, которые, однако, по существу не влияют на биологическую активность антитела. Для получения консенсусного антитела человека нуклеотидную и аминокислотную последовательности исходного клона можно выровнять с соответствующими последовательностями варибельной области зародышевой линии человека в базе данных; см., например, Vbase2, как описано выше, и привести в соответствие с указанными последовательностями. Аминокислотная последовательность антител человека отмечена жирным шрифтом, когда, как считают, N- и C-концевые аминокислоты потенциально отличаются от консенсусной последовательности зародышевой линии в связи с ПЦР-праймером и, таким образом, были заменены посредством коррекции мутаций, вызванных праймерами (primer-induced mutation correction, PIMC), см. табл. III. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полинуклеотид содержит, по существу состоит или состоит из нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотидную последовательность VH, представленную в табл. III, и соответствующую область VL антитела против ТТР, представленную в табл. II.

Таблица III. Нуклеотидные последовательности областей  $V_H$  и  $V_L$  антитела, распознающего мутантные, неправильно свернутые, неправильно собранные или агрегированные формы ТТР и/или фрагменты указанных форм, с демонстрацией замен в результате РИМС (жирный шрифт)

Альтернативные области антитела с РИМС	Нуклеотидные последовательности варибельной области тяжелой цепи ( $V_H$ )
NI-301.37F1-РИМС- $V_H$	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGGTGGCTCCATCATCAGTAGGAGTTCCTA CTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGG TATCTATCATAGTGGGAACACTTACGACAACCCGTCCTCAAGAGTCGACTC ACCATGTCCGTAGACAGTCGAAGAACCAGTTCTCCCTGAATCTGAGGTCTG TGACCGCCGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGATAGTCCCGGGG GTGATGCTTTTGTATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTCG
	<i>SEQ ID NO.: 52</i>

Настоящее изобретение также включает фрагменты полинуклеотидов согласно настоящему изобретению, как описано где-либо в настоящей заявке. Дополнительные полинуклеотиды, которые кодируют полинуклеотиды слияния, Fab-фрагменты и другие производные, описанные в настоящей заявке, также включены в настоящее изобретение.

Полинуклеотиды могут быть получены или произведены любым способом, известным в данной области техники. Например, если известна нуклеотидная последовательность антитела, полинуклеотид, кодирующий антитело, может быть собран из олигонуклеотидов, синтезированных химическим способом, например, как описано в публикации Kutmeier et al., *BioTechniques* 17 (1994), 242, которая, вкратце, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих участки последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование данных олигонуклеотидов, а затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов методом ПНР.

В качестве альтернативы, полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела, может быть получен из нуклеиновой кислоты из подходящего источника. Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, отсутствует, но последовательность молекулы антитела известна, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно синтезировать химическим способом или получить из подходящего источника (например, из библиотеки кДНК антител или из библиотеки кДНК, полученной из любой ткани или клеток, экспрессирующих ТТР-специфичное антитело, таких как клетки гибридомы, выбранные для экспрессии антитела, или из библиотеки кДНК, полученной из нуклеиновой кислоты, предпочтительно, полиА<sup>+</sup> РНК, выделенной из вышеуказанных любой ткани или клеток) посредством ПНР-амплификации с применением синтетических праймеров, поддающихся гибридизации с 3'- и 5'-концами последовательности, или посредством клонирования с применением олигонуклеотидного зонда, специфичного к конкретной последовательности гена, для обнаружения, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, кодирующей антитело. Затем амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные методом ПНР, можно клонировать в реплицируемые клонирующие векторы с применением любого способа, хорошо известного в данной области техники. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кДНК, кодирующая антитело, цепь иммуноглобулина или фрагмент указанной цепи используют для продукции антител против ТТР.

После того как нуклеотидная последовательность и соответствующая аминокислотная последовательность антитела или антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного указанного антитела была определена, данную нуклеотидную последовательность можно изменять с применением способов манипуляции с нуклеотидными последовательностями, хорошо известных в данной области техники, например, методики рекомбинантной ДНК, сайт-направленного мутагенеза, ПЦР и т.д. (см., например, методики, описанные в руководствах Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) и Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1998), оба из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте), для получения антител, содержащих различные аминокислотные последовательности, например, для получения замен, делеций и/или вставок аминокислот.

#### IV. Экспрессия полипептидов антитела

После манипуляции с выделенным генетическим материалом для получения антител или антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных указанных антител согласно настоящему изобретению полинуклеотиды, кодирующие антитела, как правило, встраивают в экспрессирующий вектор для введения в клетки-хозяева, которые могут использоваться для получения желаемого количества антитела. Рекомбинантная экспрессия антитела или фрагмента, производного или аналога указанного антитела, например, тяжелой или легкой цепи антитела, которое связывается с молекулой-мишенью, описана в настоящей заявке. После того как был получен полинуклеотид, кодирующий молекулу антитела либо тяжелую или легкую цепи антитела либо участок указанных цепей (предпочтительно, содержащий варибельный домен тяжелой или легкой цепи) согласно настоящему изобретению, вектор для продукции молекулы антитела можно получить посредством технологии рекомбинантной ДНК с применением методик, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, способы получения белка посред-

вом экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описаны в настоящей заявке. Для конструирования экспрессирующих векторов, содержащих последовательности, кодирующие антитело, и подходящие контрольные сигналы транскрипции и трансляции, можно применять способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Данные способы включают, например, методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, синтетические методики и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Таким образом, в настоящем изобретении предложены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела согласно настоящему изобретению либо тяжелую или легкую цепь указанного антитела либо варибельный домен тяжелой или легкой цепи, функционально связанные с промотором. Такие векторы могут содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, международные заявки WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США № 5122464), и варибельный домен антитела можно клонировать в такой вектор для экспрессии всей тяжелой или легкой цепи.

Термин "вектор" или "экспрессирующий вектор" используют в настоящей заявке для обозначения векторов, применяемых в соответствии с настоящим изобретением в качестве переносчика для введения в клетку-хозяин и экспрессии желаемого гена в клетке-хозяине. Как известно специалистам в данной области техники, такие векторы можно легко выбрать из группы, включающей плазмиды, фаги, вирусы и ретровирусы. Как правило, векторы, совместимые с настоящим изобретением, содержат селективный маркер, подходящие сайты рестрикции для облегчения клонирования желаемого гена и способности проникать и/или реплицироваться в эукариотических или прокариотических клетках. Множество систем экспрессирующих векторов можно применять в контексте настоящего изобретения. Например, в одном классе векторов применяются элементы ДНК, полученные из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус коровьей оспы, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV) или вирус SV40. Другие классы векторов включают применение полицистронных систем с внутренними сайтами связывания рибосомы. Помимо этого, клетки, которые встроили ДНК в свои хромосомы, можно выбрать посредством введения одного или нескольких маркеров, позволяющих проводить селекцию трансфицированных клеток-хозяев. Маркер может обеспечивать прототрофность к ауксотрофному хозяину, резистентность к биоцидам (например, антибиотикам) или резистентность к тяжелым металлам, таким как медь. Селектируемый ген-маркер может быть непосредственно связан с последовательностью ДНК, которую экспрессируют, либо может быть введен в ту же клетку посредством котрансформации. Для оптимального синтеза мРНК могут также потребоваться дополнительные элементы. Данные элементы могут включать сигнальные последовательности, сплайс-сигналы, а также промоторы, энхансеры и сигналы терминации транскрипции.

Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения клонированные гены варибельной области встраивают в экспрессирующий вектор вместе с генами константной области тяжелой и легкой цепей (предпочтительно, человека), как обсуждается выше. Данный вектор содержит промотор/энхансер цитомегаловируса, главный промотор бета-глобина мыши, точку начала репликации SV40, последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста, экзон 1 и экзон 2 неоминцин-фосфотрансферазы, ген дигидрофолатредуктазы и лидерную последовательность. Данный вектор, как было установлено, приводит к очень высокому уровню экспрессии антител после встраивания генов варибельной и константной областей, трансфекции в клетки CHO с последующей селекцией в среде, содержащей G418, и амплификации в среде, содержащей метотрексат. Разумеется, в настоящем изобретении можно использовать любой экспрессирующий вектор, способный вызывать экспрессию в эукариотических клетках. Примеры подходящих векторов включают, но не ограничены указанными, плазмиды pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 и pZeoSV2 (доступны от Invitrogen, San Diego, CA) и плазмиду pCI (доступна от Promega, Madison, WI). Как правило, скрининг больших количеств трансформированных клеток для поиска таковых, экспрессирующих подходящие высокие уровни тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, является общепринятым исследованием, которое можно проводить, например, с использованием роботизированных систем. Системы векторов также изложены в патентах США №№ 5736137 и 5658570, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте. Данная система обеспечивает высокие уровни экспрессии, например > 30 пг/клетку/день. Другие примеры систем векторов раскрыты, например, в патенте США № 6413777.

Согласно другим предпочтительным вариантам реализации антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению можно экспрессировать с применением полицистронных конструкций, таких как конструкции, раскрытые в публикации заявки на патент США № 2003-0157641 A1, которая включена в настоящую заявку во всей своей полноте. В данных системах экспрессии множество продуктов генов, представляющих интерес, таких как тяжелая и легкая цепи антитела, могут быть получены из одной полицистронной конструкции. В данных системах для обеспечения относительно высоких уровней антител преимущественно применяют участок внутренней посадки рибосомы (IRES). Совместимые последовательности IRES раскрыты в патенте США № 6193980, который также включен в настоящую заявку. Специалисты в данной области техники понимают, что такие системы экспрессии могут использоваться для эффективного получения

полного диапазона антител, раскрытых в настоящей заявке. Вследствие этого, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере связывающий домен или вариабельную область иммуноглобулиновой цепи антитела, необязательно в комбинации с полинуклеотидом, кодирующим вариабельную область другой цепи иммуноглобулина указанной связывающей молекулы.

Более часто, после того как вектор или последовательность ДНК, кодирующая мономерную субъединицу антитела, были получены, экспрессирующий вектор можно ввести в подходящую клетку-хозяин. Введение плазмиды в клетку-хозяин можно осуществить посредством различных методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Таковые включают, но не ограничены указанными, трансфекцию, в том числе липотрансфекцию с применением, например, Fugene® или липофектамина, слияние протопластов, преципитацию фосфатом кальция, слияние клеток с ДНК в оболочке, микроинъекцию и инфекцию интактным вирусом. Как правило, введение плазмиды в хозяина осуществляют посредством стандартного способа копреципитации с фосфатом кальция. Клетки-хозяева, несущие экспрессирующую конструкцию, выращивают в условиях, подходящих для получения легких цепей и тяжелых цепей, и анализируют для определения синтеза белка тяжелой и/или легкой цепи. Примеры методики анализа включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (РИА) или анализ методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (fluorescence-activated cell sorter, FACS), иммуногистохимии и т.п.

Экспрессирующий вектор переносят в клетку-хозяин посредством общепринятых методик, а затем трансфицированные клетки культивируют посредством общепринятых методик получения антител для применения в способах, описанных в настоящей заявке. Таким образом, настоящее изобретение включает клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело согласно настоящему изобретению или тяжелую или легкую цепь указанного антитела либо по меньшей мере связывающий домен или вариабельную область иммуноглобулина указанного антитела, причем указанный полинуклеотид предпочтительно функционально связан с гетерологичным промотором. Кроме того или в качестве альтернативы, настоящее изобретение также включает клетки-хозяева, содержащие вектор, как определено в настоящей заявке выше, который содержит полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере связывающий домен или вариабельную область иммуноглобулиновой цепи антитела, необязательно в комбинации с полинуклеотидом, кодирующим вариабельную область другой цепи иммуноглобулина указанной связывающей молекулы. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения для экспрессии двухцепочечных антител один вектор или векторы, кодирующие как тяжелую, так и легкую цепи, можно коэкспрессировать в клетке-хозяине для экспрессии всей молекулы иммуноглобулина, как подробно описано ниже.

Клетку-хозяин можно котрансфицировать двумя экспрессирующими векторами согласно настоящему изобретению: первым вектором, кодирующим полипептид, полученный из тяжелой цепи, и вторым вектором, кодирующим полипептид, полученный из легкой цепи. Два вектора могут содержать идентичные селективные маркеры, которые делают возможной эквивалентную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепей. В качестве альтернативы, можно использовать один вектор, который кодирует полипептиды тяжелой и легкой цепей. В таких ситуациях легкую цепь преимущественно размещают перед тяжелой цепью во избежание избытка токсичных свободных тяжелых цепей; см. публикации Proudfoot, Nature 322 (1986), 52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 2197. Кодирующие последовательности для тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК.

В настоящей заявке "клетки-хозяева" означают клетки, несущие векторы, сконструированные с применением методики рекомбинантной ДНК и кодирующие по меньшей мере один гетерологичный ген. В описании процессов выделения антител из рекомбинантных хозяев термины "клетка" и "культура клеток" используют взаимозаменяемо для обозначения источника антитела, если однозначно не указано обратное. Другими словами, восстановление полипептида из "клеток" может означать восстановление из отцентрифугированных цельных клеток или из культуры клеток, содержащей среду и суспендированные клетки.

Для экспрессии молекул антитела для применения в способах, описанных в настоящей заявке, можно применять множество систем хозяин - экспрессирующий вектор. Такие системы хозяин - экспрессирующий вектор представляют собой переносчики, посредством которых могут быть получены, а затем очищены кодирующие последовательности, представляющие интерес, а также представляют собой клетки, которые могут, в случае трансформации или трансфекции соответствующими кодирующими нуклеотидными последовательностями, экспрессировать молекулу антитела согласно настоящему изобретению *in situ*. Таковые включают, но не ограничены указанными, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), трансформированные рекомбинантными экспрессирующими векторами на основе ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, которые содержат последовательности, кодирующие антитело; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными экспрессирующими векторами дрожжей, которые содержат последовательности, кодирующие антитело; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными экспрессирующими векторами на основе вируса (например, бакуловируса), которые содержат последовательности, коди-

рующие антитело; системы клеток растений, инфицированные рекомбинантными экспрессирующими векторами на основе вируса (например, вируса мозаики цветной капусты, cauliflower mosaic virus, CaMV; вируса мозаики табака, tobacco mosaic virus, TMV) или трансформированные рекомбинантными экспрессирующими векторами на основе плазмид (например, Ti-плазмид), которые содержат последовательности, кодирующие антитело; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3), несущие рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовирусов; промотор 7.5K вируса коровьей оспы). Для экспрессии рекомбинантной молекулы антитела предпочтительно используют бактериальные клетки, такие как *E. coli*, и, более предпочтительно, эукариотические клетки, в особенности для экспрессии целой рекомбинантной молекулы антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичников китайского хомячка (Chinese Hamster Ovary, CHO), в сочетании с вектором, таким как промоторный элемент главного промежуточного раннего гена цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную систему экспрессии антитела; см., например, публикации Foecking et al., *Gene* 45 (1986), 101; Cockett et al., *Bio/Technology* 8 (1990), 2.

Линия клеток-хозяев, используемая для экспрессии белка, часто получена от млекопитающих; специалисты в данной области техники способны предпочтительно определить конкретные линии клеток-хозяев, которые наилучшим образом подходят для экспрессии желаемого продукта гена. Примеры линий клеток-хозяев включают, но не ограничены указанными, CHO, DG44 и DUXB11 (линии яичников китайского хомячка, DHFR-минус), HELA (карциномы шейки матки человека), CVI (линия почек обезьяны), COS (производное CVI с Т-антигеном SV40), VERY, ВНК (почка новорожденного хомячка), MDCK, WI38, R1610 (фибробласты китайского хомячка) BALBC/3T3 (фибробласты мыши), НАК (линия почек хомячка), SP2/0 (миелома мыши), P3x63-Ag3.653 (миелома мыши), BFA-1c1BPT (эндотелиальные клетки крупного рогатого скота), РАЛ (лимфоциты человека) и 293 (почка человека). Клетки CHO и 293 являются в особенности предпочтительными. Линии клеток-хозяев, как правило, доступны от коммерческих служб, из Американской коллекции тканевых культур (American Tissue Culture Collection) или из опубликованной литературы.

Кроме того, можно выбрать линию клеток-хозяев, которая модулирует экспрессию встроенных последовательностей или модифицирует и процессирует продукт гена определенным желаемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важными для функции белка. Различные клетки-хозяева обладают характерными и специфичными механизмами посттрансляционного процессинга и модификации белков и продуктов генов. Для обеспечения надлежащей модификации и процессинга чужеродного экспрессируемого белка можно выбирать подходящие клеточные линии или системы хозяев. С данной целью можно использовать эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным аппаратом для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования продукта гена.

Для длительной продукции рекомбинантных белков с высоким выходом предпочтительной является стабильная экспрессия. Например, можно сконструировать клеточные линии, которые стабильно экспрессируют молекулу антитела. Вместо применения экспрессирующих векторов, которые содержат вирусные точки начала репликации, клетки-хозяева можно трансформировать ДНК, контролируемой соответствующими контрольными элементами экспрессии (например, последовательностями промотора, энхансера, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.д.), с селективным маркером. После введения чужеродной ДНК сконструированным клеткам можно позволить расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде, а затем клетки можно переключать на селективную среду. Селективный маркер в рекомбинантной плазмиде придает резистентность при селекции и позволяет клеткам стабильно встраивать плазмиду в хромосомы и расти с образованием очагов, которые, в свою очередь, можно клонировать и размножать в линии клеток. Данный способ можно преимущественно использовать для конструирования клеточных линий, которые стабильно экспрессируют молекулу антитела.

Можно использовать множество систем селекции, включая, но не ограничиваясь указанными, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., *Cell* 11 (1977), 223), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska and Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48 (1992), 202) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy et al., *Cell* 22 (1980), 817), которые можно применять в tk-, hgprrt- или argrrt-клетках, соответственно. Также в качестве основы для селекции можно использовать резистентность к антиметаболитам с помощью следующих генов: dhfr, который придает резистентность к метотрексату (Wigler et al., *Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), 357; O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 1527); gprt, который придает резистентность к микофеноловой кислоте (Mulligan and Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 2072); neo, который придает резистентность к аминогликозиду G-418 (Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12 (1993), 488-505; Wu and Wu, *Biotherapy* 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 (1993), 573-596; Mulligan, *Science* 260 (1993), 926-932 и Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62 (1993), 191-217; TIB TECH 11 (1993), 155-215); и hygrr, который придает резистентность к гигромицину (Santerre et al., *Gene* 30 (1984), 147). Способы, широко известные в области технологии рекомбинантной ДНК, которые можно применять, описаны в публикациях Ausubel et al. (eds.), *Current Pro-*

ocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); и в Главах 12 и 13 руководства Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberte-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981), которые включены посредством ссылки в настоящую заявку во всей своей полноте.

Уровни экспрессии молекулы антитела можно увеличивать посредством амплификации вектора (обзор см. в публикации Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987). Когда маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, является амплифицируемым, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клеток-хозяев, приведет к увеличению количества копий маркерного гена. Поскольку амплифицированная область связана с геном антитела, продукция антитела также будет возрастать; см. публикацию Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257.

Продукция *in vitro* позволяет проводить масштабирование для получения больших количеств желаемых полипептидов. Методики культивирования клеток млекопитающих в условиях культивирования тканевой известны в данной области техники и включают гомогенную суспензионную культуру, например, в аэролитном реакторе или в непрерывном реакторе с перемешиванием, либо иммобилизованные или захваченные культуры клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на микробусинах агарозы или керамических картриджах. При необходимости и/или желании растворы полипептидов можно очистить способами традиционной хроматографии, например, гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, хроматографии на DEAE-целлюлозе или (иммуно-) аффинной хроматографии, например, после предпочтительного биосинтеза синтетического полипептида шарнирной области либо до или после этапа хроматографии на основе гидрофобного взаимодействия, описанного в настоящей заявке.

Гены, кодирующие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению, можно также экспрессировать в клетках, отличных от клеток млекопитающих, таких как клетки бактерий или насекомых либо дрожжей или растений. Бактерии, которые легко поглощают нуклеиновые кислоты, включают членов семейства Enterobacteriaceae, таких как штаммы *E. coli* или *Salmonella*; семейства Bacillaceae, таких как *B. subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* и *Haemophilus influenzae*. Следует также понимать, что при экспрессии в бактериях гетерологичные полипептиды, как правило, становятся частью телец включения. Гетерологичные полипептиды необходимо выделять, очищать, а затем собирать в функциональные молекулы. Когда желаемыми являются тетравалентные формы антитела, субъединицы затем будут подвергаться самосборке в тетравалентные антитела; см., например, международную заявку WO 02/096948.

В бактериальных системах количество экспрессирующих векторов можно преимущественно выбирать в зависимости от предполагаемого применения экспрессируемой молекулы антитела. Например, когда намереваются продуцировать большое количество такого белка для получения фармацевтических композиций молекулы антитела, могут быть желательными векторы, которые направляют экспрессию высоких уровней слитых белковых продуктов, которые легко очистить. Такие векторы включают, но не ограничены указанными, экспрессирующий вектор pUR278 *E. coli* (Ruther et al., EMBO J. 2 (1983), 1791), в котором кодирующая антитело последовательность может быть лигирована индивидуально в вектор в рамке считывания с областью, кодирующей *lacZ*, так, чтобы продуцировался слитый белок; векторы pIN (Inouye and Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke and Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509); и т.п. Для экспрессии чужеродных полипептидов в качестве слитых белков с глутатион-S-трансферазой (GST) также можно использовать векторы pGEX. Как правило, такие слитые белки являются растворимыми, и их можно легко очищать из лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матрицей на основе бусин глутатион-агарозы, с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX конструируют так, чтобы данные векторы содержали сайты расщепления тромбином или протеазой фактора Ха, так, чтобы продукт клонированного гена-мишени мог высвободиться от группы GST.

В дополнение к прокариотам также можно использовать эукариотические микроорганизмы. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, наиболее часто используются среди эукариотических микроорганизмов, хотя широко доступно множество других штаммов, например, *Pichia pastoris*. Для экспрессии в *Saccharomyces* обычно используют, например, плазмиду YRp7 (Stinchcomb et al., Nature 282 (1979), 39; Kingsman et al., Gene 7 (1979), 141; Tschemper et al., Gene 10 (1980), 157). Данная плазида уже содержит ген TRP1, который обеспечивает селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, лишённого способности расти на триптофане, например, ATCC № 44076 или PEP4-1 (Jones, Genetics 85 (1977), 12). Затем наличие повреждения *trp1* в качестве характеристики генома дрожжевых клеток-хозяев обеспечивает эффективное окружение для обнаружения трансформации благодаря росту в отсутствие триптофана.

В системе насекомых в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов, как правило, используют вирус ядерного полиэдрома *Autographa californica* (AcNPV). Данный вирус растёт в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующую антитело последовательность можно клонировать индивидуально в области вируса, не являющиеся необходимыми (например, ген полиэдрина), и помещать под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина).



