

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034213**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.17

(51) Int. Cl. **G01N 33/53 (2006.01)**
A61K 39/395 (2006.01)

(21) Номер заявки
201490883

(22) Дата подачи заявки
2012.10.29

(54) **СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ АНТИТЕЛА К АЛЬФА-СИНУКЛЕИНУ**

(31) **61/554,924**

(56) **WO-A1-2010069603**
US-A1-20080300204
US-A1-20110052498

(32) **2011.11.02**

(33) **US**

(43) **2014.10.30**

(86) **PCT/US2012/062430**

(87) **WO 2013/066818 2013.05.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙОДЖЕН ИНТЕРНЭШНЛ
НЕЙРОСАЙЕНЗ ГМБХ (СН)

(72) Изобретатель:
Вайхофен Андреас (СН), Энгбер Томас
(US), Гримм Ян (СН)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится способу определения уровня α -синуклеина в головном мозге пациента, который представляет собой человека, с применением антитела к α -синуклеину. В частности, данное изобретение относится к способу, включающему