После того, как молекула антитела согласно настоящему изобретению была получена в результате рекомбинантной экспрессии, целые антитела, димеры антител, индивидуальные легкую и тяжелую цепи или другие формы иммуноглобулина согласно настоящему изобретению можно очищать согласно стандартным процедурам данной области техники, включая, например, хроматографию (например, ионообменную, аффинную, в частности, на основе аффинности к специфичному антигену после хроматографии с белком А, и колоночную хроматографию на основе размера), центрифугирование, дифференциальную растворимость, например, преципитацию сульфатом аммония, или любую другую стандартную методику очистки белков; см., например, руководство Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). В качестве альтернативы, предпочтительный способ увеличения аффинности антител согласно настоящему изобретению описан в публикации патента США № 2002-0123057. Вследствие этого согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении также предложен способ получения антитела против ТТР или антитела, распознающего мутантные, неправильно свернутые, неправильно собранные или агрегированные формы ТТР и/или фрагменты указанных форм либо иммуноглобулиновой цепи (или цепей) указанного антитела, причем указанный способ включает:

(a) культивирование клетки-хозяина, как определено в настоящей заявке выше, причем указанная клетка содержит полинуклеотид или вектор, как определено где-либо в настоящей заявке; и

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

Более того, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение также относится к антителу либо иммуноглобулиновой цепи (или цепям) указанного антитела, которое кодируется полинуклеотидом, как определено в настоящей заявке выше, или которое получают посредством способа получения антитела против ТТР.

#### V. Слитые белки и конъюгаты

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения полипептид антитела содержит аминокислотную последовательность либо одну или несколько групп, обычно не связанных с антителом. Примеры модификаций описаны более подробно ниже. Например, одноцепочечный Fv-фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может содержать последовательность подвижного линкера или может быть модифицированным с добавлением функциональной группы (например, ПЭГ, лекарственного препарата, токсина или метки, такой как флуоресцентная, радиоактивная, ферментная, ядерно-магнитная метка, тяжелый металл и т.п.).

Полипептид антитела согласно настоящему изобретению может содержать, по существу состоять или состоять из слитого белка. Слитые белки представляют собой химерные молекулы, которые содержат, например, ТТР-связывающий домен иммуноглобулина с по меньшей мере одним сайтом связывания мишени и по меньшей мере один гетерологичный участок, т.е. участок, с которым указанный домен не связан в природе естественным образом. Аминокислотные последовательности могут в норме существовать в отдельных белках, которые объединены в полипептиде слияния, или данные последовательности могут в норме существовать в одном белке, но размещаются в новом расположении в полипептиде слияния. Слитые белки можно получить, например, посредством химического синтеза или посредством получения и трансляции полинуклеотида, в котором пептидные области кодируются в желаемой взаимосвязи.

Термин "гетерологичный", применяемый к полинуклеотиду или полипептиду, означает, что данный полинуклеотид или полипептид получен из структуры, отличающейся от остальной части структуры, с которой сравнивают данный полинуклеотид или полипептид. Например, в настоящей заявке "гетерологичный полипептид", подлежащий слиянию с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, вариантом или аналогом указанного антитела, получают из полипептида, отличного от иммуноглобулина, того же вида, либо из полипептида отличного вида, отличного от иммуноглобулина, или являющегося иммуноглобулином. Как обсуждается более подробно в других разделах настоящей заявки, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению могут быть также рекомбинантным способом слитыми с гетерологичным полипептидом на N- или C-конце или химическим способом конъюгированы (включая ковалентную и нековалентную конъюгацию) с полипептидами или другими композициями. Например, антитела могут быть рекомбинантным способом слиты или конъюгированы с молекулами, подходящими в качестве меток в анализах обнаружения, и эффекторными молекулами, такими как гетерологичные полипептиды, лекарственные препараты, радионуклиды или токсины; см., например, международные заявки WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; патент США № 5314995; и заявку на европейский патент EP 0396387.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению могут состоять из аминокислот, соединенных друг с другом пептидной связью или модифицированной пептидной связью, т.е. пептидных изостер, и могут содержать аминокислоты, отличные от 20 аминокислот, кодируемых генами. Антитела могут быть модифицированы в результате природных процессов, таких как посттрансляционный процессинг, или способами химической модификации, которые хорошо известны в данной области техники. Такие модификации хорошо описаны в основных руководствах и в более подробных монографиях, а также в многоотомной научной литера-

туре. Модификации могут происходить в любой части антитела, включая пептидный скелет, боковые цепи аминокислот и amino- или карбоксильные концы, либо в таких группах, как углеводы. Следует принимать во внимание, что один тип модификации может присутствовать в одинаковой или в различной степени в нескольких участках в данном антителе. Также данное антитело может содержать множество типов модификаций. Антитела могут являться разветвленными, например, в результате убиквитинилирования, и могут являться циклическими с ветвлением или без такового. Циклические, разветвленные и разветвленные циклические антитела могут быть получены в результате посттрансляционных природных процессов либо синтетическими способами. Модификации включают ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, присоединение ковалентным способом флавина, присоединение ковалентным способом группы гема, присоединение ковалентным способом нуклеотида или производного нуклеотида, присоединение ковалентным способом липида или производного липида, присоединение ковалентным способом фосфатидилинозитола, перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидных связей, деметилирование, образование ковалентных перекрестных сшивок, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование ГФИ-якоря, гидроксиприрование, иодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатацию, опосредуемое транспортной РНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование и убиквитинилирование; см., например, публикации *Proteins - Structure And Molecular Properties*, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993); *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, (1983) 1-12; Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182 (1990), 626-646; Rattan et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 663 (1992), 48-62.

В настоящем изобретении также предложены слитые белки, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела, и гетерологичный полипептид. Согласно одному варианту реализации слитый белок согласно настоящему изобретению содержит, по существу состоит или состоит из полипептида, содержащего аминокислотную последовательность любой одной или нескольких областей  $V_H$  антитела согласно настоящему изобретению или аминокислотную последовательность любой одной или нескольких областей  $V_L$  антитела согласно настоящему изобретению либо фрагментов или вариантов указанного антитела, и последовательность гетерологичного полипептида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения слитый белок для применения в способах диагностики и лечения, раскрытых в настоящей заявке, содержит, по существу состоит или состоит из полипептида, содержащего аминокислотную последовательность любой одной, двух, трех из  $V_H$ -CDR антитела либо фрагментов, вариантов или производных указанного антитела, или аминокислотную последовательность любой одной, двух, трех из  $V_L$ -CDR антитела либо фрагментов, вариантов или производных указанного антитела, и последовательность гетерологичного полипептида. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения слитый белок содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность  $V_H$ -CDR3 антитела согласно настоящему изобретению либо фрагмента, производного или варианта указанного антитела, и последовательность гетерологичного полипептида, причем указанный слитый белок специфично связывается с ТТР. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения слитый белок содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере одной области  $V_H$  антитела согласно настоящему изобретению и аминокислотную последовательность по меньшей мере одной области  $V_L$  антитела согласно настоящему изобретению либо фрагментов, производных или вариантов указанного антитела, и последовательность гетерологичного полипептида. Предпочтительно области  $V_H$  и  $V_L$  слитого белка соответствуют антителу из одного источника (или scFv- или Fab-фрагменту), которое специфично связывается с ТТР. Согласно третьему варианту реализации настоящего изобретения слитый белок для применения в способах диагностики и лечения, раскрытых в настоящей заявке, содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность любой одной, двух, трех или более из CDR  $V_H$  антитела и аминокислотную последовательность любой одной, двух, трех или более из CDR  $V_L$  антитела либо фрагментов или вариантов указанного антитела, и последовательность гетерологичного полипептида. Предпочтительно две, три, четыре, пять, шесть или более из  $V_H$ -CDR или  $V_L$ -CDR соответствуют антителу из одного источника (или scFv- или Fab-фрагменту) согласно настоящему изобретению. Также настоящее изобретение охватывает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие данные слитые белки.

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

Например, согласно одному варианту реализации ПЭГ можно конъюгировать с антителами согласно настоящему изобретению для увеличения периода полужизни данных антител *in vivo*; см, например, публикации Leong et al., *Cytokine* 16 (2001), 106; *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54 (2002), 531; или Weir et al., *Biochem. Soc. Transactions* 30 (2002), 512.

Более того, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению можно подвергать слиянию с маркерными последовательностями, такими как пептид, для упрощения очистки или обнаружения указанных антител. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения маркерная аминокислотная последовательность представляет собой гексагистидиновый пептид (HIS), такой как метка, введенная в вектор pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), помимо прочих, многие из которых являются коммерчески доступными. Как описано в публикации Gentz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), 821-824, например, гексагистидин обеспечивает удобную очистку слитого белка. Другие пептидные метки, подходящие для очистки, включают, но не ограничены указанными, метку "HA", которая соответствует эпиту, полученному из белка гемагглютинина вируса гриппа (Wilson et al., *Cell* 37 (1984), 767), GST, c-mycand, метку "flag"; обзор методик мечения эпитопов см., например, в публикации Bill Brizzard, *BioTechniques* 44 (2008) 693-695, а также в табл. 1 на стр. 694 указанной публикации, в которой приведены наиболее распространенные метки эпитопов, применимые в настоящем изобретении, объект исследования которых явным образом включен в настоящую заявку посредством ссылки (Brizzard et al., *Biotechniques* 16(4) 730-735 (1994)).

Слитые белки можно получить с применением способов, хорошо известных в данной области техники; см., например патенты США №№ 5116964 и 5225538. Точный сайт, по которому проводят слияние, можно выбрать эмпирически для оптимизации секреции или характеристик связывания слитого белка. Затем ДНК, кодирующую слитый белок, трансфицируют в клетку-хозяин для экспрессии, которую проводят, как описано в настоящей заявке выше.

Антитела согласно настоящему изобретению можно использовать в неконъюгированной форме или можно конъюгировать с по меньшей мере одной из множества молекул, например, для улучшения терапевтических свойств молекулы, для облегчения обнаружения мишени или для визуализации или терапии пациента. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению можно метить или конъюгировать до или после очистки, если проводят очистку. В частности, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению можно конъюгировать с терапевтическими средствами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа, фармацевтическими средствами или ПЭГ.

Конъюгаты, которые представляют собой иммунотоксины, включая общепринятые антитела, были широко описаны в данной области техники. Токсины могут быть соединены с антителами посредством общепринятых методик слияния или иммунотоксины, содержащие белковые части токсинов, можно получить в виде слитых белков. Антитела согласно настоящему изобретению можно применять соответствующим способом для получения таких иммунотоксинов. Примерами таких иммунотоксинов являются таковые, описанные в публикациях Byers, *Seminars Cell. Biol.* 2 (1991), 59-70 и Fanger, *Immunol. Today* 12 (1991), 51-54.

Специалисты в данной области техники понимают, что конъюгаты также можно собирать с применением множества методик, в зависимости от выбранного средства, подлежащего конъюгации. Например, конъюгаты с биотином получают, например, путем реакции ТТР-связывающего полипептида с активированным сложным эфиром биотина, таким как N-гидроксисукцинимидный эфир биотина. Аналогично, конъюгаты с флуоресцентным маркером можно получать в присутствии присоединяющего средства, например, средств, перечисленных в настоящей заявке, или посредством реакции с изотиоцианатом, предпочтительно, флуоресцеин-изотиоцианатом. Конъюгаты антител или антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных указанных антител согласно настоящему изобретению получают аналогичным способом.

Настоящее изобретение также включает антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные указанных антител согласно настоящему изобретению, конъюгированные с диагностическим или терапевтическим средством. Антитела можно использовать в диагностических целях, например, для демонстрации присутствия ТТР амилоидоза для определения риска развития заболевания или нарушения, связанного с неправильно свернутым, неправильно собранным или агрегированным ТТР, для контроля развития или прогрессирования такого заболевания, т.е. заболевания, при котором наблюдается возникновение агрегированного неправильно свернутого, неправильно собранного ТТР, или заболевания, связанного с агрегированным неправильно свернутым, неправильно собранным ТТР, либо в качестве части процедуры клинического исследования, например, для определения эффективности данного режима лечения и/или профилактики. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу, которое является меченным обнаруживаемой меткой. Более того, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу, присоединенному к лекарственному препарату. Обнаружение можно облегчить путем связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с меткой.

звующего фрагмента, варианта или производного указанного антитела с поддающимся обнаружению веществом. Поддающиеся обнаружению вещества или метка могут представлять собой, как правило, фермент; тяжелый металл, предпочтительно, золото; краситель, предпочтительно, флуоресцентный или люминесцентный краситель; или радиоактивную метку. Примеры поддающихся обнаружению веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, биолюминесцентные вещества, радиоактивные вещества, позитронно-активные металлы при использовании различных способов позитронно-эмиссионной томографии и нерадиоактивные ионы парамагнитных металлов; см., например, патент США № 4741900 в случае ионов металлов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в качестве диагностических средств в соответствии с настоящим изобретением. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных веществ включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеина изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин-флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного вещества включает люминол; примеры биолюминесцентных веществ включают люциферазу, люциферин и экворин; и примеры подходящего радиоактивного вещества включают  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{99}\text{Tc}$ . Вследствие этого согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложено меченное обнаруживаемой меткой антитело, причем указанная обнаруживаемая метка выбрана из группы, включающей фермент, радиоактивный изотоп, флуорофор и тяжелый металл.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела также можно пометить обнаруживаемой меткой посредством присоединения указанного антитела к хемилюминесцентному соединению. Затем присутствие меченого хемилюминесцентным соединением антитела определяют посредством обнаружения наличия люминесценции, которая появляется в ходе химической реакции. Примерами особенно подходящих хемилюминесцентных соединений для мечения являются люминол, изолюминол, тероматический сложный эфир акридиния, имидазол, соль акридиния и сложный эфир щавелевой кислоты.

Одним из путей, посредством которого антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела можно пометить обнаруживаемой меткой, является присоединение указанного антитела к ферменту и применение связанного продукта в иммуноферментном анализе (ИФА) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md, Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, (ed), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, et al., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kogaku Shoin, Tokyo (1981). Фермент, который присоединен к антителу, прореагирует с соответствующим субстратом, предпочтительно, хромогенным субстратом, таким образом, чтобы получить химическую группу, которую можно обнаружить, например, спектрофотометрическим, флюорометрическим или визуальными способами. Ферменты, которые можно применять для мечения антитела обнаруживаемой меткой, включают, но не ограничены указанными, малатдегидрогеназу, стафилококковую нуклеазу, изомеразу дельта-5-стероида, алкогольдегидрогеназу дрожжей, альфа-глицерофосфатдегидрогеназу, триозофосфатизомеразу, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, аспарагиназу, глюкозооксидазу, бета-галактозидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, глюкоамилазу и ацетилхолинэстеразу. Дополнительно, обнаружение можно проводить колориметрическими способами, в которых используют хромогенный субстрат фермента. Помимо этого, обнаружение можно осуществлять посредством колориметрических способов, в которых применяют хромогенный субстрат фермента. Обнаружение можно также осуществлять посредством визуального сравнения степени ферментативной реакции субстрата со стандартами, приготовленными аналогичным способом.

Обнаружение можно также проводить с применением любого из множества других вариантов иммуноанализа. Например, в результате мечения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного указанного антитела радиоактивной меткой можно обнаружить антитело посредством применения радиоиммуноанализа (РИА) (см., например, руководство Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (March, 1986)), которое включено в настоящую заявку посредством ссылки). Радиоактивный изотоп можно обнаружить с применением, включая, но не ограничиваясь указанными, счетчика гамма-частиц, сцинтилляционного счетчика или авторадиографии.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное указанного антитела можно также пометить обнаруживаемой меткой с применением излучающих флуоресценцию металлов, таких как  $^{152}\text{Eu}$  или другие металлы-лантаноиды. Данные металлы можно присоединить к антителу с применением таких металл-хелатирующих групп, как диэтиленetriаминпентауксусная кислота (ДТРА) или этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA).

Методики конъюгирования различных групп с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, вариантом или производным указанного антитела хорошо известны, см., например, публикации Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And

Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1987) 623-53; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), (1985) 475-506; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press (1985) 303-16 и Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62 (1982), 119-158.

Как было упомянуто, согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения можно конъюгировать группу, которая усиливает стабильность или эффективность связывающей молекулы, например, связывающего полипептида, например, антитела или иммуноспецифичного фрагмента указанного антитела. Например, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения со связывающими молекулами согласно настоящему изобретению можно конъюгировать ПЭГ для увеличения периода полужизни указанных молекул *in vivo*. Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; или Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

#### VI. Композиции и способы применения

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим вышеупомянутую ТТР-связывающую молекулу, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела согласно настоящему изобретению либо производное или вариант указанного антитела, или к полинуклеотиду, вектору, клетке или пептиду согласно настоящему изобретению, как определено где-либо в настоящей заявке. Согласно одному варианту реализации композиция согласно настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию и дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. Более того, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать дополнительные средства, такие как интерлейкины или интерфероны, в зависимости от предполагаемого применения фармацевтической композиции. Для применения при лечении заболевания или нарушения, при котором наблюдается возникновение мутантного, неправильно свернутого, неправильно собранного или агрегированного ТТР, либо которое связано с указанными формами ТТР, такого как ТТР амилоидоз, дополнительное средство можно выбрать из группы, включающей малые органические молекулы, антитела против ТТР и комбинации указанных средств.

Следовательно, согласно конкретному предпочтительному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению ТТР-связывающей молекулы, например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела согласно настоящему изобретению или связывающей молекулы, которая характеризуется по существу такой же специфичностью связывания, как и указанная молекула, к применению полинуклеотида, вектора или клетки согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической или диагностической композиции для профилактического и терапевтического лечения заболевания или нарушения, связанного с ТТР амилоидозом, контроля прогрессирования заболевания или нарушения, связанного с ТТР амилоидозом, или ответа на лечение ТТР амилоидоза у субъекта или для определения риска развития у субъекта заболевания или нарушения, связанного с ТТР амилоидозом.

Следовательно, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, которое характеризуется аномальным накоплением и/или отложением ТТР и/или неправильно свернутого, неправильно собранного, агрегированного, мутантного ТТР в пораженных системах и органах, таких как периферическая нервная система, автономная нервная система, центральная нервная система, желудочно-кишечная система, сосудистая система, в особенности мягкая и паутинная оболочки мозга, лимфатическая система, в особенности лимфатические узлы, мышечно-скелетная система, в особенности сухожилия и связки, сердце, глаза, почки, легкие, кожа, язык, щитовидная железа и мочевого пузыря, причем указанный способ включает введение субъекту, который нуждается в таком введении, терапевтически эффективного количества любого из вышеуказанных ТТР-связывающих молекул, антител, полинуклеотидов, векторов, клеток или пептидов согласно настоящему изобретению.

Особенное преимущество терапевтического подхода согласно настоящему изобретению заключается в том, что рекомбинантные антитела согласно настоящему изобретению получены из В-клеток или В-клеток памяти здоровых субъектов-людей, у которых отсутствуют признаки или симптомы заболевания, например, несущих бессимптомную мутацию и/или мутации, при которых наблюдается возникновение агрегированного ТТР или которые связаны с агрегированным ТТР и, таким образом, являются с определенной вероятностью способными к предотвращению клинической манифестации заболевания, связанного с неправильно свернутым, неправильно собранным, мутантным и/или агрегированным ТТР, или к снижению риска возникновения клинической манифестации заболевания или нарушения, либо к отсрочиванию манифестации или прогрессирования клинической манифестации заболевания или нарушения. Как правило, антитела согласно настоящему изобретению также уже успешно подверглись соматическому созреванию, т.е. оптимизации в отношении селективности и эффективности при высокоаффинном связывании с молекулой-мишенью ТТР посредством соматической вариации варибельных областей антитела.

Информация о том, что такие клетки *in vivo*, например, у человека, не были активированы родственными или другими физиологическими белками или структурами клетки в отношении аутоиммунологической или аллергической реакции, также имеет большое медицинское значение, поскольку означает значительно увеличенную вероятность успешного выживания в течение фаз клинического исследования. Можно сказать, что еще до доклинической и клинической разработки уже были продемонстрированы эффективность, приемлемость и переносимость профилактического или терапевтического антитела у по меньшей мере одного субъекта-человека. Вследствие этого можно ожидать, что как специфичная к структуре мишени эффективность в качестве терапевтического средства, так и уменьшенная вероятность побочных эффектов антител против ТТР человека согласно настоящему изобретению значительно увеличит клиническую вероятность успеха при применении данных антител.

В настоящем изобретении также предложены фармацевтическая и диагностическая, соответственно, упаковка или набор, содержащие один или несколько контейнеров, наполненных одним или несколькими из вышеописанных компонентов, например антителом против ТТР, связывающим фрагментом, производным или вариантом указанного антитела, полинуклеотидом, вектором, клеткой и/или пептидом согласно настоящему изобретению. С таким контейнером (контейнерами) может быть связано указание в форме, предусмотренной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу лекарственных средств или биологических продуктов, причем данное указание отражает одобрение органом, регулирующим производство, применение или продажу, для введения человеку. Кроме того или в качестве альтернативы, набор содержит реактивы и/или инструкции по применению в соответствующих диагностических анализах. Композиция, например, набор согласно настоящему изобретению, разумеется, является в особенности подходящей для оценки риска, диагностики, предотвращения и лечения заболевания или нарушения, которое сопровождается наличием мутантного, неправильно свернутого, неправильно собранного и/или агрегированного ТТР, и в особенности применимым для лечения нарушений, которые, как правило, характеризуются ТТР амилоидозом, включая заболевания и/или нарушения, такие как семейная амилоидная полинейропатия (САП), семейная амилоидная кардиомиопатия (САК), старческий системный амилоидоз (ССА), системный семейный амилоидоз, лептоменингеальный амилоидоз/ амилоидоз центральной нервной системы (ЦНС), в том числе болезнь Альцгеймера, связанный с ТТР амилоидоз глаз, связанный с ТТР амилоидоз почек, связанная с ТТР гипертироксинемия, связанный с ТТР амилоидоз связок, включая синдром запястного канала, разрывы ротаторной манжеты и стеноз позвоночного канала поясничного отдела, и предэклампию.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены в состав в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники; см., например, руководство Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают фосфатные буферные солевые растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих средств, стерильные растворы и т.д. Композиции, содержащие такие носители, могут быть приготовлены в состав посредством хорошо известных общепринятых способов. Данные фармацевтические композиции можно вводить субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций можно осуществлять различными путями, например, внутривенным, интраперитонеальным, подкожным, внутримышечным, интраназальным, местным или интрадермальным введением или посредством доставки в спинной или головной мозг. Составы на основе аэрозолей, такие как составы назального спрея, включают очищенные водные или другие растворы активного средства с консервирующими средствами и изотоническими средствами. Такие составы предпочтительно доводят до значения pH и изотонического состояния, совместимого со слизистой оболочкой полости носа. Составы для ректального или вагинального введения могут быть предложены в виде суппозитория с подходящим носителем.

Режим введения доз будет определен лечащим врачом и клиническими факторами. Как хорошо известно в области медицины, дозы для любого пациента зависят от множества факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные препараты, которые вводят одновременно. Типичная доза может находиться, например, в диапазоне от 0,001 до 1000 мкг (или представлять собой нуклеиновую кислоту для экспрессии или для ингибирования экспрессии в данном диапазоне); однако также предусмотрены дозы ниже или выше данного иллюстративного диапазона, в особенности принимая во внимание вышеуказанные факторы. Как правило, дозирование может варьировать, например, от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и более часто от 0,01 до 5 мг/кг (например, 0,02, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 мг/кг и т.д.) массы тела реципиента. Например, дозирования могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела либо могут находиться в диапазоне от 1 до 10 мг/кг, предпочтительно, по меньшей мере 1 мг/кг. Дозы, которые являются промежуточными в вышеуказанных диапазонах, также включены в объем настоящего изобретения. Субъектам можно вводить такие дозы ежедневно, через день, еженедельно или в соответствии с любым другим режимом, определенным в результате эмпирического анализа. Иллюстративное лечение предусматривает введение в нескольких дозированиях в течение длительного периода времени, например, по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные иллюстративные режимы лечения

предусматривают введение один раз в две недели или один раз в месяц, или один раз в 3-6 месяцев. Иллюстративные режимы дозирования включают 1-10 или 15 мг/кг каждый день, 30 мг/кг через день или 60 мг/кг еженедельно. Согласно некоторым способам два или более моноклональных антител с различными специфичностями связывания вводят одновременно, и в данном случае дозирование каждого вводимого антитела попадает в указанные диапазоны. Прогресс можно наблюдать посредством периодической оценки. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртово-водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе солевые и буферные среды. Наполнители средств для парентерального введения включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактатные растворы Рингера или нелетучие масла. Наполнители средств для внутривенного введения включают жидкие и питательные добавки, электролитические добавки (например, на основе декстрозы Рингера) и т.п. Могут присутствовать также консерванты и другие добавки, например, антимикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства и инертные газы и т.п. Более того, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать дополнительные средства, такие как дофамин, или психофармакологические лекарственные препараты, в зависимости от предполагаемого применения фармацевтической композиции.

Более того, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция может быть приготовлена в состав в качестве вакцины, например, если фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит антитело против ТТР или связывающий фрагмент, производное или вариант указанного антитела для пассивной иммунизации. Как было упомянуто во вступительном разделе, неправильно свернутые, неправильно собранные, мутантные и/или агрегированные формы ТТР и/или фрагменты или производные указанных форм являются основным триггерным фактором ТТР амилоидоза. Соответственно, логично ожидать, что пассивная иммунизация антителами человека против ТТР и эквивалентными ТТР-связывающими молекулами согласно настоящему изобретению поможет избежать некоторых нежелательных эффектов, свойственных терапии на основе активной иммунизации, и приведет к уменьшению агрегации ТТР. Вследствие этого представленные антитела против ТТР и эквиваленты указанных антител согласно настоящему изобретению будут в особенности подходящими в качестве вакцины для предотвращения или смягчения заболеваний или нарушений, при которых наблюдается наличие агрегированного ТТР, или вызванных агрегированным ТТР, таких как, например, семейная амилоидная полинейропатия (САП), семейная амилоидная кардиомиопатия (САК), старческий системный амилоидоз (ССА), системный семейный амилоидоз, лептоменингеальный амилоидоз/ амилоидоз центральной нервной системы (ЦНС), в том числе болезнь Альцгеймера, связанный с ТТР амилоидоз глаз, связанный с ТТР амилоидоз почек, связанная с ТТР гипертироксинемия, связанный с ТТР амилоидоз связок, включая синдром запястного канала, разрывы ротаторной манжеты и стеноз позвоночного канала поясничного отдела, и предэклампися.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения применение рекомбинантных Fab (rFab) и одноцепочечных фрагментов (scFv) антитела согласно настоящему изобретению, которые могут легче проникать через мембрану клетки, может характеризоваться преимуществом. Например, в публикации Robert et al., Protein Eng. Des. Sel. (2008); S1741-0134, предварительно опубликованной он-лайн, описано применение химерного рекомбинантного Fab (rFab) и одноцепочечных фрагментов (scFv) моноклонального антитела WO-2, которое распознает эпитоп в N-концевой области Abeta. Сконструированные фрагменты были способны (i) предотвращать фибриллизацию амилоида, (ii) дезагрегировать ранее образованные фибриллы Abeta-42 и (iii) ингибировать опосредованную олигомером Abeta-42 нейротоксичность *in vitro* так же эффективно, как и целая молекула IgG. Предполагаемые преимущества применения малых сконструированных форматов антитела на основе Fab и scFv, в которых отсутствует эффекторная функция, включают более эффективное прохождение через гематоэнцефалический барьер и минимизацию риска запуска воспалительных побочных реакций. Также помимо того, что scFv и однодоменные антитела сохраняют специфичность связывания полноразмерного антитела, данные антитела можно экспрессировать в качестве отдельных генов и внутриклеточным способом в клетках млекопитающих в виде интрател с возможностью изменения фолдинга, взаимодействий, модификаций или внутриклеточной локализации мишеней указанных антител; обзор см., например, в публикации Miller and Messer, Molecular Therapy 12 (2005), 394-401.

В другом подходе Muller et al., Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241 описывают технологическую платформу так называемой "Технологии суперантител", которая, как сообщают, делает возможным проникновение антител в живые клетки без ущерба для последних. Такие проникающие в клетки антитела открывают новые диагностические и терапевтические возможности. Для обозначения данных антител был предложен термин "TransMabs".

Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения может быть желательным совместное введение или последовательное введение других антител, подходящих для лечения заболевания или нарушения, связанного с возникновением мутантного, неправильно свернутого, неправильно соб-

ранного и/или агрегированного ТТР. Согласно одному варианту реализации дополнительное антитело содержится в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры антител, которые можно применять для лечения субъекта, включают, но не ограничены указанными, антитела, нацеленные на CD33, SGLT2, ИЛ-6 и ИЛ-1.

Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения может быть желательным совместное введение или последовательное введение других средств, подходящих для лечения заболевания или нарушения, связанного с неправильно свернутым, неправильно собранным, мутантным и/или агрегированным ТТР. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения дополнительное средство содержится в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры средств, которые можно применять для лечения субъекта, включают, но не ограничены указанными: средства, стабилизирующие тетрамер ТТР, такие как тафамидис меглумин, дифлузилал, доксициклин с урсодезоксихолевой кислотой; противовоспалительные средства, такие как дифлузилал, кортикостероиды, 2-(2,6-дихлоранилиламино)фенилуксусную кислоту (диклофенак), изобутил-пропановую-фенольную кислоту (ибупрофен); диуретики, галлат эпигаллокатехина, гидрохлорид мелфалана, дексаметазон, бортезомиб, бортезомиб-мелфалан, бортезомиб-дексаметазон, мелфалан-дексаметазон, бортезомиб-мелфалан-дексаметазон; антидепрессанты, антипсихотические лекарственные препараты, нейролептические средства, средства против слабоумия (например, антагонист NMDA-рецептора мемантин), ингибиторы ацетилхолинэстеразы (например, донепезил-HCl, ривастигмин, галантамин), антагонисты глутамата и другие ноотропные лекарственные средства, корректирующие давление крови (например, дигидралазин, метилдопа), цитостатики, глюкокортикоиды, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ); противовоспалительные средства или любую комбинацию указанных средств. Примеры средств, которые можно использовать для лечения или предотвращения отторжения органа после клинической трансплантации органа, включают, но не ограничены указанными, группу средств, которые приводят к ослаблению иммунной системы, т.е. иммуносупрессивных средств, включающих такие средства, как ингибиторы кальциневрина, такие как циклоспорин и такролимус, ингибиторы пролиферации, такие как ингибиторы mTOR, в том числе эверолимус и сиролимус (рапамицин); также можно применять антимаболизиты, такие как азатиоприн, микофенолата мофетил/MMF и микофеноловая кислота, и кортикостероиды, такие как кортизон и кортизол, а также синтетические вещества, такие как преднизон или преднизолон. Помимо этого, можно применять антитела, такие как моноклональные антитела против рецептора ИЛ-2 (например, базиликсимаб, даклизумаб), а также моноклональные антитела против CD3 (например, муromонаб-CD3) и поликлональные композиции, такие как антитимоцитарный глобулин (ATG); и агонисты рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) (см., например, публикацию Noguchi et al., Acta Med. Okayama, 60 (2006) и международную заявку WO 2012/088157). Более того, дополнительные средства могут включать средства для профилактики и/или лечения инфекций и других побочных эффектов после трансплантации органов, в том числе валганцикловир, иммуноглобулины против вируса цитомегалии, ганцикловир, амфотерицин В, пириметамин, ранитидин, рамиприл, фуросемид, бензбромарон. Вследствие этого, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения также предложена композиция, содержащая дополнительное средство, подходящее для лечения ТТР амилоидоза и/или для лечения или предотвращения отторжения органа после, например, клинической трансплантации печени. Примеры других средств, которые могут использоваться одновременно с фармацевтическими композициями согласно настоящему изобретению, описаны в данной области техники; см., например международные заявки WO 2009005672, WO 2010128092, WO 2012088157 или европейскую заявку EP 11158212.8.

Терапевтически эффективная доза или количество означает такое количество активного компонента, которого достаточно для смягчения симптомов или состояния. Терапевтическую эффективность и токсичность таких соединений можно определить посредством стандартных фармацевтических процедур в культурах клеток или на лабораторных животных, например, измеряя ED<sub>50</sub> (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции) и LD<sub>50</sub> (доза, летальная у 50% популяции). Соотношение доз между терапевтическим и токсичным эффектами представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено в виде соотношения LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>.

Исходя из вышесказанного, очевидно, что настоящее изобретение включает любое применение ТТР-связывающей молекулы и/или фрагментов указанной молекулы, содержащих по меньшей мере одну CDR вышеописанного антитела, в частности, для диагностики и/или лечения заболевания или нарушения, связанного с мутантными, неправильно свернутыми, неправильно собранными или агрегированными формами ТТР и/или фрагментами указанных форм, как было упомянуто выше, такого как ТТР амилоидоз. Предпочтительно, указанная связывающая молекула представляет собой антитело согласно настоящему изобретению или иммуноглобулиновую цепь указанного антитела. Кроме того, настоящее изобретение относится к антиидиотипическим антителам любого из упомянутых антител, описанных в настоящей заявке выше. Данные антитела представляют собой антитела или другие связывающие молекулы, которые связываются с уникальной антигенной пептидной последовательностью, расположенной в вариативной области антитела поблизости от антигенсвязывающего сайта, и являются подходящими, например, для обнаружения антител против ТТР в образце, полученном от субъекта. Таким образом, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложено антитело, как определено в



настоящей заявке выше и ниже, или ТТР-связывающая молекула, которая характеризуется по существу такой же специфичностью связывания, как и указанное антитело, полинуклеотид, вектор или клетка, как определено в настоящей заявке, или фармацевтическая или диагностическая композиция, содержащая любой из указанных объектов, для применения в профилактическом лечении, терапевтическом лечении и/или контроле прогрессирования или ответа на лечение заболевания или нарушения, связанного с ТТР, причем указанное нарушение предпочтительно выбрано из группы, включающей семейную амилоидную полинейропатию (САП), семейную амилоидную кардиомиопатию (САК), старческий системный амилоидоз (ССА), системный семейный амилоидоз, лептоменингеальный амилоидоз/ амилоидоз центральной нервной системы (ЦНС), в том числе болезнь Альцгеймера, связанный с ТТР амилоидоз глаз, связанный с ТТР амилоидоз почек, связанную с ТТР гипертироксинемию, связанный с ТТР амилоидоз связок, включая синдром запястного канала, разрывы ротаторной манжеты и стеноз позвоночного канала поясничного отдела, и предэклампию. Приведенную выше группу заболеваний или нарушений называют группой нарушений, связанных с ТТР амилоидозом.

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к диагностической композиции, содержащей любую из вышеописанных ТТР-связывающих молекул, антител, антигенсвязывающих фрагментов, полинуклеотидов, векторов, клеток и/или пептидов согласно настоящему изобретению и необязательно подходящие средства обнаружения, такие как реактивы, которые общепринято используют в диагностических способах на основе иммуноанализа или нуклеиновых кислот. Антитела согласно настоящему изобретению подходят, например, для применения в иммуноанализах, в которых указанные антитела можно применять в жидкой фазе или присоединенными к твердофазному носителю. Примеры иммуноанализов, в которых можно применять антитело согласно настоящему изобретению, включают конкурентные и неконкурентные иммуноанализы прямого или непрямого формата. Примерами таких иммуноанализов являются радиоиммуноанализ (РИА), "сэндвич" (иммунометрический анализ), проточная цитометрия и анализ методом вестернблоттинга. Антигены и антитела согласно настоящему изобретению можно присоединить к множеству различных носителей и использовать для выделения клеток, специфично связавшихся с указанными антителами. Примеры хорошо известных носителей включают стекло, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозы, природные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, агарозы и магнетит. В контексте настоящего изобретения природа носителя может являться растворимой или нерастворимой. Существует множество различных меток и способов мечения, известных средним специалистам в данной области техники. Примеры типов меток, которые можно применять в настоящем изобретении, включают ферменты, радиоактивные изотопы, коллоидные металлы, флуоресцентные соединения, хемилюминесцентные соединения и биолюминесцентные соединения; см. также варианты реализации, которые обсуждаются в настоящей заявке выше.

Согласно следующим вариантам реализации ТТР-связывающие молекулы, в частности, антитела согласно настоящему изобретению, можно также применять в способе диагностики заболевания или нарушения у индивидуума посредством получения образца жидкости организма от исследуемого индивидуума, который может представлять собой образец крови, образец плазмы, образец сыворотки, образец лимфы или образец любой другой жидкости организма, такой как образец слюны или мочи, и посредством осуществления контакта образца жидкости организма с антителом согласно настоящему изобретению в условиях, которые делают возможным образование комплексов антитело-антиген. Затем уровень таких комплексов определяют способами, известными в данной области техники; уровень, значительно превышающий таковой, образованный в контрольном образце, свидетельствует о заболевании или нарушении у исследуемого индивидуума. Аналогичным образом можно также применять специфичный антиген, связываемый антителами согласно настоящему изобретению. Таким образом, настоящее изобретение относится к иммуноанализу *in vitro*, включающему связывающую молекулу, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела согласно настоящему изобретению.

Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения ТТР-связывающие молекулы, в частности, антитела согласно настоящему изобретению, можно также применять в способе диагностики заболевания или нарушения у индивидуума посредством получения биопсии от исследуемого индивидуума, которая может представлять собой биопсию кожи, слюнных желез, корней волос, сердца, толстой кишки, нервов, биопсию подкожного жира или биопсию любых пораженных органов.

В данном контексте настоящее изобретение также относится к средствам, конкретно предназначенным для данной цели. Например, можно использовать матрицу на основе антител, на которую, например, нанесены антитела или эквивалентные антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению, которые специфично распознают ТТР. Дизайн вариантов микроматричного анализа обобщен в публикации Kusnezow et al., *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Соответственно, настоящее изобретение также относится к микроматрицам с нанесенными ТТР-связывающими молекулами, идентифицированными в соответствии с настоящим изобретением.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу диагностики заболевания или нарушения, связанного с мутантными, неправильно свернутыми, неправильно собранными и/или агрегированными формами ТТР и/или фрагментами указанных форм у субъекта, причем ука-

занный способ включает определение наличия ТТР и/или неправильно свернутого, неправильно собранного или агрегированного ТТР в образце от субъекта для проведения диагностики с применением по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению, ТТР-связывающего фрагмента указанного антитела или ТТР-связывающей молекулы, которые характеризуются по существу такой же специфичностью связывания, как и любое из указанных антител, причем наличие патологически мутантного, неправильно свернутого, неправильно собранного или агрегированного ТТР свидетельствует о ТТР амилоидозе, и увеличение уровня патологически неправильно свернутого, неправильно собранного или агрегированного ТТР по сравнению с уровнем физиологического ТТР свидетельствует о прогрессирующей ТТР амилоидоза у указанного субъекта.

Субъект, которому будет поставлен диагноз, может являться бессимптомным или доклиническим по отношению к заболеванию. Предпочтительно, контрольный субъект страдает от заболевания, связанного с неправильно свернутым, неправильно собранным или агрегированным ТТР, например, от семейной амилоидной полинейропатии (САП), семейной амилоидной кардиомиопатии (САК) или старческого системного амилоидоза (ССА), причем подобие между уровнем патологически неправильно свернутого, неправильно собранного или агрегированного ТТР и эталонным стандартом свидетельствует, что субъект, которому будет поставлен диагноз, страдает от ТТР амилоидоза или подвержен риску развития ТТР амилоидоза. В качестве альтернативы или дополнительно в качестве второго контроля, контрольный субъект не страдает от ТТР амилоидоза, причем разница между уровнем физиологического ТТР и/или неправильно свернутого, неправильно собранного или агрегированного ТТР и эталонным стандартом свидетельствует, что субъект, которому будет поставлен диагноз, страдает от ТТР амилоидоза или подвержен риску развития ТТР амилоидоза. Предпочтительно субъект, которому будет поставлен диагноз, и контрольный субъект (субъекты) находятся в соответствующей возрастной группе. Образец, анализ которого проводят, может представлять собой любую жидкость организма, предположительно содержащую патологически неправильно свернутый, неправильно собранный или агрегированный ТТР, например, кровь, плазму крови, сыворотку крови, мочу, перитонеальную жидкость, слюну или спинномозговую жидкость (СМЖ).

Уровень физиологического ТТР и/или патологически неправильно свернутого, неправильно собранного или агрегированного ТТР можно оценить любым подходящим способом, известным в данной области техники, включая, например, проведение анализа ТТР с применением одной или нескольких методик, выбранных из вестернблоттинга, иммунопреципитации, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммуноанализа (РИА), сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), двумерного гель-электрофореза, масс-спектропии (МС), времяпролетной МС с лазерной ионизацией и десорбцией из матрицы (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-MS, MALDI-TOF), времяпролетной усиленной поверхностью лазерной ионизации и десорбции (surface-enhanced laser desorption ionization-time of flight, SELDI-TOF), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), жидкостной экспресс-хроматографии белков (ЖЭХБ), многомерной жидкостной хроматографии (ЖХ) с последующей тандемной масс-спектрометрией (МС/МС) и лазерной денситометрии. Предпочтительно, указанная визуализация ТТР *in vivo* включает сцинтиграфию, позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭКТ), оптическую визуализацию в ближней инфракрасной (ИК) области или магнитно-резонансную визуализацию (МРВ).

Согласно следующему аспекту настоящее изобретение относится к диагностике ТТР амилоидоза, контролю лечения данного заболевания и определению диагностической или терапевтической применимости лекарственного препарата против ТТР в бестканевом и безбиопсийном, т.е. неинвазивном способе.

В норме концентрация агрегатов ТТР и/или неправильно свернутого ТТР, которую можно обнаружить в жидкости организма, например, плазме крови, является очень низкой, и вследствие этого диагностика ТТР амилоидоза является тяжелой и требует больших временных затрат. В частности, диагностика заболеваний ТТР амилоидоза представляет собой трудный и длительный процесс, поскольку при данных заболеваниях наблюдаются весьма подобные признаки и симптомы, так что постановка надлежащим образом оформленного диагноза семейной амилоидной полинейропатии (САП), семейной амилоидной кардиомиопатии (САК) и старческого системного амилоидоза (ССА), как правило, требует отбора биопсий ткани и обнаружения отложений амилоида ТТР с применением методик комплексного гистологического окрашивания. Поскольку биопсии тканей являются весьма небольшими, а отложения амилоида ТТР рассредоточены, гистологическое определение ТТР амилоидоза, как правило, сопряжено с высокой частотой ложноотрицательных результатов и задержек для пациентов.

Однако в соответствии с настоящим изобретением можно неожиданно показать, что после единичного введения заявленного антитела против ТТР стало возможным измерение агрегатов и/или неправильно свернутого ТТР, связанного с антителами против ТТР, в крови; см. пример 13 и фиг. 14. Вследствие этого, вероятно, благодаря уникальному свойству антител против ТТР согласно настоящему изобретению удалять ТТР из амилоидогенных отложений ТТР и транспортировать в кровь, был разработан новый способ диагностики нарушений, связанных с неправильно свернутым, мутантным и/или агрегированным ТТР у пациента или субъекта, причем указанный способ потенциально способен заменить биопсию ткани и гистологический анализ в процессе диагностики заболеваний ТТР амилоида. Данный спо-

соб основан на применении антител, специфичных к патологической конформации белка ТТР, которые инъецируют пациенту и используют для определения наличия неправильно свернутого и/или агрегированного белка ТТР где-либо в организме пациента. После небольшой паузы, например, составляющей 2 дня после инъекции антитела пациенту, образец крови отбирают и используют для обнаружения того, было ли антитело захвачено и отделило ли частицы неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР из отложения ТТР. Основным преимуществом данного способа по сравнению с гистологическим анализом является инъекция антител против ТТР непосредственно пациентам, в результате которой кровообращение позволяет указанным антителам циркулировать по каждой ткани и органу, и проводить обнаружение отложений неправильно свернутого и/или агрегированного белка ТТР независимо от локализации данных отложений.

Таким образом, согласно следующему аспекту настоящее изобретение относится к способу диагностики заболевания, связанного с ТТР амилоидозом, причем указанный способ включает проведение анализа уровня неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце от субъекта после введения субъекту антитела против ТТР, причем наличие или увеличенный уровень неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце субъекта по сравнению с контролем, таким как образец, полученный от субъекта перед введением антитела против ТТР, свидетельствует о заболевании, связанном с ТТР амилоидозом. Более того, поскольку, как показано в примере 13, новый способ также является подходящим для характеристики лекарственных препаратов против ТТР и курса лечения ТТР амилоидоза, соответственно, новый способ согласно настоящему изобретению также предназначен для контроля лечения заболевания антителом против ТТР или для определения диагностической или терапевтической применимости антитела против ТТР. В данном контексте специалист в данной области техники понимает, что способ согласно настоящему изобретению не ограничен исследованием терапевтической применимости и эффективности антител против ТТР, но также применим к другим типам лекарственных препаратов против ТТР, способных разрушать отложения амилоида ТТР. Например, антитело против ТТР согласно настоящему изобретению можно вводить в сочетании с другим лекарственным препаратом против ТТР, и уровень неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце субъекта, который получил лечение, сравнивают с контролем, полученным от субъекта перед введением антител против ТТР и лекарственного препарата против ТТР, но только после лечения антителом против ТТР.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, в частности, при применении у животных, отличных от человека, для исследования рекомбинантных антител, полученных от человека, как проиллюстрировано в примере 13, и других антител против ТТР, предназначенных для применения у человека, как правило, уровень неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце анализируют посредством определения комплекса, образовавшегося между антителами против ТТР и неправильно свернутым и/или агрегированным ТТР, например, посредством иммунопреципитации с иммуноглобулинами против IgG человека или антиидиотипическим антителом. В качестве альтернативы, можно использовать второе антитело против ТТР, которое распознает эпитоп на ТТР, по существу отличный от эпитопа антитела против ТТР - кандидата для использования в качестве лекарственного препарата, - чтобы связать комплекс, образованный антителом против ТТР - кандидатом для использования в качестве лекарственного препарата - и ТТР, и посредством этого обнаружить присутствие данного комплекса, например, методом ELISA или иммунопреципитации.

В отношении диагностического аспекта, в частности, в случае субъектов и пациентов, которые представляют собой людей, наличие и увеличенный уровень неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР и комплекса ТТР с антителом против ТТР, соответственно, свидетельствует о наличии отложений амилоида ТТР в организме человека, например, в сердце, периферической нервной системе (ПНС), глазах, мышцах, желудочно-кишечном тракте, почках, сосудистой системе и центральной нервной системе (ЦНС) пациента или субъекта. Таким образом, способ согласно настоящему изобретению, с одной стороны, позволяет проводить обнаружение и определение заболеваний, связанных с ТТР амилоидозом, в организме субъекта и, с другой стороны, удалять отложения ТТР из организма пациента, тем самым также свидетельствуя о терапевтическом прогрессе проводимого лечения и эффективности лекарственного препарата, специфичного к ТТР амилоидозу, такого как антитело против ТТР.

Следовательно, как продемонстрировано в примере 13, антитело против ТТР согласно настоящему изобретению способно к связыванию с неправильно свернутым и/или агрегированным ТТР с достаточной аффинностью для изменения стабильности патологических отложений ТТР, например, для захвата и выделения неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР из отложений в жидкость организма, в частности, в кровь.

Антитело против ТТР, применяемое в соответствии со способом согласно настоящему изобретению, может представлять собой любое антитело против ТТР, специфичное к патологической конформации ТТР, т.е. неправильно свернутому, мутантному и/или агрегированному ТТР. Однако согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения антитело против ТТР, которое применяют в бестканевом способе, представляет собой антитело против ТТР или ТТР-связывающую молекулу согласно настоящему изобретению, описанную в настоящей заявке и проиллюстрированную в примерах.

В данном контексте антитело против ТТР можно модифицировать и, например, присоединить к

метке, поддающейся обнаружению, как описано для любого из других вариантов реализации в настоящей заявке выше. Кроме того, к новому анализу амилоида ТТР согласно настоящему изобретению могут быть приспособлены варианты иммуноанализа, такие как вестернблоттинг, дот-блот, ("сэндвич") ELISA и т.п., известные в данной области техники и описанные для других диагностических способов и областей применения на основе антител против ТТР и пептида согласно настоящему изобретению.

Как показано в примере 13 и на фиг. 14, с применением анализа амилоида ТТР можно показать, что антитела против ТТР согласно настоящему изобретению способны захватывать и отделять неправильно свернутый и/или агрегированный ТТР из отложений амилоида ТТР, и соответствующие иммунокомплексы можно измерять в образце жидкости организма, в частности, крови пациента или субъекта; см. пример 13 и фиг. 14. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело против ТТР может связываться с неправильно свернутым и/или агрегированным ТТР с достаточной аффинностью для изменения конечного оттока неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР, например, из сердца, периферической нервной системы (ПНС), глаз, мышц, желудочно-кишечного тракта, почек, сосудистой системы и центральной нервной системы (ЦНС).

Образец жидкости организма, предпочтительно, крови или СМЖ от субъекта, в котором присутствует захваченный и отделенный неправильно свернутый и/или агрегированный ТТР, связанный с антителом против ТТР, получают в течение определенного промежутка времени после введения. Данный определенный промежуток времени после введения, как правило, составляет менее одной недели. Согласно предпочтительному варианту реализации данный промежуток времени после введения антитела против ТТР составляет 48 часов или менее.

Как было упомянуто выше, бестканевой способ, описанный выше, можно также применять для определения успешности лечения, т.е. посредством измерения захвата неправильно свернутых и/или агрегированных форм ТТР антителами против ТТР до и после лечения. Таким образом, согласно следующему или дополнительному варианту реализации бестканевой способ согласно настоящему изобретению может дополнительно включать сравнение уровня неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце жидкости организма с образцом, полученным от субъекта перед введением антитела против ТТР. Соответственно, согласно одному варианту реализации способ согласно настоящему изобретению используют для определения эффективности лечения ТТР амилоидоза или для контроля прогрессирования заболевания или состояния, связанного с патологическим ТТР, у пациента или субъекта.

Как было упомянуто, образцы от субъектов, применяемые в способах, описанных выше, могут быть получены до или после введения антитела против ТТР. Однако образцы могут также быть получены из медицинского учреждения или от практикующих врачей, а также из других организаций, в которых могут быть получены клинические образцы от субъекта. Учреждения, врачи и т.д. могут не только осуществлять введение антитела против ТТР субъекту и отбор подходящих образцов для применения в вышеуказанном способе, но и наблюдать и/или лечить пациента, например, посредством варьирования количества, времени, частоты введения антитела, прекращения терапии, замены антитела против ТТР по меньшей мере другим антителом или терапевтическим средством против ТТР либо объединения антитела против ТТР с по меньшей мере другим указанным средством. Уровень ТТР можно оценивать любым подходящим способом, известным в данной области техники. Подходящие способы описаны ниже и в международной заявке WO 2013/066818, содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению или ТТР-связывающая молекула, которая характеризуется по существу такой же специфичностью связывания, как и любое из указанных антител, полинуклеотид, вектор или клетка, как определено в настоящей заявке выше, или фармацевтическая или диагностическая композиция, содержащая любой из указанных объектов, предложены для применения при профилактическом лечении, терапевтическом лечении и/или контроле прогрессирования или ответа на лечение заболевания или нарушения, связанного с ТТР. Таким образом, настоящее изобретение, в целом, также относится к способу диагностики или контроля прогрессирования заболевания или нарушения, связанного с ТТР (такого как ТТР амилоидоз) у субъекта, причем указанный способ включает определение наличия ТТР в образце от субъекта для проведения диагностики с применением по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению или ТТР-связывающей молекулы, которая характеризуется по существу такой же специфичностью связывания, как и любое из указанных антител, причем наличие мутантных, неправильно свернутых, неправильно собранных или агрегированных форм ТТР либо фрагментов указанных форм свидетельствует о заболевании или нарушении. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен указанный способ диагностики или контроля прогрессирования ТТР амилоидоза у субъекта, причем указанный способ включает определение наличия мутантного, неправильно свернутого, неправильно собранного или агрегированного ТТР и/или фрагментов указанных форм в образце от субъекта для проведения диагностики с применением по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению или ТТР-связывающей молекулы, которая характеризуется по существу такой же специфичностью связывания, как и любое из указанных антител, причем наличие мутантного, неправильно свернутого, неправильно собранного или агрегированного ТТР и/или фрагмента указанных форм свидетельствует о пред-

дсимптоматическом, продромальном или клиническом ТТР амилоидозе; увеличение уровня олигомеров, агрегатов или фибрилл ТТР по сравнению с уровнем физиологического ТТР или по сравнению с эталонным образцом, полученным от здорового контрольного субъекта, или контрольным образцом от такого же субъекта, свидетельствует о прогрессировании предсимптоматического, продромального или установленного ТТР амилоидоза. Специалист в данной области техники понимает, что согласно одному варианту реализации указанный способ используют также для диагностики или контроля прогрессирования любого другого заболевания или нарушения, выбранного из группы нарушений, связанных с ТТР, как определено в настоящей заявке выше.

Как указано выше, антитела согласно настоящему изобретению, фрагменты указанных антител и молекулы, которые характеризуются такой же специфичностью связывания, как и антитела и фрагменты указанных антител, можно использовать не только *in vitro*, но также и *in vivo*, причем, помимо диагностического, также можно осуществлять терапевтическое применение. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение также относится к ТТР-связывающей молекуле, содержащей по меньшей мере одну CDR антитела согласно настоящему изобретению, для получения композиции для обнаружения/визуализации *in vivo* или для нацеливания терапевтического и/или диагностического средства к ТТР в организме человека или животного. Потенциальные терапевтические и/или диагностические средства могут быть выбраны из неполного перечня терапевтических средств, подходящих для лечения ТТР амилоидоза, и потенциальных меток, указанных в настоящей заявке выше. В отношении визуализации *in vivo* согласно предпочтительному варианту реализации в настоящем изобретении предложена указанная ТТР-связывающая молекула, содержащая по меньшей мере одну CDR антитела согласно настоящему изобретению, причем указанная визуализация *in vivo* включает сцинтиграфию, позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭКТ), оптическую визуализацию в ближней инфракрасной (ИК) области или магнитно-резонансную визуализацию (МРВ). Согласно следующему варианту реализации в настоящем изобретении также предложена указанная ТТР-связывающая молекула, содержащая по меньшей мере одну CDR антитела согласно настоящему изобретению, либо указанная молекула для получения композиции для способов указанной выше визуализации *in vivo*, для применения в способе диагностики или контроля прогрессирования заболевания или нарушения, связанного с ТТР, у субъекта, как определено в настоящей заявке выше.

#### VII. Пептиды с эпитопами ТТР, специфичными к агрегации

Согласно следующему аспекту настоящее изобретение относится к пептидам, содержащим эпитоп ТТР, который специфично распознается любым антителом согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, такой пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 или в SEQ ID NO: 51, в качестве уникального линейного эпитопа, распознаваемого антителом, или модифицированной указанной последовательности, в которой были заменены, удалены и/или добавлены одна или несколько аминокислот, причем указанный пептид распознается любым антителом согласно настоящему изобретению, предпочтительно, антителом NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1 или NI-301.12D3.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения такой пептид можно использовать для диагностики или контроля заболевания или нарушения, связанного с неправильно свернутыми, неправильно собранными или агрегированными формами ТТР и/или фрагментами указанных форм у субъекта, такого как ТТР амилоидоз, причем указанная диагностика или контроль включает этап определения наличия антитела, которое связывается с пептидом в биологическом образце указанного субъекта, и используется для диагностики такого заболевания у указанного субъекта посредством измерения уровней антител, которые распознают вышеописанный пептид согласно настоящему изобретению, и сравнения измерений с уровнями, которые обнаружены у здоровых субъектов сопоставимого возраста и пола. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу диагностики ТТР амилоидоза, свидетельствующему о предсимптоматическом или клиническом САП и/или САК у субъекта, причем указанный способ включает этап определения наличия антитела, которое связывается с пептидом, как определено выше, в биологическом образце указанного субъекта. В соответствии с данным способом увеличенный уровень измеренных антител, специфичных к указанному пептиду согласно настоящему изобретению, свидетельствует о диагностике у указанного субъекта предсимптоматического или клинического САП и/или САК либо о диагностике у указанного субъекта любого другого заболевания или нарушения, выбранного из группы нарушений, связанных с ТТР, как определено в настоящей заявке выше. Более того, поскольку пептид согласно настоящему изобретению содержит эпитоп терапевтически эффективного антитела, полученного от человека, такой пептид можно, разумеется, использовать в качестве антигена, т.е. иммуногена, для вызова иммунного ответа у субъекта и стимуляции продукции антитела согласно настоящему изобретению *in vivo*. Пептид согласно настоящему изобретению может быть приготовлен в состав в любой матрице, наборе и композиции, такой как вакцина, соответственно, как описано в настоящей заявке выше. В данном контексте настоящее изобретение также относится к набору, подходящему для диагностики или контроля прогрессирования ТТР амилоидоза, причем указанный набор содержит по меньшей мере одно антитело согласно настоящему изобретению или ТТР-связывающую молекулу, которая характеризуется по существу такой же специфичностью свя-

звания, как и любое из указанных антител, полинуклеотид, вектор или клетку и/или пептид, как соответственно определено в настоящей заявке выше, необязательно вместе с реактивами и/или инструкциями по применению.

Данные и другие варианты реализации раскрыты и включены в настоящее описание и примеры настоящего изобретения. Дополнительную литературу относительно любого из материалов, способов, областей применения и соединений, применяемых в соответствии с настоящим изобретением, можно получить из общедоступных библиотек и баз данных с применением, например, электронных устройств. Например, можно использовать общедоступную базу данных "Medline", которая организована Национальным центром биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information, NCBI) и/или Национальной библиотекой медицины Национального института здоровья (National Library of Medicine at the National Institutes of Health, NLM.NIH). Дополнительные базы данных и веб-адреса, такие как базы данных Европейского института биоинформатики (European Bioinformatics Institute, EBI), который является частью Европейской лаборатории молекулярной биологии (European Molecular Biology Laboratory, EMBL), известны специалистам в данной области техники, и такие базы данных можно также найти с применением поисковых сервисов. Обзор патентной информации в области биотехнологии и исследование соответствующих источников патентной информации, подходящей для ретроспективного поиска и для текущего информирования, приведены в публикации Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

Приведенное выше описание, в целом, определяет настоящее изобретение. Если не указано обратное, определение терминов в настоящей заявке дано в соответствии с Оксфордским словарем биохимии и молекулярной биологии (Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, пересмотрен в 2000 году и переиздан в 2003 году, ISBN 0 19 850673 2). По тексту настоящей спецификации цитируются некоторые документы. Полные библиографические ссылки можно найти в конце спецификации непосредственно перед формулой изобретения. Содержание всех цитируемых источников (включая литературные источники, выданные патенты, опубликованные заявки на патент, ссылки на которые содержатся по всей настоящей спецификации, включая вступительный раздел и спецификации производителя, инструкции и т.д.) явным образом включено в настоящую заявку посредством ссылки; однако это не является признанием того, что любой документ, на который приведена ссылка, в действительности представляет собой уровень техники в отношении настоящего изобретения. Более полное понимание может быть получено на основе следующих конкретных примеров, которые предложены в настоящей заявке исключительно с целью иллюстрации и не предназначены ограничить объем настоящего изобретения.

### Примеры

#### Пример 1. Выделение и обнаружение антител против ТТР

Полученные от человека антитела, нацеленные на ТТР и/или мутантные, неправильно свернутые, неправильно собранные и/или агрегированные формы ТТР и/или фрагменты указанных форм, были обнаружены с применением способа, описанного в международной заявке WO 2008/081008, содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки, с модификациями. В частности, белок ТТР человека дикого типа, полученный посредством очистки из плазмы человека, и белки ТТР дикого типа и мутантные белки ТТР, полученные посредством рекомбинантной экспрессии, использовали как в нативной, так и в неправильно свернутой/агрегированной конформации для обнаружения антител, нацеленных на ТТР. Неправильно свернутая/агрегированная конформация была получена *in vitro* в кислых условиях с применением процедуры, подобной таковой, описанной в публикации Colon W. et al, Biochemistry, 31 (1992), 8654-8660, с незначительными модификациями.

#### Пример 2. Определение последовательности антитела

Аминокислотные последовательности переменных областей вышеуказанных антител против ТТР определяли на основе последовательностей мРНК данных антител, см. фиг. 1. Вкратце, собирали живые В-клетки из выбранных неиммortalизованных культур В-клеток памяти. Затем экстрагировали мРНК из клеток, продуцирующих выбранные антитела против ТТР, преобразовывали мРНК в кДНК, и последовательности, кодирующие переменные области антитела, амплифицировали методом ПЦР, клонировали в плазмидные векторы и секвенировали. Вкратце, для амплификации лидерных пептидов, V-сегментов и J-сегментов использовали комбинацию праймеров, представляющих все семейства последовательностей репертуара иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Первый раунд амплификации проводили с применением праймеров, специфичных к лидерному пептиду, на 5'-конце и праймеров, специфичных к константной области, на 3'-конце (Smith et al., Nat Protoc. 4 (2009), 372-384). Для тяжелых цепей и легких цепей каппа второй раунд амплификации проводили с применением праймеров, специфичных к V-сегменту, на 5'-конце и праймеров, специфичных к J-сегменту, на 3'-конце. Для легких цепей лямбда второй раунд амплификации проводили с применением праймеров, специфичных к V-сегменту, на 5'-конце и праймера, специфичного к C-области, на 3'-конце (Marks et al., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597; de Haard et al., J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230).

Обнаружение клона антитела с желаемой специфичностью проводили посредством повторного скрининга методом ELISA после рекомбинантной экспрессии целых антител. Рекомбинантную экспрессию целых антител IgG1 человека проводили после встраивания последовательностей переменных об-

ластей тяжелой и легкой цепей "в правильную рамку считывания" в экспрессирующие векторы, которые дополняют последовательность вариабельной области последовательностью, кодирующей лидерный пептид, на 5'-конце и последовательностью, кодирующей подходящий константный домен (домены), на 3'-конце. С данной целью праймеры содержали сайты рестрикции, сконструированные для облегчения клонирования последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепей в векторы, экспрессирующие антитело. Тяжелые цепи иммуноглобулинов экспрессировали посредством встраивания продукта ОТ-ПЦР тяжелой цепи иммуноглобулина в рамку считывания в экспрессирующий вектор тяжелой цепи, несущий сигнальный пептид и константные домены иммуноглобулина гамма 1 человека или мыши. Легкую цепь каппа иммуноглобулинов экспрессировали посредством встраивания продукта ОТ-ПЦР легкой цепи каппа в рамку считывания в экспрессирующий вектор легкой цепи, обеспечивающий сигнальный пептид и константный домен легкой цепи каппа иммуноглобулина человека. Легкую цепь лямбда иммуноглобулинов экспрессировали посредством встраивания продукта ОТ-ПЦР легкой цепи лямбда в рамку считывания в экспрессирующий вектор легкой цепи лямбда, обеспечивающий сигнальный пептид и константный домен легкой цепи лямбда иммуноглобулина человека или мыши.

Функциональные рекомбинантные моноклональные антитела после котрансфекции клеток НЕК 293 или СНО (или любой другой подходящей реципиентной линии клеток, полученной от человека или мыши) вектором, экспрессирующим тяжелую цепь Ig, и вектором, экспрессирующим легкую цепь каппа или лямбда Ig. Затем рекомбинантное моноклональное антитело человека очищали от кондиционной среды с применением стандартной очистки на колонке с белком А. Рекомбинантное моноклональное антитело человека можно получить в неограниченных количествах с применением временно или стабильно трансфицированных клеток. Линии клеток, продуцирующие рекомбинантное моноклональное антитело человека, можно получить непосредственно с применением векторов, экспрессирующих Ig, или посредством повторного клонирования вариабельных областей Ig в различных экспрессирующих векторах. Также могут быть получены производные, такие как F(ab), F(ab)<sub>2</sub> и scFv, данных вариабельных областей Ig.

Каркасные области и области, определяющие комплементарность, определяли посредством сравнения с последовательностями эталонного антитела, доступными в базах данных, таких как Abysis (<http://www.bioinf.org.uk/abysis/>), и аннотированными с применением схемы нумерации согласно Кэботу (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>). Аминокислотные последовательности вариабельных областей заявленных антител NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1, NI-301.2F5, NI-301.28B3, NI-301.119C12, NI-301.5D8, NI-301.9D5, NI-301.104F5, NI-301.21F10, NI-301.9G12, NI-301.12D3, NI-301.37F1-PIMC, NI-301.44E4, NI-301.18C4, NI-301.11A10, NI-301.3C9, NI-301.14D8, NI-301.9X4 и NI-301.14C3 с указанием каркасных областей (FR) и областей, определяющих комплементарность (CDR), представлены на фиг. 1A-1T.

В дальнейшем была продемонстрирована высокая аффинность заявленных антител в отношении неправильно свернутой/агрегированной конформации ТТР и по существу отсутствие связывания с нативной конформацией ТТР дикого типа, что свидетельствует о высокой селективности в отношении мутантного, неправильно свернутого, неправильно собранного и/или агрегированного ТТР, в качестве примера, для антител NI-301.59.F1, NI-301.35G11 и NI-301.37F1. Однако предварительные эксперименты, проведенные с другими заявленными антителами, свидетельствуют по существу о таком же предпочтительном связывании с мутантным, неправильно свернутым, неправильно собранным и/или агрегированным ТТР по сравнению с физиологическими формами ТТР, подобном связыванию антител NI-301.59.F1, NI-301.35G11 и NI-301.37F1.

Пример 3. Аффинность связывания антител против ТТР с применением прямого ELISA и определения ЕС50

Способность антитела связываться с ТТР и/или неправильно свернутыми, неправильно собранными и/или агрегированными формами ТТР изучали посредством прямых анализов ELISA при варьирующих концентрациях антитела. Данный подход позволяет определять в анализе половинную максимальную эффективную концентрацию (ЕС50) каждого антитела, которую общепринято используют в качестве приблизительного показателя для оценки аффинности связывания антитела, см. фиг. 2. Вкратце, планшеты для ELISA (с высоким связыванием, из чистого полистирола, с половинным объемом лунок и плоским дном) сенсibilizировали неправильно свернутым/агрегированным ТТР человека дикого типа, неправильно свернутым/агрегированным рекомбинантным V30M-ТТР (оба были приготовлены, как описано в примере 1) и бычьим сывороточным альбумином (БСА) в концентрации 10 мкг/мл в фосфатно-буферном растворе (ФБР) в течение 1 ч при температуре 37°C, а затем блокировали раствором 2% БСА и 0,1% Tween-20 в ФБР (ФБР-Т) в течение 1 ч при комнатной температуре (к.т.). Антитела против ТТР разводили в ФБР в 11 различных концентрациях, варьирующих от 4 до 400 нМ, и инкубировали в планшетах для ELISA в течение ночи при температуре 4°C. После 3 промывок ФБР-Т планшеты для ELISA инкубировали с конъюгированным с ПХ вторичным антителом, специфичным к IgG человека, в течение 1 ч при к.т. (разведение 1/4000). После 3 промывок ФБР-Т реакции ELISA запускали добавлением тетраметилбензидина в течение ровно 10 мин при к.т. и количественно определяли посредством измерения оптической плотности при 450 нм (ОП450нм).

Иллюстративные антитела NI-301.59F1, NI-301.35G11 и NI-301.37F1 демонстрировали сильное свя-

зывание с неправильно свернутым/агрегированным ТТР дикого типа и мутантным ТТР, но не с контрольным БСА, см. фиг. 2А-С. Затем определяли значения ЕС50 антител посредством аппроксимации данных к нелинейной регрессии с применением метода наименьших квадратов с целью оценить аффинность связывания антитела в данных условиях.

Иллюстративные антитела NI-301.59F1, NI.35G11 и NI-301.37F1 демонстрировали высокую аффинность в отношении неправильно свернутого/агрегированного ТТР человека дикого типа, соответствующую ЕС50 3,0 нМ, 3,9 нМ и 0,35 нМ соответственно. Иллюстративные антитела также демонстрировали высокую аффинность в отношении неправильно свернутого/агрегированного рекомбинантного мутантного V30M-ТТР, соответствующую ЕС50 15,5 нМ, 5,0 нМ и 0,15 нМ соответственно.

Пример 4. Селективность связывания антител против ТТР с применением дот-блота

Для оценки селективности связывания антител против ТТР и/или фрагментов указанных антител в отношении нативной или неправильно свернутой, неправильно собранной и/или агрегированной конформации ТТР белок ТТР человека дикого типа в нативной или неправильно свернутой/агрегированной конформации и рекомбинантный белок V30M-ТТР в неправильно свернутой/агрегированной конформации разводили в ФБР в 4 различных концентрациях и наносили посредством вакуумного фильтрования на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану быстро высушивали (в течение 10 мин.) и блокировали 3% молоком в ФБР-Т в течение 1 ч при к.т., а затем инкубировали с антителами против ТТР в течение ночи при температуре 4°C. После 3 промывок ФБР-Т в течение 5 мин при к.т. мембрану инкубировали с подходящим вторичным антителом (конъюгированным с ПХ; разведение 1/10000) в течение 1 ч при к.т. После 3 промывок ФБР-Т мембрану обрабатывали люминолом, и интенсивность сигнала количественно определяли посредством измерения люминесценции.

Иллюстративное коммерческое антитело против ТТР связывалось с нативной, а также с неправильно свернутой/агрегированной конформацией ТТР с подобной аффинностью, что свидетельствует об отсутствии у данного антитела селективности связывания в отношении нативной или неправильно свернутой, неправильно собранной и/или агрегированной конформации ТТР, см. фиг. 3А. Напротив, иллюстративные антитела NI-301.59.F1, NI-301.35G11 и NI-301.37F1 связывались с высокой аффинностью исключительно с неправильно свернутой/агрегированной конформацией ТТР и не продемонстрировали связывания с нативной конформацией ТТР, что свидетельствует о высокой селективности в отношении неправильно свернутого, неправильно собранного и/или агрегированного ТТР (фиг. 3 В2, С2, D2). Соответственно, антитела NI-301.35G11 и NI-301.37F1 также продемонстрировали сильное связывание с неправильно свернутым/агрегированным рекомбинантным белком V30M-ТТР, как представлено на фиг. 3 С3 и D3.

Чтобы дополнительно охарактеризовать селективность связывания антитела, различные препараты ТТР, включая конформацию дикого типа и мутантную, нативную и неправильно свернутую/агрегированную конформацию, а также набор из 12 образцов плазмы человека обрабатывали аналогичным способом для проведения анализа методом дот-блота с применением химерных антител мыши против ТТР и конъюгированного с ПХ вторичного антитела против IgG2a мыши для обнаружения (фиг. 6).

Коммерческое антитело демонстрировало сильное связывание со всеми препаратами ТТР, включая препарат ТТР дикого типа и препараты мутантного, нативного и неправильно свернутого/агрегированного ТТР, и обнаруживало ТТР во всех образцах плазмы человека. Данные результаты дополнительно демонстрируют отсутствие селективности в отношении нативной или агрегированной конформации, см. фиг. 6А. Напротив, иллюстративное химерное антитело мыши NI-301.mur35G11 демонстрировало очень сильное связывание с образцом неправильно свернутого/агрегированного ТТР дикого типа (фиг. 6 С1), а также сильное связывание с мутантным белком V30M-ТТР (фиг. 6 С4) и с мутантным белком Y78F-ТТР (фиг. 6 С6). Однако антитело NI-301.mur35G11 не связывалось с ТТР в образцах плазмы человека. Данные результаты дополнительно демонстрируют высокую селективность NI-301.mur35G11 в отношении мутантного, неправильно свернутого, неправильно собранного и/или агрегированного белка ТТР.

Пример 5. Специфичность и селективность связывания антител против ТТР с применением вестерн-блоттинга

Специфичность и селективность связывания антител против ТТР изучали методом вестерн-блоттинга, см. фиг. 4. Вкратце, белок ТТР человека дикого типа (300 нг) в нативной или неправильно свернутой/агрегированной конформации и экстракт из печени мыши дикого типа (10 мкг суммарного белка) наносили на гель ДСН-ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану с применением системы полусухого переноса. Затем мембрану блокировали 2% БСА в ФБР-Т в течение 1 ч при к.т. и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C с антителом против ТТР, разведенным в блокирующем буфере. После 4 промывок ФБР-Т в течение 5 мин при к.т. мембрану инкубировали с подходящим вторичным антителом (конъюгированными с ПХ; разведение 1/10000 в блокирующем буфере) в течение 1 ч при к.т. После 3 промывок ФБР-Т и итоговой промывки ФБР мембрану обрабатывали люминолом, и интенсивность сигнала количественно определяли посредством измерения люминесценции. Незадолго до использования образец неправильно свернутого/агрегированного ТТР перекрестно сшивали с глутаральдегидом



(1%, 5 мин., 37°C) для предотвращения диссоциации агрегатов ТТР в процессе подготовки к ДСН-ПААГ. Напротив, образец нативного ТТР не подвергали перекрестному сшиванию перед применением, так что гомотетрамер ТТР (который представляет собой нативную конформацию ТТР в физиологических условиях) практически полностью диссоциировал на мономеры и димеры.

Коммерческое антитело против ТТР продемонстрировало очень сильное связывание с мономерами и димерами ТТР из образца нативного ТТР человека (фиг. 4 А1), и аналогично сильное связывание с перекрестно-сшитым образцом неправильно свернутого/агрегированного ТТР (фиг. 4 А2), что свидетельствует об отсутствии селективности в отношении нативной или неправильно свернутой, неправильно собранной и/или агрегированной конформации ТТР. Напротив, иллюстративные антитела против ТТР NI-301.59F1, NI-301.35G11 и NI-301.37F1 продемонстрировали очень сильное связывание с перекрестно-сшитым образцом неправильно свернутого/агрегированного ТТР (фиг. 4 В2, С2, D2), но полное отсутствие связывания с мономерами и димерами ТТР из образца нативного ТТР человека (фиг. 4В1, С1, D1), что свидетельствует о высокой селективности в отношении неправильно свернутой, неправильно собранной и/или агрегированной конформации ТТР в отличие от нативных конформаций ТТР.

Помимо этого коммерческое и иллюстративное антитела против ТТР характеризовались очень низкими уровнями связывания с белками, содержащимися в экстракте печени мыши (фиг. 4 А3, В3, С3, D3). Ввиду высокого количества белков печени, использованных для эксперимента, и высоких концентраций антител, а также принимая во внимание аффинности связывания антител, данный факт свидетельствует, что иллюстративные антитела характеризуются значительной специфичностью в отношении ТТР и по существу не связываются с другими белками. Более того, представляется, что иллюстративные антитела не связываются с белком ТТР мыши, который содержится на высоком уровне в экстракте печени мыши; данный результат свидетельствует, что иллюстративные антитела демонстрируют специфичность в отношении неправильно свернутого белка ТТР человека.

Однако эпитоп антитела NI-301.37F1 присутствует в белке ТТР крысы и мыши. Соответственно, для обнаружения неправильно свернутого ТТР решающей может являться не первичная аминокислотная последовательность эпитопа, а его конформация.

Чтобы дополнительно охарактеризовать способность связывания антитела с нативным белком ТТР или отсутствие такого связывания, оценивали способность иллюстративных антител связываться с белком ТТР, который содержится в образцах плазмы человека, с применением той же методики вестерн-блоттинга, как описано в настоящей заявке выше (фиг. 5). Единственное отличие в методике заключалось в срезании верхней части геля на уровне приблизительно 25-30 кДа и в применении только нижней части геля для переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану. Целью данной манипуляции было удаление тяжелых и легких цепей антител человека, присутствующих в высокой концентрации в образцах плазмы, которые могут потенциально препятствовать анализу.

В отличие от коммерческого антитела, использовавшегося в качестве эталонного, иллюстративные антитела NI-301.35G11 и NI-301.37F1 совершенно не обнаруживали белок ТТР человека, который содержится в образцах плазмы человека, что свидетельствует о селективности связывания в отношении конформации ТТР, которая не присутствует в проанализированных образцах в данных условиях.

Пример 6. Селективность связывания антител против ТТР в растворе с применением иммунопреципитации

Для дополнительного подтверждения селективности связывания антител против ТТР согласно настоящему изобретению белки ТТР человека дикого типа и рекомбинантный белок ТТР в нативной и неправильно свернутой/агрегированной конформации и образец плазмы человека в 3 различных разведениях в ФБР использовали для иммунопреципитации (ИП) ТТР. Вкратце, покрытые белком А магнитные бусины инкубировали с антителами против ТТР, разведенными в связывающем буфере производителя, в течение 30 мин при к.т. Комплекс антитело/белок А выделяли и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C с препаратами ТТР и образцами плазмы человека. После промывок комплекс антитело/белок А ресуспендировали в буфере SDS для нанесения, нагревали в течение 5 мин при температуре 90°C и обрабатывали для проведения анализа методом вестерн-блоттинга.

Как представлено на фиг. 7, иллюстративные антитела против ТТР NI-301.35G11 и NI-301.37F1, в отличие от коммерческого антитела против ТТР Dako A0002, продемонстрировали отсутствие связывания с образцами плазмы (фиг. 7 А7-9, В7-9, С7-9), а также отсутствие связывания с образцами нативного ТТР дикого типа и рекомбинантного ТТР (фиг. 7 В3, С3, В5, С5). Однако сильное связывание было зафиксировано в образце, в котором присутствовали неправильно свернутые/агрегированные формы ТТР (фиг. 7 В4, С4, В6, С6).

Данные результаты свидетельствуют, что иллюстративные антитела NI-301.35G11 и NI-301.37F1 способны к связыванию с неправильно свернутой, неправильно собранной и/или агрегированной конформацией ТТР в растворе и демонстрируют значительную селективность в отношении данных конформаций.

Пример 7. Связывание с патологическими агрегатами ТТР в ткани мыши с САП

Способность иллюстративных антител против ТТР к связыванию с патологическими и непатологическими белками ТТР, присутствующими в тканях трансгенных мышей, экспрессирующих исключи-

тельно белок V30M-ТТР человека и не экспрессирующих белок ТТР мыши (здесь и далее называемых мыши с САП), оценивали методом иммуногистохимии (ИГХ). Также оценивали неспецифичное связывание данных антител на тканях мышей, нокаутных по ТТР (ТТР-НА), не экспрессирующих какой-либо белок ТТР; соответствующие линии трансгенных и нокаутных мышей были изначально получены и описаны проф. Suichiro Maeda (Kohn K. et al., American Journal of Pathology 140(4) (1997), 1497-1508). Вкратце, иммуногистохимический анализ проводили на залитых парафином тканях мыши, разделенных на срезы толщиной 3-5 мкм. Сначала срезы освобождали от парафина, регидратировали и обрабатывали 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в метаноле в течение 20 мин при к.т. Наносили блокирующий буфер (ФБР + 5% сыворотка (лошади/козы) + 4% БСА) и выдерживали в течение 1 ч при к.т., после чего буфер заменяли антителом против ТТР, разведенным в ФБР, и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. После 3 промывок в ФБР срезы поочередно инкубировали с подходящими биотинилированными вторичными антителами (против IgG человека, против IgG кролика, разведение 1/125 в ФБР, инкубация в течение 1 ч при к.т.) и системой обнаружения авидин-ПХ (разведение 1/125 в ФБР, инкубация в течение 1 ч при к.т.). Реакцию запускали добавлением диаминобензидина в течение ровно 15 мин при к.т. Срезы тканей контрастно окрашивали гемалюмом в течение 1 мин при к.т., дегидратировали в восходящих концентрациях этанола и заклеивали покровными стеклами.

Как представлено на фиг. 8, коммерческое антитело против ТТР Dako A0002 образовывало интенсивное окрашивание на срезах печени и кишечника мышей с САП и не образовывало какого-либо окрашивания на соответствующих срезах ТТР-НА (фиг. 8 1А, 1В). Иллюстративное антитело против ТТР NI-301.35G11 образовывало окрашивание подобного характера и интенсивности на срезах печени и кишечника мышей с САП (фиг. 8 2А). Напротив, иллюстративное антитело NI-301.37F1 образовывало интенсивное окрашивание только на срезе кишечника, но не на срезе печени мыши с САП (фиг. 8 3А). Данный результат свидетельствует, что антитело NI-301.37F1 связывается исключительно с патологическими (т.е. нефизиологическими) агрегатами ТТР, которые со временем накапливаются в желудочно-кишечном тракте мышей с САП, и не с ТТР в нативной конформации, в которой ТТР синтезируется печенью.

Помимо этого, оба иллюстративных антитела NI-301.35G11 и NI-301.37F1 не образовывали какого-либо окрашивания на срезах тканей печени и кишечника мышей ТТР-НА (фиг. 8 2В, 3В). Ввиду высоких концентраций антитела, использовавшихся в данном эксперименте, и исходя из аффинности связывания антитела, данное отсутствие окрашивания на срезах ТТР-НА свидетельствует о высокой специфичности связывания в отношении белка ТТР.

Пример 8. Селективность связывания в отношении отложений неправильно свернутого, неправильно собранного и/или агрегированного ТТР в ткани человека

Также оценивали способность антител согласно настоящему изобретению к связыванию с патологическими отложениями ТТР в ткани человека. Срезы биопсии кожи от пациента с САП и срезы ткани поджелудочной железы от здорового индивидуума обрабатывали для проведения иммуногистохимического анализа с применением процедуры, описанной в примере 7 выше. Для данного эксперимента были выбраны образцы биопсии кожи, поскольку кожа содержит значительное количество патологических отложений амилоида ТТР. Напротив, в данном эксперименте использовали ткань поджелудочной железы, поскольку альфа-клетки поджелудочной железы экспрессируют ТТР на высоком уровне.

Как представлено на фиг. 9, коммерческое антитело Dako A0002 образовывало эквивалентно интенсивное окрашивание патологических отложений ТТР в коже и нативного ТТР в альфа-клетках поджелудочной железы (фиг. 9 1А). Аналогично, иллюстративное химерное антитело мыши NI-301.mur35G11 образовывало эквивалентно интенсивное окрашивание как патологических отложений ТТР в коже, так и нативного ТТР в альфа-клетках поджелудочной железы (фиг. 9 1В). Напротив, антитело NI-301.37F1 окрашивало исключительно отложение патологического ТТР в коже, но не нативный ТТР в альфа-клетках поджелудочной железы (фиг. 9 3А). Данный результат демонстрирует, что согласно результатам метода ИГХ антитело NI-301.37F1 является высокоселективным в отношении патологических отложений ТТР, которые содержат мутантную, неправильно свернутую, неправильно собранную и/или агрегированную конформации ТТР.

В условиях контроля "исключительно вторичное антитело", представленных на чертежах 1В, 2В и 3В фиг. 9, продемонстрировано окрашивание ткани, которое возникает при отсутствии первичного антитела. Отсутствие (2В) или очень низкий уровень (1В, 3В) окрашивания свидетельствует, что окрашивание, наблюдаемое на чертежах 1А, 2А и 3А, является в действительности специфичным в отношении соответствующих первичных антител.

Пример 9. Оценка связывающего эпитопа антител против ТТР

Для определения связывающего эпитопа иллюстративных антител NI-301.59F1, NI301.35G11 и NI-301.37F1 всю аминокислотную последовательность ТТР анализировали с применением панели из 29 последовательных пептидов длиной 15 аминокислот с перекрытием в 11 аминокислот, ковалентно присоединенных к мембране. Также на мембрану наносили дополнительные пептиды, включая выбранные мутации. Мембрану блокировали в блокирующем буфере Roti в течение ночи при температуре 4°C, инкубировали сначала с антителами против ТТР, разведенными в блокирующем буфере, в течение 2 ч при к.т., а затем с конъюгированным с ПХ антителом против IgG человека в течение 45 мин при к.т. (разве-

дение 1/20000 в ТБР - солевом растворе, забуфференом Tris). Реакцию запускали добавлением люминола и визуализировали посредством анализа люминесценции.

Антитело NI-301.59F1 распознает споты 15, 16 и 44, которые соответствуют последовательности 61-EEEFVEGIY-69 (SEQ ID NO: 49) на полноразмерном ТТР человека дикого типа, см. фиг. 10 А. Антитело NI-301.35G11 распознает споты 13, 14, 42 и 44, которые соответствуют последовательности 53-GELHGLTTEEE-63 (SEQ ID NO: 50) на полноразмерном ТТР человека дикого типа, см. фиг. 10 В. Однако антитело NI-301.35G11 не распознает спот 43; этот результат свидетельствует, что данное антитело не может связываться с последовательностью 53-GELHGPTTEEE-63, соответствующей варианту L55P-ТТР. Антитело NI-301.37F1 распознает споты 9, 10, 11, 38 и 40, которые соответствуют последовательности 41-WEPFA-45 (SEQ ID NO: 51) на полноразмерном ТТР человека дикого типа, см. фиг. 10С. Однако антитело NI-301.37F1 не распознает спот 43; этот результат свидетельствует, что данное антитело не может связываться с последовательностью 41-WGPFA-45, соответствующей варианту E42G-ТТР.

Для улучшения определения связывающего эпитопа иллюстративных антител NI-301.59F1, NI301.35G11 и NI-301.37F1 всю аминокислотную последовательность ТТР анализировали с применением панели из 151 последовательных пептидов длиной 15 аминокислот с перекрытием в 14 аминокислот, ковалентно присоединенных к мембране. В каждом пептиде аминокислоту в положении 10 заменяли аланином в случае аминокислот, отличных от аланина, тогда как аланины заменяли глицином или пролином. Мембрану блокировали в блокирующем буфере Roti в течение ночи при температуре 4°C, инкубировали сначала с антителами против ТТР, разведенными в блокирующем буфере, в течение 2 ч при к.т., а затем с конъюгированным с ПХ антителом против IgG человека в течение 45 мин при к.т. (разведение 1/20000). Реакцию запускали добавлением люминола и визуализировали посредством анализа люминесценции.

Антитело NI-301.59F1 распознает только споты 77 и 83; данный результат свидетельствует, что для связывания 59F1 не требуются E61 и V65, тогда как E62, E63, F64, E66, G67, I68 и Y69 требуются для связывания антитела. Точный вклад K70 является вопросом интерпретации: сильное связывание антитела с пептидом 44, представленное на фиг. 10А, однозначно свидетельствует, что отсутствие K70 в С-концевом положении не предотвращает связывания антитела; однако в следующем эксперименте, представленном на фиг. 10Е, замена K69A в положении 10 пептида предотвращала связывание антитела. Данные, казалось бы, противоречивые результаты свидетельствуют, что NI-301.59F1 связывается со специфичной конформацией аминокислотной последовательности 62-EEFXEGIY-69 (SEQ ID NO: 58), в которой X может представлять собой любую аминокислоту.

Антитело NI-301.35G11 распознает споты 68, 71, 72, 73, 74 и 75; данный результат свидетельствует, что для связывания 35G11 не требуется G53, тогда как E54, L55, G57 и L58 требуются для связывания антитела. Характер связывания 35G11 также свидетельствует, что присутствие E61 или E62 необходимо для связывания антитела. В данном эксперименте нельзя было определить точный вклад T59 и T60, но было высказано предположение, что наличие одного из двух тирозинов необходимо для связывания антитела. В совокупности, профиль связывания NI-301.35G11 при сканировании аланином свидетельствует, что данное антитело распознает последовательность 54 ELXGLTXE 61 (SEQ ID NO: 59), где X может включать все известные аминокислоты, см. фиг. 10F.

Антитело NI-301.37F1 связывается со слотами 50, 52, 55, 56 и 58-62 на мембране сканирования аланином, но не со слотами 51, 53, 54 и 57. Данный факт свидетельствует, что для связывания антитела необходимы W41, P43, F44 и A45. С учетом более раннего наблюдения, что мутация E42G препятствует связыванию антитела (фиг. 10С), данные результаты свидетельствуют, что NI-301.37F1 связывается с последовательностью 41-WEPFA-45 (SEQ ID NO: 60), см. фиг. 10G

Пример 10. Определение характеристик связывания антитела методом поверхностного плазменного резонанса

Характеристики связывания антитела с различными растворимыми препаратами ТТР определяли методом поверхностного плазменного резонанса (ППР) с применением прибора Biorad Proteon XPR36, см. табл. V.

Анализ методом ППП проводили на приборе BioRad ProteOn XPR36, оснащенном сенсорным датчиком GLM. Антитело против иммуноглобулинов человека, направленное против домена Fc-гамма, ковалентно присоединяли к воспринимающей поверхности детектора и насыщали исследуемыми антителами. Белок ТТР дикого типа и мутантный белок ТТР в нативной и неправильно свернутой конформации разводили в буфере HBS-T в концентрациях, варьирующих от 3,2 до 316 нМ. Ассоциацию антитело-антиген анализировали в течение 180 с, а диссоциацию - в течение 600 с. Модель связывания Ленгмюра (простая ассоциация в соотношении 1:1) использовали для аппроксимации данных и получения констант ассоциации (ka), диссоциации (kd) и аффинности (KD).

Антитело против IgG-Fcγ человека ковалентно наносили на воспринимающие поверхности детектора и использовали для захвата антител, специфичных к ТТР человека. Антитела анализировали с применением 4 различных препаратов ТТР, включая нативный и неправильно свернутый/агрегированный ТТР дикого типа и нативные мутанты ТТР V30M и L55P; все указанные препараты были приготовлены в концентрациях от 3,2 до 316 нМ в буфере HBS-T (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% Tween

20, pH 7,4). Неправильно свернутый/агрегированный ТТР дикого типа получали посредством кислотной денатурации при температуре 65°C в течение 80 мин в ацетатном буфере (50 мМ ацетат HCl, 100 мМ KCl, 1 мМ EDTA, pH 3,0) с последующей сменой буфера на HBS-T. 59F1, 35G11 и 37F1 демонстрировали линейное связывание и характеристики диссоциации, которые наилучшим образом соответствовали модели Ленгмюра.

Полученные результаты продемонстрировали, что данные три антитела с высокой аффинностью связываются в растворе с вариантами V30M и L55P-ТТР, а также с препаратами неправильно свернутого/агрегированного ТТР дикого типа. Напротив, данные иллюстративные антитела не связываются в растворе с нативным ТТР дикого типа.

Соответственно, полученные результаты продемонстрировали, что NI-301.37F1 с высокой аффинностью связывается в растворе с неправильно свернутым белком ТТР человека дикого типа с KD 1,2 нМ, но не связывается с тем же белком в нативной конформации. Подобная аффинность связывания (KD=1,4 нМ) была определена для мутантного белка ТТР-L55P.

Таблица V. Определение характеристик связывания антитела методом поверхностного плазмонного резонанса

Антитело NI-301.	Антиген	Аппроксимация Ленгмюра (модель взаимодействия 1:1)		
		ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	KD
<b>59F1</b>	нативный ТТР	н.а.	н.а.	> 316 нМ
	неправильно свернутый/агрегированный ТТР	9,7 × 10 <sup>4</sup>	3,4 × 10 <sup>-4</sup>	<b>3,5 нМ</b>
	нативный ТТР-V30M	1,3 × 10 <sup>4</sup>	2,2 × 10 <sup>-4</sup>	<b>16 нМ</b>
	нативный ТТР-L55P	5,1 × 10 <sup>4</sup>	1,5 × 10 <sup>-4</sup>	<b>3,1 нМ</b>
<b>35G11</b>	нативный ТТР-ДТ	н.а.	н.а.	> 316 нМ
	неправильно свернутый/агрегированный ТТР	2,3 × 10 <sup>4</sup>	2,7 × 10 <sup>-4</sup>	<b>12 нМ</b>
	нативный ТТР-V30M	7,4 × 10 <sup>3</sup>	2,4 × 10 <sup>-4</sup>	<b>33 нМ</b>
	нативный ТТР-L55P	н.а.	н.а.	> 100 нМ
<b>37F1</b>	нативный ТТР-ДТ	н.а.	н.а.	> 316 нМ
	неправильно свернутый/агрегированный ТТР	2,1 × 10 <sup>4</sup>	2,6 × 10 <sup>-5</sup>	<b>1,2 нМ</b>
	нативный ТТР-V30M	1,1 × 10 <sup>4</sup>	1,9 × 10 <sup>-4</sup>	<b>17 нМ</b>
	нативный ТТР-L55P	3,3 × 10 <sup>4</sup>	4,6 × 10 <sup>-5</sup>	<b>1,4 нМ</b>
	L55P			

н.а. - не определяли.

Пример 11. Пассивная иммунизация мышей, трансгенных по ТТР Val30Met человека, у которых наблюдаются отложения ТТР в ткани, химерным рекомбинантным антителом человека - антителом мыши против ТТР приводит к удалению отложений

Пассивную иммунизацию проводили, как описано в международной заявке WO 2010/030203, в частности, в примере 3, содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки, а также в источниках Kohno et al., Am. J. Pathol. (1997), 1497-1508 и Sousa et al., Am. J. Pathol. (2002), 1935-48, ссылки на которые содержатся в настоящей заявке.

Вкратце мышам с САП в возрасте 7 месяцев и 17 месяцев, которые являлись трансгенными по аллелю Val30Met-ТТР человека и нокаутными по гену ТТР мыши (Kohno et al., (1997), выше) еженедельно в течение 12 недель интраперитонеальным путем вводили моноклональное антитело в дозе 3 мг/кг. Через пять дней после введения последней дозы животных умерщвляли, различные ткани отбирали, фиксировали в растворе параформальдегида и заливали парафином. Получали срезы толщиной 3-5 мкм, которые обрабатывали для проведения иммуногистохимического анализа с применением коммерческого антитела против ТТР, описанного выше. Использовали стандартную процедуру иммунофлуоресцентного анализа, подобную процедуре, описанной в примере 7; единственное отличие заключалось в том, что для обнару-

жения использовали флуоресцентное вторичное антитело. Поверхность ткани, заполненной отложением ТТР, количественно определяли и выражали в виде процента от общей площади ткани. Статистический анализ эффекта лечения проводили с применением двухстороннего неспаренного t-критерия.

Данная линия трансгенных мышей воспроизводила ключевой патологический механизм, общий для заболеваний на основе амилоида ТТР, который состоит в разборке тетрамера ТТР и нарушенном сворачивании мономеров ТТР в токсичную и нерастворимую амилоидогенную конформацию. Аналогично пациентам с САП, у данных трансгенных мышей, как правило, наблюдаются зависимые от возраста отложения ТТР. Оценку эффективности лечения проводили в двух группах трансгенных мышей, возраст которых на момент начала лечения составлял 7 месяцев и 17 месяцев; в данных возрастах отложение ТТР является критическим и поражает множество тканей желудочно-кишечной системы. Примечательно, что пассивная иммунизация иллюстративным антителом NI-301.37F1 вызывала статистически значимое уменьшение поверхности ткани, пораженной отложением ТТР, когда лечение начинали в возрасте 7 месяцев, см. фиг. 12А. У старых мышей лечение также характеризовалось подобными эффектами и приводило к почти значимому уменьшению отложений ТТР, см. фиг. 12В.

Пример 12. Полученные от человека рекомбинантные антитела против ТТР связываются с патологическими отложениями ТТР *in vivo*

Для определения того, способны ли полученные от человека рекомбинантные антитела против ТТР к связыванию с патологическими отложениями ТТР *in vivo*, взрослым мышам с САП в возрасте 7 месяцев и.п. инъецировали антитело NI-301.37F1 в дозе 30 мг/кг или ФБР для сравнения. Через 48 ч данным мышам проводили транскардиальную перфузию, и ткани обрабатывали для проведения гистологического анализа. Патологические отложения ТТР были обнаружены с применением поликлонального антитела кролика против ТТР в комбинации с меченым флуоресцентной меткой антителом против IgG кролика, тогда как локализацию инъецированного антитела NI-301.37F1 обнаруживали с помощью меченого флуоресцентной меткой антитела против IgG человека. В частности, иммунопреципитацию проводили следующим образом.

Иммунопреципитацию NI-301.37F1 и антител контроля изотипа из образцов плазмы мыши проводили в течение 2 ч при к.т. с применением магнитных бусин с присоединенным белком A/G (Pierce № 88803), на которые было нанесено антитело против IgG человека (Jackson Immunoresearch № 709-005-098). После 3 промывок ФБР-Т образцы элюировали с магнитных бусин 0,2 М глициновым буфером (pH 2,5), нейтрализовали 1 М Tris HCl (pH 8,0), смешивали с LDS-буфером для нанесения (Life technologies № NP0007) и нагревали в течение 10 мин. при температуре 90°C. Затем образцы наносили на 4-12% бистрис гель (Life technologies № WG1403A), который анализировали в течение 40 мин при 200 В в буфере для анализа MOPS. После переноса белка на нитроцеллюлозную мембрану белок ТТР обнаруживали с применением антитела против ТТР, независимого от конформации (Dako № A0002, 150 нг/мл), или антитела NI-301.37F1 (20 нМ) в комбинации с конъюгированным с ПХ белком А (Life technologies № 10-1023, разведение 1/10000) и люминесцентной визуализации.

Связывание *in vivo*, как показано на фиг. 13, проводили на взрослых мышах с САП (возраст 7 месяцев), которые получали и.п. единичную инъекцию антитела NI-301.37F1 в дозе 30 мг/кг или ФБР. Через 48 ч мышей перфузировали ФБР, органы отбирали и обрабатывали для проведения гистологического анализа. Патологические отложения ТТР обнаруживали методом иммунофлуоресценции с применением коммерческого поликлонального антитела кролика против ТТР (Dako № A0002, 4,8 мкг/мл) в комбинации с конъюгированным с Cu5 антителом против иммуноглобулинов кролика (Jackson Immunoresearch №711-175-152, разведение 1/200). Наличие (или отсутствие) NI-301.37F1 обнаруживали одновременно с применением конъюгированного с Cu3 антитела против иммуноглобулинов человека (Jackson Immunoresearch №709-165-149, разведение 1/200). Для визуализации тканей мышей, которым инъецировали NI-301.37F1 и которым инъецировали ФБР, использовали те же параметры сканирования, и полученные изображения обрабатывали с использованием тех же настроек.

Как представлено на фиг. 13, NI-301.37F1 -зависимое окрашивание, как и ожидалось, в значительной степени солокализировалось с окрашиванием ТТР у мышей, которым инъецировали NI-301.37F1, но полностью отсутствовало у мышей, которым инъецировали ФБР. Данный результат свидетельствует, что антитело NI-301.37F1 против ТТР связывается с патологическими отложениями ТТР *in vivo*.

Пример 13. Обнаружение отложений неправильно свернутого белка ТТР *in vivo* не требует проведения биопсии тканей

Данная диагностическая процедура замены биопсии ткани и гистологического анализа в процессе диагностики заболеваний на основе амилоида ТТР, связанных с агрегированным, мутантным и/или неправильно свернутым ТТР, приведена в качестве примера в настоящей заявке ниже и проиллюстрирована на фиг. 14. В частности, эксперимент проводили на мышах с САП в возрасте 7 месяцев, как описано выше; см. пример 11 выше. Данные мыши воспроизводят ключевой патофизиологический механизм САП и аналогично пациентам у данных мышей наблюдается зависимое от возраста отложение ТТР в различных тканях. Две мыши с САП получали единичную интраперитонеальную инъекцию полученного от человека рекомбинантного моноклонального антитела NI-301.37F1 против ТТР в дозе 3 мг/кг. Перед инъекцией антитела (t=0) и через два дня после инъекции (t=48 ч) отбирали небольшие образцы крови, и

получали плазму для анализа. Образцы плазмы подвергали иммунопреципитации с антителами против IgG человека (для получения инъецируемого антитела человека против ТТР) с образцами  $t=0$ , использованными в качестве отрицательных контролей. Затем проводили анализ образцов после иммунопреципитации методом вестернблоттинга для обнаружения того, захватило ли антитело против ТТР, инъецированное мышам, некоторое количество неправильно свернутого белка ТТР в течение 48 ч, пока данное антитело циркулировало *in vivo*. Вестернблоттинг проводили с применением специфичных к конформации и независимых от конформации антител против ТТР. Контрольный эксперимент проводили с антителом контроля изотипа (не способным связываться с белком ТТР) в качестве отрицательного контроля. Дополнительный контроль заключался в инкубации образцов плазмы от мышей с САП, не получавших лечение антителом NI-301.37F1, *in vitro*, и обработке, как описано выше.

Результаты, представленные на фиг. 14, свидетельствуют, что антитело NI-301.37F1 захватывало некоторое количество неправильно свернутого белка ТТР в течение периода инкубации 48 ч *in vivo*. В особенности данный захват наблюдался для антитела NI-301.37F1, но не для антитела контроля изотипа. Более того, неправильно свернутый белок ТТР, захваченный антителом NI-301.37F1, не присутствовал в образцах плазмы, отобранных от мышей, не получавших лечение. Взятые вместе, данные результаты свидетельствуют, что антитело NI-301.37F1 было способно удалять неправильно свернутый белок ТТР из нерастворимых отложений ТТР *in vivo*, что можно обнаружить без потребности в проведении биопсии ткани. Единственная техническая корректировка для применения данного диагностического теста у человека будет заключаться в мечении антитела против ТТР, которое будет позволять проводить выделение данного антитела из образца плазмы человека, посредством, например, метки на основе биотина или гистидина либо страптавидина. В качестве альтернативы, немодифицированное антитело против ТТР можно выделить из образца плазмы человека с применением антиидиотипического антитела.

Таблица IV. Мутации в гене ТТР

Название (вариант белка, включая сигнальный пептид длиной 20 АК)	Вариант последовательности (мРНК)	Замена кодона	Расположение	Сообщаемый фенотип	Этническая группа	Ссылки
Gly6Ser (p.Gly26Ser)	c.76G>A	GGT>AGT	Экзон 2	неамилоидогенный	Белая раса	Jacobson (1994) Hum Mutat 3, 254
Cys10Arg (p.Cys30Arg)	c.88T>C	TGT>CGT	Экзон 2	ВН, Г, С, ПН	Американцы (венгры)	Uemichi (1992) J Med Genet 29, 888
Leu12Pro (p.Leu32Pro)	c.95T>C	CTG>CCG	Экзон 2	ПН, ВН, С, ЛМ, П	Британцы	Brett (1999) Brain 122, 183
p.Met13Ile (p.Met33Ile)	c.99G>C	ATG>ATC	Экзон 2	неамилоидогенный	Немцы	Altland (1999) The 4th International Symposium on FAP and Other TTR Related Disorders
Asp18Asn (p.Asp38Asn)	c.112G>A	GAT>AAT	Экзон 2	С	Американцы	Connors (2003) Amyloid 10, 160
Asp18Gly (p.Asp38Gly)	c.113A>G	GAT>GGT	Экзон 2	ЛМ	Венгры	Vidal (1996) Am J Pathol 148, 361
Asp18Glu (p.Asp38Glu)	c.114T>A или G	GAT>GAA/G	Экзон 2	ПН	Южноамериканцы	Connors (2004) Amyloid 11, 61
Val20Ile (p.Val40Ile)	c.118G>A	GTC>ATC	Экзон 2	СЗК, С	Немцы, американцы	Jenne (1996) Proc Natl Acad Sci U S A 93, 6302
Ser23Asn (p.Ser43Asn)	c.128G>A	AGT>AAT	Экзон 2	Г, С, ПН	Португальцы, американцы	Connors (1999) Amyloid 6, 114
Pro24Ser (p.Pro44Ser)	c.130C>T	CCT>TCT	Экзон 2	СЗК, С, ПН	Американцы	Uemichi (1995) J Med Genet 32, 279
Ala25Ser (p.Ala45Ser)	c.133G>T	GCC>TCC	Экзон 2	С, ПН	Американцы	Yazatic (2002) Muscle Nerve 25, 244
Ala25Thr (p.Ala45Thr)	c.133G>A	GCC>ACC	Экзон 2	ЦНС, ПН	Японцы	Sekijima (2003) Lab Invest 83, 409
Val28Met (p.Val48Met)	c.142G>A	GTG>ATG	Экзон 2	ПН	Португальцы	Carvalho (2000) Muscle Nerve 23, 1016
Val30Leu (p.Val50Leu)	c.148G>C	GTG>CTG	Экзон 2	ВН, С, Р, ПН	Японцы, американцы	Murakami (1992) Biochen Biophys Res Commun 187, 397
Val30Met (p.Val50Met)	c.148G>A	GTG>ATG	Экзон 2	ВН, Г, ЛМ, ПН	Американцы, китайцы, японцы, европейцы	Saraiva (1984) J Clin Invest 74, 104
Val30Ala (p.Val50Ala)	c.149T>C	GTG>GCG	Экзон 2	ВН, С	Американцы (немцы)	Jones (1992) Clin Genet 41, 70
Val30Gly (p.Val50Gly)	c.149T>G	GTG>GGG	Экзон 2	ЦНС, Г, ЛМ	Американцы	Peterson (1997) Ann Neurol 41, 307
Val32Ala (p.Val52Ala)	c.155T>C	GTG>GCG	Экзон 2	ВН, С, ПН	Китайцы	Pica (2005) Muscle Nerve 32, 223
Val32Gly (p.Val52Gly)	c.155T>G	GTG>GGG	Экзон 2	ВН, ПН	Французы	Plante-Bordeneuve (2003) J Med Genet 40, e120
Phe33Ile (p.Phe53Ile)	c.157T>A	TTC>ATC	Экзон 2	Г, ПН	Евреи	Jacobson (1988) Biochem Biophys Res Commun 153(1): 198
Phe33Leu (p.Phe53Leu)	c.157T>C	TTC>CTC	Экзон 2	ПН	Американцы	Li (1991) Neurology 41, 893
Phe33Val (p.Phe53Val)	c.157T>G	TTC>GTC	Экзон 2	ПН	Китайцы, британцы	Tachibana (1999) Amyloid 6(4):282
Phe33Cys (p.Phe53Cys)	c.158T>G	TTC>TGC	Экзон 2	СЗК, Г, Р, ВН	Американцы	Connors (2003) Amyloid 10, 160
Arg34Gly (p.Arg54Gly)	c.160A>G	AGA>GGA	Экзон 2	Г	Косовары	Levy J, Hawkins PN, Rowczenio D, Godfrey T, Stawell R, Zamir E. The Ocular Immunology Clinic, Royal Victorian Eye and Ear Hospital, Melbourne, Australia.

Arg34Thr (p.Arg54Thr)	c.161G>C	AGA>ACA	Экзон 2	С, ПН	Итальянцы	Patrosso (1998) Am J Med Genet 77, 135
Lys53Asn (p.Lys55Asn)	c.165G>C или T	AAG>AAC/Т	Экзон 2	ВН, С, ПН	Французы	Reilly (1995) Brain 118, 849
Ala36Pro (p.Ala56Pro)	c.166G>C	GCT>CCT	Экзон 2	СЗК, Г, ПН	Греки, итальянцы, евреи, американцы	Jones (1991) Am J Hum Genet 48, 979
Asp38Ala (p.Asp58Ala)	c.173A>C	GAT>GCT	Экзон 2	ВН, С, ПН	Японцы	Yazaki (2000), Biochem Biophys Res Commun 274(3):702
Asp38Val (p.Asp58Val)	c.173A>T	GAT>GTT	Экзон 2	С, ПН	Гайанцы	Lachmann (2002) N Engl J Med 346, 1786
Asp39Val (p.Asn59Val)	c.176A>T	GAC>GTC	Экзон 2	С	Немцы	Eriksson (2009) Am J Surg Pathol 33 (1):58
Trp41Leu (p.Trp61Leu)	c.182G>T	TGG>TTG	Экзон 2	Г	Американцы (русские)	Yazaki (2002) Amyloid 9, 263
Glu42Gly (p.Glu62Gly)	c.185A>G	GAG>GGG	Экзон 2	ВН, С, ПН	Японцы, русские, американцы	Ueno (1990) Biochem Biophys Res Commun 169, 1117
Glu42Asp (p.Glu62Asp)	c.186G>C или T	GAG>GAC/Т	Экзон 2	С	Французы	Dupuy (1998) Amyloid 5, 285
Phe44Tyr (p.Phe64Tyr)	c.191T>A	TTT>TAT	Экзон 2	ВН, ПН	Французы	Plante-Bordeneuve (2003) J Med Genet 40, e120
Phe44Ser (p.Phe64Ser)	c.191T>C	TTT>TCT	Экзон 2	ВН, С, ПН	Американцы	Klein (1998) Neurology 51, 1462
Ala45Ser (p.Ala65Ser)	c.193G>T	GCC>TCC	Экзон 2	С	Шведы	Janunger (2000) Amyloid 7, 137
Ala45Thr (p.Ala65Thr)	c.193G>A	GCC>ACC	Экзон 2	С	Ирландцы, итальянцы, американцы	Saraiva (1992) Am J Hum Genet 50, 1027
Ala45Asp (p.Ala65Asp)	c.194C>A	GCC>GAC	Экзон 2	С, ПН	Ирландцы, американцы	Saraiva (1995) Hum Mutat 5, 191
Gly47Arg (p.Gly67Arg)	c.199G>C	GGG>CGG	Экзон 2	ВН, ПН	Японцы	Murakami (1992) Biochem Biophys Res Commun 182, 520
Gly47Arg (p.Gly67Arg)	c.199G>A	GGG>AGG	Экзон 2	С, ПН	Итальянцы	Ferlini (2000) Clin Genet 57, 284
Gly47Ala (p.Gly67Ala)	c.200G>C	GGG>GCG	Экзон 2	ВН, С, ПН	Немцы, итальянцы, французы	Ferlini (1994) Hum Mutat 4, 61
Gly47Glu (p.Gly67Glu)	c.200G>A	GGG>GAG	Экзон 2	С, Р, ПН	Немцы, итальянцы	Pelo (2002) Amyloid 9, 35
Gly47Val (p.Gly67Val)	c.200G>T	GGG>GTG	Экзон 2	ВН, СЗК, С, ПН	Жители Шри-Ланки	Booth (1993) Amyloid, 456
Thr49Ala (p.Thr69Ala)	c.205A>G	ACC>GCC	Экзон 3	СЗК, С, ПН	Итальянцы, французы	Almeida (1992) Hum Mutat 1, 211
Thr49Pro (p.Thr69Pro)	c.205A>C	ACC>CCC	Экзон 3	С, ЛМ	Американцы	Nakagawa (2008) J Neurol, 272(1-2):186; Connors (2003) Amyloid 10, 160;
Thr49Ile (p.Thr69Ile)	c.206C>T	ACC>ATC	Экзон 3	С, ПН	Японцы	Nakamura (1999) Hum Hered 49, 186
Thr49Ser (p.Thr69Ser)	c.206C>G	ACC>AGC	Экзон 3	ПН	Индийцы	Rowczenio (2010) XII International Symposium on Amyloidosis
Ser50Ile (p.Ser70Ile)	c.209G>T	AGT>ATT	Экзон 3	ВН, С, ПН	Японцы, испанцы	Sacki (1992) FEBS Lett 308, 35
Ser50Arg (p.Ser70Arg)	c.210T>G	AGT>AGG	Экзон 3	ВН, С, ПН	Итальянцы, французы, японцы	Ueno (1990) Biochem Biophys Res Commun 169, 1117
Glu51Gly (p.Glu71Gly)	c.212A>G	GAG>GGG	Экзон 3	С	Американцы	Connors (2003) Amyloid 10, 160
Ser52Pro (p.Ser72Pro)	c.214T>C	TCT>CCT	Экзон 3	ВН, С, Р, ПН	Британцы	Stangou (1998) Transplantation 66(2):229
Gly53Glu (p.Gly73Glu)	c.218G>A	GGA>GAA	Экзон 3	ЦНС, ЛМ, Н	Французы	Ellic (2001) Neurology 57, 135
Gly53Ala (p.Gly73Ala)	c.218G>C	GGA>GCA	Экзон 3	ВН, Г, С, ПН, ЛМ	Британцы	Douglass (2007) J Neurol Neurosurg Psychiatry 78, 193
Glu54Leu (p.Glu74Leu)	c.220_221GA>TT	GAG>TTG	Экзон 3	С	Бельгийцы	Rowczenio (2006) XI International Symposium on Amyloidosis
Glu54Lys (p.Glu74Lys)	c.220G>A	GAG>AAG	Экзон 3	ВН, С, ПН	Японцы	Togashi (1999) Neurology 53, 637
Glu54Gly (p.Glu74Gly)	c.221A>G	GAG>GGG	Экзон 3	ВН, Г, ПН	Британцы	Reilly (1995) Brain 118, 849
Glu54Asp (p.Glu74Asp)	c.222G>T	GAG>GAC	Экзон 3	Не указано	Немцы	Eriksson (2009) Am J Surg Pathol 33 (1):58
Glu54Gln (p.Glu74Gln)	c.220G>C	GAG>CAG	Экзон 3	С, ПН	Румыны	Coriu D, XII International Symposium on Amyloidosis
Leu55Gln (p.Leu75Gln)	c.224T>A	CTG>CAG	Экзон 3	ВН, Г, ПН	Американцы (испанцы)	Yazaki (2002) Amyloid 9, 268
Leu55Arg (p.Leu75Arg)	c.224T>G	CTG>CGG	Экзон 3	ЛМ, ПН	Немцы	Connors (2003) Amyloid 10, 160
Leu55Pro (p.Leu75Pro)	c.224T>C	CTG>CCG	Экзон 3	ВН, Г, С, ПН	Тайванцы, американцы (голландцы, немцы)	Jacobson (1992) Hum Genet 89, 353
His56Arg (p.His76Arg)	c.227A>G	CAT>CGT	Экзон 3	С	Американцы	Jacobson (1999) TTR Locus-specific database Unpublished
Leu58Arg (p.Leu78Arg)	c.233T>G	CTC>CGC	Экзон 3	ВН, СЗК, Г, С	Японцы	Sacki (1991) Biochem Biophys Res Commun 180, 380
Leu58His (p.Leu78His)	c.233T>A	CTC>CAC	Экзон 3	СЗК, С	Немцы, американцы (штат Мериленд)	Nichols (1989) Genomics 5, 535
Thr59Lys (p.Thr79Lys)	c.236C>A	ACA>AAA	Экзон 3	ВН, С, ПН	Итальянцы, американцы (азиаты)	Saraiva (1995) Hum Mutat 5, 191
Thr60Ala (p.Thr80Ala)	c.238A>G	ACT>GCT	Экзон 3	СЗК, С, ПН	Австралийцы, немцы, ирландцы, британцы, американцы	Wallace (1986) J Clin Invest 78, 6
Glu61Lys (p.Glu81Lys)	c.241G>A	GAG>AAG	Экзон 3	ПН	Японцы	Shiomi (1993) Biochem Biophys Res Commun 194, 1090

Glu61Gly (p.Glu81Gly)	c.242A>G	GAG>GGG	Экзон 3	СЗК, С, ПН	Американцы (англичане/голландцы)	Rosenzweig (2007) Amyloid 14, 65
Glu62Lys (p.Glu82Lys)	c.243G>A	GAG>AAG	Экзон 3	С	Белая раса	Briani C, Cavallaro T, Ferrari S, Taioli F, Calamelli S, Verga L, Adami F, Fabrizi GM. Sporadic transthyretin amyloidosis with a novel TTR gene mutation misdiagnosed as primary amyloidosis. J Neurol. 2012 Oct;259(10):2226-8
Phe64Leu (p.Phe84Leu)	c.250T>C	TTT>CTT	Экзон 3	СЗК, С, ПН	Итальянцы, американцы	Li (1991) Neurology 41, 893
Phe64Ser (p.Phe84Ser)	c.251T>C	TTT>TCT	Экзон 3	Г, ЛМ, ПН, ЦНС	Канадцы (итальянцы), британцы	Uemichi (1999) Arch Neurol 56, 1152
Gly67Glu (p.Gly87Glu)	c.260G>A	GGG>GAG	Экзон 3	С, ПН	Китайцы	Mak (2007) Amyloid, 14, 293
Ile68Leu (p.Ile88Leu)	c.262A>T/C	ATA>C/TTA	Экзон 3	С	Немцы, американцы	Almeida (1991) Basic Res Cardiol 86, 567
Tyr69His (p.Tyr89His)	c.265T>C	TAC>CAC	Экзон 3	Г	Шотландцы, американцы	Zeldenzust (1994) Amyloid, 1, 17
Tyr69Ile (p.Tyr89Ile)	c.265-266 TA>AT	TAC>ATC	Экзон 3	СЗК, С	Японцы	Takei (2003) Amyloid, 10, 25
Lys70Asn (p.Lys90Asn)	c.270A>C/T	AAA>AAC/T	Экзон 3	СЗК, Г, ПН	Немцы, американцы	Izumoto (1992) Neurology 42, 2094
Val71Ala (p.Val91Ala)	c.272T>C	GTG>GCG	Экзон 3	СЗК, Г, ПН	Французы, испанцы	Almeida (1993) Hum Mutat 2, 420
Ile73Val (p.Ile93Val)	c.277A>G	ATA>GTA	Экзон 3	ВН, ПН	Бангладешцы	Booth (1997) Hum Mutat 12, 135
Asp74His (p.Asp94His)	c.280G>C	GAC>CAC	Экзон 3	неамилоидогенный	Немцы	Uemichi (1994) Amyloid, 1, 149
Ser77Phe (p.Ser97Phe)	c.290C>T	TCT>TTT	Экзон 3	ВН, ПН	Французы	Plante-Bordeneuve (1998) Neurology 51, 708
Ser77Tyr (p.Ser97Tyr)	c.290C>A	TCT>TAT	Экзон 3	С, Р, ПН	Французы, немцы, американцы (штаты Иллинойс, Техас)	Wallace (1988) J Clin Invest 81, 189
Tyr78Phe (p.Tyr98Phe)	c.293A>T	TAC>TTC	Экзон 3	СЗК, S, ПН	Французы (итальянцы)	Magy (2003) Amyloid 10, 29
Ala81Thr (p.Ala101Thr)	c.301G>A	GCA>ACA	Экзон 3	С	Американцы	Connors (2003) Amyloid 10, 160
Ala81Val (p.Ala101Val)	c.302C>T	GCA>GTA	Экзон 3	С	Русские, поляки	Rowczenio (2006) XI International Symposium on Amyloidosis
Gly83Arg (p.Gly103Arg)	c.307G>C	GGC>CGC	Экзон 3	Г	Китайцы	Xie Y, Zhao Y, Zhou JJ, Wang X. Identification of a TTR gene mutation in a family with hereditary vitreous amyloidosis Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 2012 Feb;29(1):13-5. Skinner (1992) Ophthalmology 99, 503
Ile84Asn (p.Ile104Asn)	c.311T>A	ATC>AAC	Экзон 3	СЗК, Г, С	Американцы	
Ile84Ser (p.Ile104Ser)	c.311T>G	ATC>AGC	Экзон 3	СЗК, Г, С, ЛМ	Венгры, швейцарцы, американцы	Dwulet (1986) J Clin Invest 78, 880
Ile84Thr (p.Ile104Thr)	c.311T>C	ATC>ACC	Экзон 3	С, ПН	Немцы, британцы	Stangou (1998) Transplantation 66, 229
Glu89Gln (p.Glu109Gln)	c.325G>C	GAG>CAG	Экзон 3	СЗК, С, ПН	Итальянцы	Almeida (1992) Hum Mutat 1, 211
Glu89Lys (p.Glu109Lys)	c.325G>A	GAG>AAG	Экзон 3	ВН, С, ПН	Американцы	Nakamura (2000) Amyloid 7, 46
His90Asn (p.His110Asn)	c.328C>A	CAT>AAT	Экзон 3	неамилоидогенный	Немцы, португальцы	Skare (1994) Clin Genet 45, 281
His90Asp (p.His110Asp)	c.328C>G	CAT>GAT	Экзон 3	С	Британцы	Rowczenio (2006) XI International Symposium on Amyloidosis
Ala91Ser (p.Ala111Ser)	c.331G>T	GCA>TCA	Экзон 3	ВН, СЗК, С, ПН	Французы	Misrahi (1998) Hum Mutat 12, 71
Gln92Lys (p.Gln112Lys)	c.334G>A	GAG>AAG	Экзон 3	С	Японцы	Saito (2001) Hum Pathol 32, 237
Val93Met (p.Val113Met)	c.367G>A	GTG>ATG	Экзон 4	ПН	Малийцы	Lozern (2008) The VIIIth International Symposium on FAP and Other TTR Related Disorders.
Val94Ala (p.Val114Ala)	c.341T>C	GTA>GCA	Экзон 4	ВН, С, ПН	Немцы, греки (киприоты)	Kristen (2007) Amyloid 14(4): 283



Ala97Ser (p.Ala117Ser)	c.349G>T	GCC>TCC	Экзон 4	ПН, С	Китайцы, тайванцы	Tachibana (1999) Amyloid 6, 282
Ala97Gly (p.Ala117Gly)	c.350C>G	GCC>GGC	Экзон 4	С, ПН	Японцы	Yasuda (1994) J Neurol Sci 121, 97
Gly101Ser (p.Gly121Ser)	c.361G>A	GGC>AGC	Экзон 4	неамилодо- генный	Японцы	Kishikawa M et al (1988) Hum Mutat 12, 363
Pro102Arg (p.Pro122Arg)	c.365C>G	CCC>CGC	Экзон 4	неамилодо- генный	Немцы	Altland (1999) The 4th International Symposium on FAP and Other TTR Related Disorders.
Arg103Ser (p.Arg123Ser)	c.367C>A	CGC>AGC	Экзон 4	С	Американцы	Connors (2003) Amyloid 10, 160
Arg104Cys (p.Arg124Cys)	c.370C>T	CGC>TGC	Экзон 4	не- амилодогенный,	Американцы	Torres (1996) Neuromuscular Disord Vol 6, S21.
Arg104His (p.Arg124His)	c.371G>A	CGC>CAC	Экзон 4	неамилодо- генный	Японцы, американцы	Terazaki (1999) Biochem Biophys Res Commun 264, 365
Ile107Val (p.Ile127Val)	c.379A>G	ATT>GTT	Экзон 4	СЗК, С, ПН	Немцы, американцы	Jacobson (1994) Hum Mutat 3, 399
Ile107Phe (p.Ile127Phe)	c.379A>T	ATT>TTT	Экзон 4	ВН, ПН	Британцы	Rowczenio (2006) XI International Symposium on Amyloidosis
Ile107Met (p.Ile127Met)	c.381T>G	ATT>ATG	Экзон 4	С, ПН	Немцы	Connors (2003) Amyloid 10, 160
Ala108Ala (p.Ala128Ala)	c.384C>T	GCC>GCT	Экзон 4	неамилодо- генный	Португальцы	Palha (1997) Amyloid 4, 52
Ala109Ser (p.Ala129Ser)	c.385G>T	GCC>TCC	Экзон 4	ПН	Японцы	Date (1997) J Neurol Sci 150, 143
Ala109Thr (p.Ala129Thr)	c.385G>A	GCC>ACC	Экзон 4	неамилодо- генный	Португальцы	Moses (1990) J Clin Invest 86, 2025
Ala109Val (p.Ala129Val)	c.386C>T	GCC>GTC	Экзон 4	неамилодо- генный	Американцы	Izumoto (1993) J Rheumatol 20 188
Leu111Met (p.Leu131Met)	c.391C>A	CTG>ATG	Экзон 4	СЗК, С	Голландцы	Nordlie (1988) Scand J Immunol 27, 119
Ser112Ile (p.Ser132Ile)	c.395G>T	AGC>ATC	Экзон 4	С, ПН	Итальянцы	De Lucia (1993) Clin Neuropathol 12, S44
Tyr114Ile (p.Tyr134Ile)	c.400T>C	TAC>CAC	Экзон 4	СЗК	Японцы	Murakami (1994) Neurology 44, 315
Tyr114Cys (p.Tyr134Cys)	c.401A>G	TAC>TGC	Экзон 4	ВН, Г, С, ЛМ, ПН	Японцы	Ueno (1990) Biochem Biophys Res Commun 169, 143
Tyr116Ser (p.Tyr136Ser)	c.407A>C	TAT>TCT	Экзон 4	ВН, ПН, СЗК	Французы	Misrahi (1997) Hum Mutat 12, 71
Thr119Met (p.Thr139Met)	c.416C>T	ACG>ATG	Экзон 4	неамилодо- генный	Португальцы, американцы	Harrison (1991) Am J Med Genet 39, 442
Ala120Ser (p.Ala140Ser)	c.418G>T	GCT>TCT	Экзон 4	ВН, С, ПН	Жители Карибских островов	Lachmann (2002) N Engl J Med 346, 1786
Val122del (p.Val142del)	c.424_426	del GTC	Экзон 4	ЦНС, СЗК, С, ПН	Американцы (эквадорцы/ испанцы)	Uemichi (1997) Neurology 48
Val122Ile (p.Val142Ile)	c.424G>A	GTC>ATC	Экзон 4	С	Африканцы, португальцы, американцы	Jacobson (1990) Am J Hum Genet 47, 127
Val122Ala (p.Val142Ala)	c.425T>C	GTC>GCC	Экзон 4	Г, С, ПН	Британцы, американцы	Theberge (1999) Amyloid 6, 54
Pro125Ser (p.Pro145Ser)	c.433C>T	CCC>TCC	Экзон 4	неамилодо- генный	Итальянцы	Ferlini (1996) Neuromuscular Disord Vol 6, S23.

Расшифровка сокращений:

ВН = вегетативная нейропатия, СЗК = синдром запястного канала, Г = глаз, С = сердце; Р = почки; П = печень, ЛМ = лептоменинкс; Н = нейропатия, ПН = полинейропатия, ЦНС = центральная нервная система.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полученное от человека антитело против транстиретина (ТТР) или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, которые способны к связыванию с мутантными, неправильно свернутыми, неправильно собранными и/или агрегированными формами ТТР и/или фрагментами указанных форм и по существу не распознают физиологические формы ТТР, причем указанное антитело способно к связыванию с эпитопом ТТР, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности EEE-FVEGIY (SEQ ID NO: 49), причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в своей варибельной области или связывающем домене следующие шесть областей, определяющих комплементарность (CDR) варибельной области  $V_H$  и  $V_L$ , выбранных из:

(a)  $V_H$ -CDR1: положения 31-35 последовательности SEQ ID NO: 2

$V_H$ -CDR2: положения 50-65 последовательности SEQ ID NO: 2

$V_H$ -CDR3: положения 98-115 последовательности SEQ ID NO: 2

$V_L$ -CDR1: положения 24-34 последовательности SEQ ID NO: 4

$V_L$ -CDR2: положения 50-56 последовательности SEQ ID NO: 4 и

$V_L$ -CDR3: положения 89-98 последовательности SEQ ID NO: 4.

2. Полученное от человека антитело против транстиретина (ТТР) или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, которые способны к связыванию с мутантными, неправильно свернутыми, неправильно собранными и/или агрегированными формами ТТР и/или фрагментами указанных форм и по существу не распознают физиологические формы ТТР, причем указанное антитело способно к связыванию с эпитопом ТТР, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности GELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 50), причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

содержит в своей вариабельной области или связывающем домене следующие шесть областей, определяющих комплементарность (CDR) вариабельной области  $V_H$  и  $V_L$ , выбранных из:

- (b) VH-CDR1: положения 31-35 последовательности SEQ ID NO: 6
- VH-CDR2: положения 50-66 последовательности SEQ ID NO: 6
- VH-CDR3: положения 99-109 последовательности SEQ ID NO: 6
- VL-CDR1: положения 24-39 последовательности SEQ ID NO: 8
- VL-CDR2: положения 55-61 последовательности SEQ ID NO: 8
- VL-CDR3: положения 94-102 последовательности SEQ ID NO: 8.

3. Полученное от человека антитело против транстриетина (ТТР) или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, которые способны к связыванию с мутантными, неправильно свернутыми, неправильно собранными и/или агрегированными формами ТТР и/или фрагментами указанных форм и по существу не распознают физиологические формы ТТР, причем указанное антитело способно к связыванию с эпитопом ТТР, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности WEPFA (SEQ ID NO: 51), причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в своей вариабельной области или связывающем домене следующие шесть областей, определяющих комплементарность (CDR) вариабельной области  $V_H$  и  $V_L$ , выбранных из:

- (c) VH-CDR1: положения 31-35 последовательности SEQ ID NO: 10
- VH-CDR2: положения 52-67 последовательности SEQ ID NO: 10
- VH-CDR3: положения 100-109 последовательности SEQ ID NO: 10
- VL-CDR1: положения 24-34 последовательности SEQ ID NO: 12
- VL-CDR2: положения 50-56 последовательности SEQ ID NO: 12
- VL-CDR3: положения 89-97 последовательности SEQ ID NO: 12;
- (e) VH-CDR1: положения 31-37 последовательности SEQ ID NO: 18
- VH-CDR2: положения 52-67 последовательности SEQ ID NO: 18
- VH-CDR3: положения 100-116 последовательности SEQ ID NO: 18
- VL-CDR1: положения 24-34 последовательности SEQ ID NO: 20
- VL-CDR2: положения 50-56 последовательности SEQ ID NO: 20
- VL-CDR3: положения 89-98 последовательности SEQ ID NO: 20;
- (l) VH-CDR1: положения 31-35 последовательности SEQ ID NO: 46
- VH-CDR2: положения 50-66 последовательности SEQ ID NO: 46
- VH-CDR3: положения 99-108 последовательности SEQ ID NO: 46
- VL-CDR1: положения 23-36 последовательности SEQ ID NO: 48
- VL-CDR2: положения 52-58 последовательности SEQ ID NO: 48
- VL-CDR3: положения 91-100 последовательности SEQ ID NO: 48;
- (m) VH-CDR1: положения 31-35 последовательности SEQ ID NO: 53
- VH-CDR2: положения 52-67 последовательности SEQ ID NO: 53
- VH-CDR3: положения 100-109 последовательности SEQ ID NO: 53
- VL-CDR1: положения 24-34 последовательности SEQ ID NO: 12
- VL-CDR2: положения 50-56 последовательности SEQ ID NO: 12
- VL-CDR3: положения 89-97 последовательности SEQ ID NO: 12.

4. Полученное от человека антитело против транстриетина (ТТР) или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, которые способны к связыванию с мутантными, неправильно свернутыми, неправильно собранными и/или агрегированными формами ТТР и/или фрагментами указанных форм и по существу не распознают физиологические формы ТТР, причем указанное антитело способно к связыванию с нелинейным, конформационным эпитопом, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в своей вариабельной области или связывающем домене следующие шесть областей, определяющих комплементарность (CDR) вариабельной области  $V_H$  и  $V_L$ , выбранных из:

- (d) VH-CDR1: положения 31-35 последовательности SEQ ID NO: 14
- VH-CDR2: положения 50-66 последовательности SEQ ID NO: 14
- VH-CDR3: положения 99-110 последовательности SEQ ID NO: 14
- VL-CDR1: положения 23-36 последовательности SEQ ID NO: 16
- VL-CDR2: положения 52-58 последовательности SEQ ID NO: 16
- VL-CDR3: положения 91-102 последовательности SEQ ID NO: 16;
- (f) VH-CDR1: положения 31-37 последовательности SEQ ID NO: 22
- VH-CDR2: положения 52-67 последовательности SEQ ID NO: 22
- VH-CDR3: положения 100-117 последовательности SEQ ID NO: 22
- VL-CDR1: положения 23-36 последовательности SEQ ID NO: 24
- VL-CDR2: положения 52-58 последовательности SEQ ID NO: 24
- VL-CDR3: положения 91-102 последовательности SEQ ID NO: 24;
- (g) VH-CDR1: положения 31-35 последовательности SEQ ID NO: 26
- VH-CDR2: положения 50-65 последовательности SEQ ID NO: 26
- VH-CDR3: положения 98-110 последовательности SEQ ID NO: 26



VL-CDR3: положения 88-98 последовательности SEQ ID NO: 80 и  
 (t) VH-CDR1: положения 31-35 последовательности SEQ ID NO: 82  
 VH-CDR2: положения 50-65 последовательности SEQ ID NO: 82  
 VH-CDR3: положения 98-110 последовательности SEQ ID NO: 82  
 VL-CDR1: положения 23-33 последовательности SEQ ID NO: 84  
 VL-CDR2: положения 49-55 последовательности SEQ ID NO: 84  
 VL-CDR3: положения 88-98 последовательности SEQ ID NO: 84.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которое содержит следующие аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи ( $V_H$ ) и вариабельной области легкой цепи ( $V_L$ ) цепи:

(a) SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, который содержит следующие аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи ( $V_H$ ) и вариабельной области легкой цепи ( $V_L$ ):

(b) SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 8.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, который содержит аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи ( $V_H$ ) и вариабельной области легкой цепи ( $V_L$ ), выбранные из:

(c) SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12;

(e) SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 20;

(l) SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 48 и

(m) SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 12.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, который содержит аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи ( $V_H$ ) и вариабельной области легкой цепи ( $V_L$ ), выбранные из:

(d) SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 16;

(f) SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24;

(g) SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 28;

(h) SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 32;

(i) SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 36;

(j) SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 40;

(k) SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 44;

(n) SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 57;

(o) SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 64;

(p) SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 68;

(q) SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 72;

(r) SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 76;

(s) SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 80 и

(t) SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 84.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.2, 3, 5, 6 и 7, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с эпитопом TTP (i) GELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 50), но не с соответствующим эпитопом мутанта L55P, или с (ii) WEPFA (SEQ ID NO: 51), но не с соответствующим мутантом E42G.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, отличающееся тем, что указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела содержит константный домен.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.10, отличающееся тем, что указанный константный домен представляет собой константный домен человека.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, отличающееся тем, что константный домен человека представляет собой домен типа IgG.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, отличающееся тем, что константный домен человека представляет собой домен класса или изотипа IgG1.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, которое представляет собой химерное антитело мыши -человека или муринизированное антитело.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, причем антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, включающей одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv), F(ab')-фрагмент, F(ab)-фрагмент и F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент.

16. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1.

17. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2.

18. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3.

19. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4.

20. Вектор для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-15,

причем указанный вектор содержит полинуклеотид по любому из пп.16-19.

21. Клетка-хозяин для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-15, содержащая полинуклеотид по любому из пп.16-19 или вектор по п.20.

22. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-15, причем указанный способ включает:

(а) культивирование клетки по п.21 и

(б) выделение антитела из культуры.

23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемые полинуклеотидом по любому из пп.16-19 или получаемые посредством способа по п.22.

24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15 или 23, меченное меткой, поддающейся обнаружению, причем указанная метка, поддающаяся обнаружению, выбрана из группы, состоящей из фермента, радиоактивного изотопа, флуорофора и тяжелого металла.

25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15, которое присоединено к лекарственному препарату.

26. Фармацевтическая композиция для лечения или предотвращения заболевания, содержащая антитело по любому из пп.1-15, 23, 24 или 25, полинуклеотид по любому из пп.16-19, вектор по п.20 или клетку по п.21 и фармацевтически приемлемый носитель.

27. Фармацевтическая композиция по п.26, которая представляет собой вакцину.

28. Фармацевтическая композиция по п.26 или 27, дополнительно содержащая дополнительное средство, подходящее для предотвращения или лечения заболеваний, связанных с ТТР амилоидозом.

29. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-15, 23, 24 или 25 в профилактическом или терапевтическом лечении заболеваний, связанных с ТТР амилоидозом.

30. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.26-28 в профилактическом или терапевтическом лечении заболеваний, связанных с ТТР амилоидозом.

31. Применение по п.29 или 30, причем указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из семейной амилоидной полинейропатии (САП), семейной амилоидной кардиомиопатии (САК), старческого системного амилоидоза (ССА), системного семейного амилоидоза, лептоменингеального амилоидоза/амилоидоза центральной нервной системы (ЦНС), в том числе болезни Альцгеймера, связанного с ТТР амилоидоза глаз, связанного с ТТР амилоидоза почек, связанной с ТТР гипертироксинемии, связанного с ТТР амилоидоза связок, включая синдром запястного канала, разрывы ротаторной манжеты и стеноз позвоночного канала поясничного отдела, и предэкламписии.

32. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-15, 23, 24 или 25 при обнаружении или визуализации *in vivo* или для нацеливания терапевтического и/или диагностического средства на ТТР в организме человека или животного.

33. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.32, причем указанное обнаружение *in vivo* предпочтительно включает скинтиграфию, позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭКТ), оптическую визуализацию в ближней инфракрасной (ИК) области или магнитно-резонансную визуализацию (МРВ).

34. Набор для диагностики нарушения, связанного с ТТР амилоидозом, причем указанный набор содержит по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15, 23, 24 или 25 и дополнительно содержит реактивы и инструкции по применению.

35. Способ диагностики заболевания, связанного с ТТР амилоидозом, как определено в п.31, включающий проведение анализа уровня неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце жидкости организма от субъекта после введения указанному субъекту антитела против ТТР, причем наличие или увеличенный уровень неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце субъекта по сравнению с контролем свидетельствует о заболевании, связанном с ТТР амилоидозом, причем указанное антитело против ТТР представляет собой антитело по любому из пп.1-15 и 23, 24-25.

36. Способ контроля лечения заболевания, связанного с ТТР амилоидозом, как определено в п.31, антителом против ТТР или определения диагностической или терапевтической применимости антитела против ТТР, включающий проведение анализа уровня неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце жидкости организма от субъекта после введения указанному субъекту антитела против ТТР, и сравнение уровня неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце жидкости организма с образцом, полученным у субъекта перед введением антитела против ТТР, причем наличие или увеличенный уровень неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце субъекта по сравнению с образцом, полученным от субъекта перед введением антитела против ТТР, свидетельствует о прогрессировании заболевания, причем указанное антитело против ТТР представляет собой антитело по любому из пп.1-15 и 23.

37. Способ по п.35, отличающийся тем, что указанный уровень неправильно свернутого и/или агрегированного ТТР в образце анализируют посредством определения комплекса, образовавшегося между антителом против ТТР и неправильно свернутым и/или агрегированным ТТР.

38. Способ по п.35 или 36, отличающийся тем, что указанный контроль представляет собой образец жидкости организма, полученный от субъекта перед введением антитела против ТТР.

39. Способ по любому из пп.35-37, отличающийся тем, что указанная жидкость организма представляет собой кровь и указанный образец получен из указанной жидкости организма, и/или указанный контроль представляет собой соответствующий образец жидкости организма, отобранный у субъекта перед введением антитела против ТТР.

**A NI-301.59F1-VH** (вариабельная область тяжелой цепи)  
 FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3-  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVANINQDSEKYYVDSVKGRFA  
 -----CDR3-----FR4-----  
 SRDNSKNSLYLQMNLSRVEDTGVYYCARDRYCSGGRC SRGNNWFDPFWGQGLVTVSS  
 (SEQ ID NO: 2)

**NI-301.59F1-VL** (вариабельная область легкой цепи каппа)  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----  
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATDIPARFSGSGSGT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 EFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPPYTFGQGTKVDIK  
 (SEQ ID NO: 4)

**B NI-301.35G11-VH** (вариабельная область тяжелой цепи)  
 FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSYAMSWVRQVPGKGLEWVSSISGSGDTTKYTDVSKGRFT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 ISRDNSKNTVFLQMSLRAEDTALYYCVKDGSGRIDPFALWGQGTMTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 6)

**NI-301.35G11-VL** (вариабельная область легкой цепи каппа)  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----  
 EIVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSRLVYSDGNIYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSG  
 -----CDR3-----FR4-----  
 SGSDTDFTLRISRVEAEDVGVYYCMQGTHTWPRTFGQGTKVEIK  
 (SEQ ID NO: 8)

**C NI-301.37F1-VH** (вариабельная область тяжелой цепи)  
 FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVSGGSIISRSSYWGWIQPPGKLEWIGGIYHSGNTYDNP SLKSR L  
 -----CDR3-----FR4-----  
 TMSVDTSKNQFSLNLSVTAADTAVYYCARIVPGGDAFDIHWGQGTMTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 10)

**NI-301.37F1-VL** (вариабельная область легкой цепи каппа)  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----  
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTIACRASQSVGTLYLNWYQQKRGKAPKLLI FAASSLQSGVPSRFSGSGSGT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSSPPTFGQGTKVEIK  
 (SEQ ID NO: 12)

**D NI-301.2F5-VH (вариабельная область тяжелой цепи)**

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3  
 EVQLVESGGGVVRSRRSLRLSCATSGFTFSNYAMHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGNKYYADSVRGRFT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 VSRDNSKNTFYLQMNLSRIEDTAVYFCARGSGRAARHWFDPWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 14)

**NI-301.2F5-VL (вариабельная область легкой цепи лямбда)**

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----  
 QSALTPASVSGSPGQSIITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQYQPKAPKVMIFDVFNRPVGSVNRFSGSKS  
 -----CDR3-----FR4-----  
 GNTASLTISGLQAEDEADYCCSSYTSVTPHWVFGGGTKLTVL  
 (SEQ ID NO: 16)

**E NI-301.28B3-VH (вариабельная область тяжелой цепи)**

FR1-----CDR1---FR2-----CDR2-----FR  
 QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCIVSGSITSSNFYWGWRQPPGKLEWIGAIYSSGNTYYNPSLKS  
 3-----CDR3-----FR4-----  
 TISVDTSKKFLSLKLSVTAADTAVYFCARHSCSSASCYPPGFWDPWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 18)

**NI-301.28B3-VL (вариабельная область легкой цепи каппа)**

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----  
 EIVMTQSPATLSASGERATLSCRASQTVSYNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPGRFSGSGSGT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 EFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGGQTKVEIK  
 (SEQ ID NO: 20)

**F NI-301.119C12-VH (вариабельная область тяжелой цепи)**

FR1-----CDR1---FR2-----CDR2-----  
 QVQLQESGPRLVKPSQTLSTLCIVSGSISGVIYWSWIRQHPGKLEWIGYISNTGNTYYNPSLKS  
 3-----CDR3-----FR4-----  
 TISIDTSKNQFSLNLSVTAADTADYFCAREYCSGGNCYSRFYYMDVWVWKGTTTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 22)

**NI-301.119C12-VL (вариабельная область легкой цепи лямбда)**

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----  
 QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSNIGAGYGVHWYQQLSGTTPKLLIYGDNNRPSGVPDRFSGSGS  
 -----CDR3-----FR4-----  
 GTSASLAITGLQAEDEAHYYCQSYDTTLSSGSRVFGGGTKLTVL  
 (SEQ ID NO: 24)

**G NI-301.5D8-VH (вариабельная область тяжелой цепи)**

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3-  
 QVQLQWAGRLKPSSETLSLTCVAVYGGFSAYWNWIRQAPGKLEWIGEVSHGGSSNYSPSLRGRVAI  
 -----CDR3-----FR4-----  
 SLDTSKSQFSLRLNSVTAADTAVYFCARGSPVVLPGARFDPWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 26)

**NI-301.5D8-VL (вариабельная область легкой цепи лямбда)**

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2---FR3-----  
 QSALTPASVSGFPQSIITISCTGTSSDVGSYNLWSYQQHPGKAPKLLIYEVNKRPSGVSTRFSGSKS  
 -----CDR3-----FR4-----  
 GNTASLTISGLQTEDEADYCCSYAGSTKVFGIGTKVTVL  
 (SEQ ID NO: 28)

**H NI-301.9D5-VH (вариабельная область тяжелой цепи)**

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR  
 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCIVSGVIRSGGYWWSWIRQHPGKLEWVGFIIYTGNTYYNPSLKSRA  
 3-----CDR3-----FR4-----  
 TISVDTSKNQLSLRLTAVTAADTAVYFCARDCSGGSCFESYFDSWGRGTLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 30)

**NI-301.9D5-VL (вариабельная область легкой цепи каппа)**

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----  
 EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQVRSFLAWYQQKSGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSDSGSGT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 DFTLTISRLTEDSAVYYCQRTNWPPLHITFGGGTKVEIK  
 (SEQ ID NO: 32)

**I NI-301.104F5-VH (вариабельная область тяжелой цепи)**

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3  
 QVQLVESGGGVQPERSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKLEWVAIVFDGSKNYADSVKGRFT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 VSRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYFCARDGIAATYADYWGQGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 34)

**NI-301.104F5-VL (вариабельная область легкой цепи каппа)**

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----  
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPARFSGSGSGT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 DFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPIITFGGQTRLEIK  
 (SEQ ID NO: 36)

**J NI-301.21F10-VH** (вариабельная область тяжелой цепи)

FR1-----CDR1----FR2-----CDR2-----  
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLSSLSSYYMSWVRQAPGKGLEWVATINPGGSEKSYVDSVKG  
 FR3-----CDR3-----FR4-----  
 RFTVSRDNARSSVYLQMDSLTVEDTAIYYCARPRYCTSGGCYFDNWGQGLTLVTVSS  
 (SEQ ID NO: 38)

**NI-301.21F10-VL** (вариабельная область легкой цепи лямбда)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----  
 QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTATNSDVGDYKSVSWYQQHPGKAPKLMIDVGRRPSGVPDRFSGSKS  
 -----CDR3-----FR4-----  
 DNTAFLTISGLQTEDEADYFCCIYVGRSSVFGGGTKLTVL  
 (SEQ ID NO: 40)

**K NI-301.9G12-VH** (вариабельная область тяжелой цепи)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3  
 VQQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVAVSGFSSISGGYWGWIRQPPGTGLEWIGSMYHSGRTYYNPSLKSRVT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 ISVDTSKNQLSLKLSVTAADTAVYYCARGFDTSSGSHRPLSTDYWGQGLTLVTVSS  
 (SEQ ID NO: 42)

**NI-301.9G12-VL** (вариабельная область легкой цепи лямбда)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----  
 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRISGSKSG  
 -----CDR3-----FR4-----  
 TSATLGIIGLQTEADYFCGTWDSLSAYVFGTGKTVL  
 (SEQ ID NO: 44)

**L NI-301.12D3-VH** (вариабельная область тяжелой цепи)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3  
 EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCVAVSGFTFRNYGMHWVRRAPGRGLEWVAVIWSDGSDKYADSVEGRFT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 ISRDNSKNTVFLQMNSLRADDTAVYFCAREPSSTWAFDYWGQGLTLVTVSS  
 (SEQ ID NO: 46)

**NI-301.12D3-VL** (вариабельная область легкой цепи лямбда)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----  
 QSALTQPASVSGSPGQSIITISCTGTSSDVGGYNLWSYQQHPGKAPKLMIEDIKGPSGVSNRFSGSKSG  
 -----CDR3-----FR4-----  
 GNTASLTISGLQAEDEADYFCCSYAGTGLVFGGGTKLTVL  
 (SEQ ID NO: 48)

**M NI-301.137F1-PIMC-VH** (вариабельная область тяжелой цепи)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----  
 QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVAVSGGSIISRSSYWGWIRQPPGKLEWIGGIYHSGNTYDNPSLKSRLL  
 FR3-----CDR3-----FR4-----  
 TMSVDTSKNQFSLNLSVTAADTAVYYCARIVPGGDAFDIWGQGMVTVSS  
 (SEQ ID NO: 53)

**N NI-301.44E4-VH** (вариабельная область тяжелой цепи)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMIWVRQAPGKLEWVSGISGSGSTTYYADSVKGRFA  
 -----CDR3-----FR4-----  
 ISRDKSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAGAWEIPTYFDNWGQGLT<sup>55</sup>LVTVSS  
 (SEQ ID NO: 55)

**NI-301.44E4-VK** (вариабельная область легкой цепи лямбда)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----  
 EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIRNNLAWYQOKPGQAPRLLIYGASTRATGI PARFSGTSGST  
 -----CDR3-----FR4-----  
 EFTLIVSSLSQSEDFAVYYCQQYNNWPPTWTFGQGTKVEIK  
 (SEQ ID NO: 57)

**O NI-301.18C4-VH** (вариабельная область тяжелой цепи)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3  
 EVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIYAMTWVRLSPVRGLEWVSTITSGGVSIIYADSIKGRFT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 VSRDNAMNMFLLQLDNLTVDTAIYYCGKDGNCDETSCYLRGMDVWGQGLTTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 62)

**NI-301.18C4-VL** (вариабельная область легкой цепи лямбда)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----  
 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSRSDIGSKLVSWYQVIPGRAPRLVIFDTYKRPSGVPPARFSASKSG  
 -----CDR3-----FR4-----  
 TSATLDIAGLQPGDEAEYFCGSWGNSENFYVFGSGTRTVL  
 (SEQ ID NO: 64)



**P NI-301.11A10-VH** (вариабельная область тяжелой цепи) (PIMC по умолчанию)  
 FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
 QLQLQESGPGLVKPSBTLTSLTCTVSGGSISSRSYWGMMRPPGKGLEWIGSIYYSGSTLYNPSLKSRA  
 FR3-----CDR3-----FR4-----  
 TMSIVTSRNQPSLKLSSVTAADTAVYYCTRMGEGGRDYWGQGLTIVTVSS  
 (SEQ ID NO: 66)

**NI-301.11A10-VK** (вариабельная область легкой цепи каппа) (PIMC по умолчанию)  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----  
 DIQMTQSPSTLSASVGGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPKKAPKVLIIYDASSLERGVPSRFSGSGSGT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 EFTLTISLQPEDDSATYYCQHNYNGYSRTFGRGTKEIK  
 (SEQ ID NO: 68)

**Q NI-301.3C9-VH** (вариабельная область тяжелой цепи) (PIMC по умолчанию)  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR  
 QVQLQESGPGLVKSSQTLTSLTCTVSGASFTRGDFYWSWIRQVPGKLEWIGYIYSTGDVYVYNNPSLKSRA  
 3-----CDR3-----FR4-----  
 NISVDTPKKQFFLKLTSLSAADTAVYFCAREGQYCSGGSCYPEYWGQGLTIVTVSS  
 (SEQ ID NO: 70)

**NI-301.3C9-VI** (вариабельная область легкой цепи лямбда)  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----  
 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDNLGHKFTCWYQQKPGQSPVLVIYQDHKRPSGIPIPERFSGSNSGDT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 ATLTISGTQAMDEAEYQCQAWAFYVVFVGGGTKLTVL  
 (SEQ ID NO: 72)

**R NI-301.14D8-VH** (вариабельная область тяжелой цепи)  
 FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3  
 EVQLVETGGRLVQPGGSRVLSCLASGFPFRNYWMSWVRQPPGKLEWVANIKEDGSDRYVVDVSVKGRFT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 IFRDIAKFNLSLQMNRLRAEDTAVYFCARIVGVIPSAFPYYLDSWQGLTIVTVSS  
 (SEQ ID NO: 74)

**NI-301.14D8-VL** (вариабельная область легкой цепи каппа) (PIMC по умолчанию)  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----  
 QSALTQPASVSGFAGQSVTISCTGTSLNIGTYNLSWYQQHPGRAPRLIIFEGNRRPPGISNRFSAKSA  
 -----CDR3-----FR4-----  
 GNTASLTVSGLLAGDEADYCCSFAGRVSLVFGGGTKLTVL  
 (SEQ ID NO: 76)

**S NI-301.9X4-VH** (вариабельная область тяжелой цепи) (PIMC по умолчанию)  
 FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
 QVQLQESGPGLVKPSBTLTSLTCSVSAGSISSHYWNWIRQPPGKLEWIGSIYHSGSTNYPNPSLKSRTVI  
 FR3-----CDR3-----FR4-----  
 SVDTSKNHVSLRLTSVTAADTAVYYCARDYVYMDVWGKGTIVTVSS  
 (SEQ ID NO: 78)

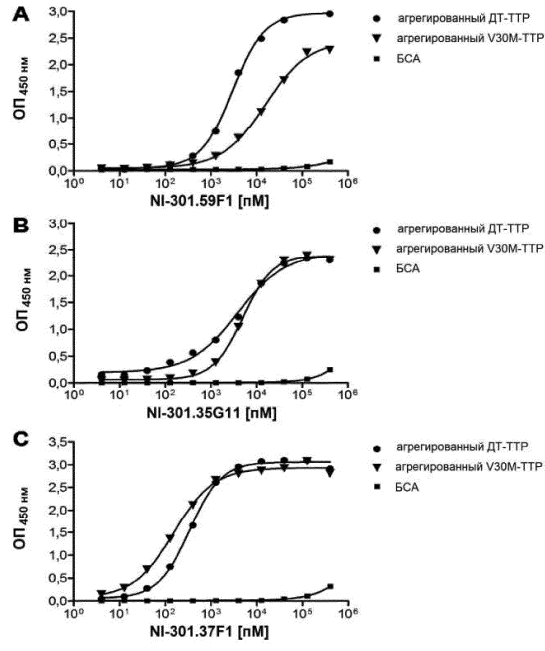
**NI-301.9X4-VL** (вариабельная область легкой цепи лямбда) (PIMC по умолчанию)  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----  
 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKYAYWYQQKPGQAPMLVIYKDSERPSGIPERFSGSLGTT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 VMLTISGVQAEDEADYCKSADSSGTYVWVFGGGTKLTVL  
 (SEQ ID NO: 80)

**T NI-301.14C3-VH** (вариабельная область тяжелой цепи) (PIMC по умолчанию)  
 FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3-  
 EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCLAAAGFTVSSHYMSWVRQAPGKLEWVSIYSGGGTYIADSVKGRFTI  
 -----CDR3-----FR4-----  
 SRDNSKNTLYLQMNRLRAEDTAVYYCAKIYRSGNTGYSYDYWGQGLTIVTVSS  
 (SEQ ID NO: 82)

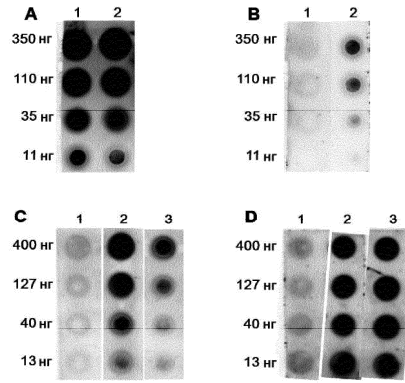
**NI-301.14C3-VL** (вариабельная область легкой цепи лямбда)  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----  
 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGSKYACWYQQKPGQSPVLVIYEDKKRPSGIPERFSGSNSGNT  
 -----CDR3-----FR4-----  
 ATLTISGTQAMDEADYFCQAWDSSTSHVVFVGGGTRTLTVL  
 (SEQ ID NO: 84)

Фиг. 1

044647

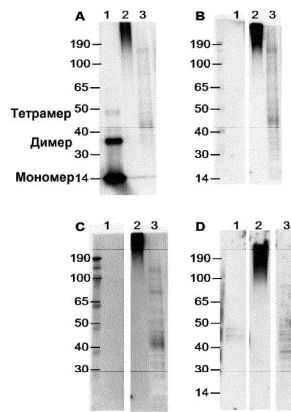


Фиг. 2



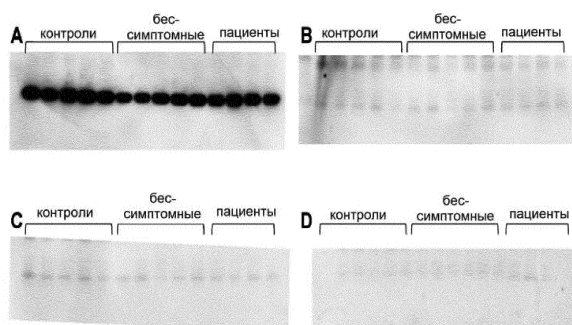
A: Дако 150 нг/мл  
 B: 59F1 50 нМ  
 C: 35G11 50 нМ  
 D: 37F1 50 нМ

Фиг. 3

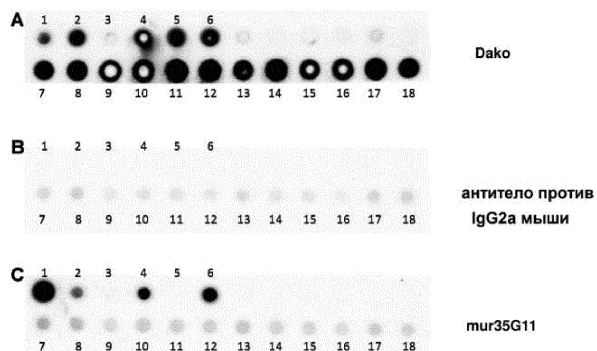


A: Дако 150 нг/мл  
 B: 59F1 50 нМ  
 C: 35G11 50 нМ  
 D: 37F1 50 нМ

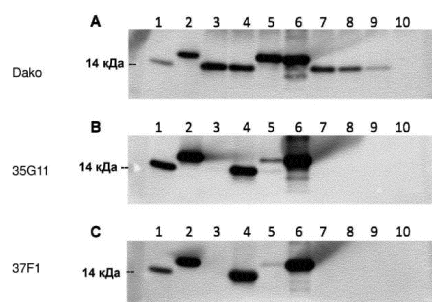
Фиг. 4



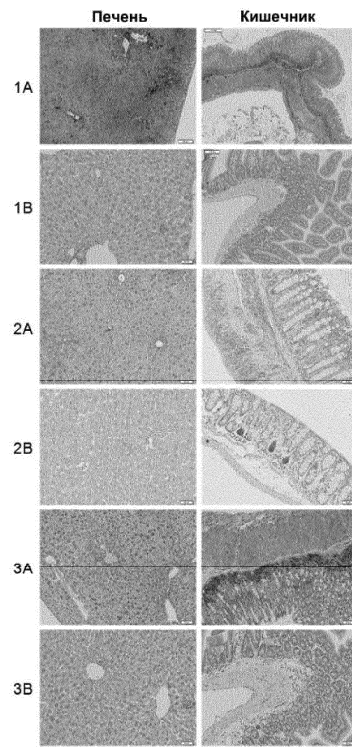
Фиг. 5



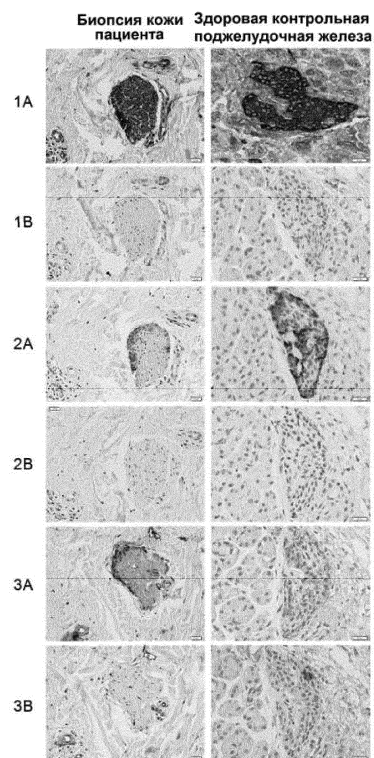
Фиг. 6



Фиг. 7

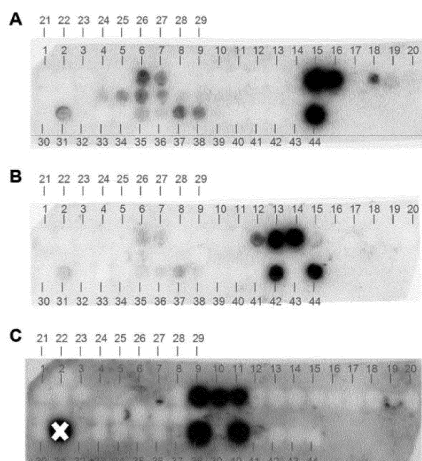


Фиг. 8



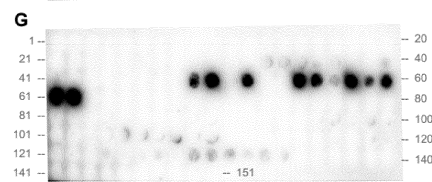
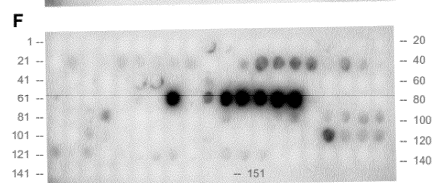
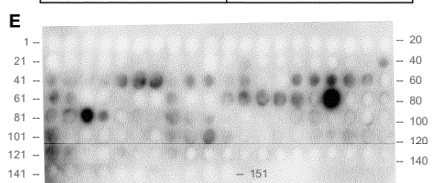
Фиг. 9

044647



**D**

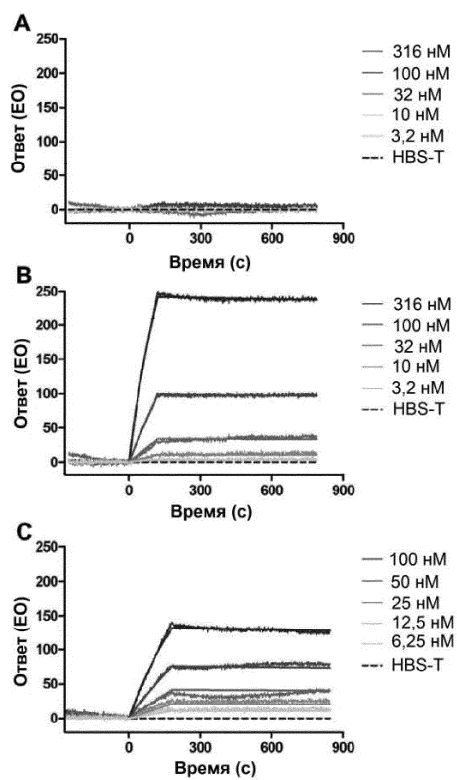
Антитело	Связывающий эпитоп
NI-301.59F1	61-EEEFVEGIY-69
NI-301.35G11	53-GELHGLTTEEE-63
NI-301.37F1	41-WEPFA-45



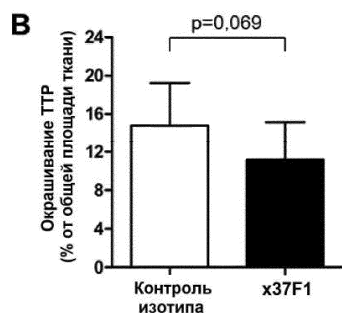
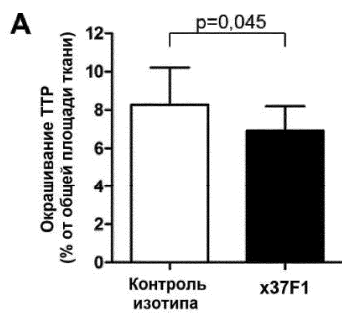
**H**

Антитело	Связывающийся эпитоп
NI-301.59F1	62-EEFXEGIY-69
NI-301.35G11	54-ELXGLTXE-61
NI-301.37F1	41-WEPFA-45

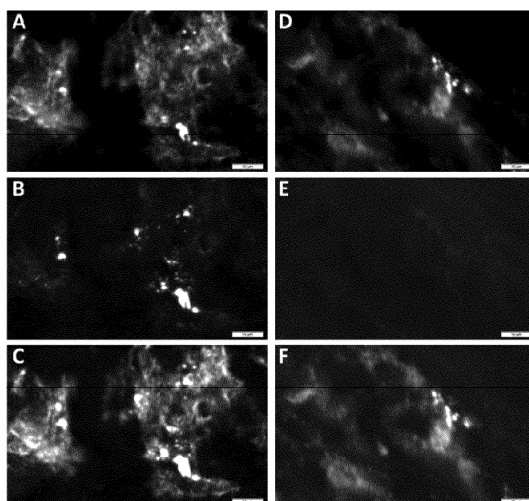
Фиг. 10



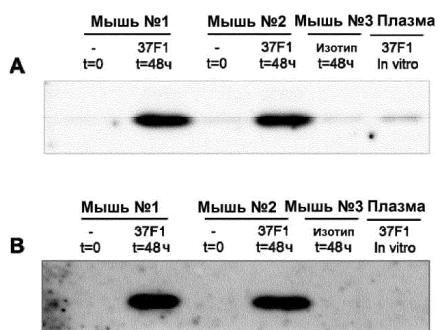
Фиг. 11



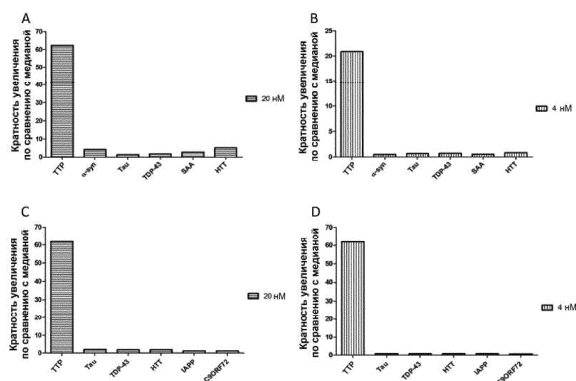
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15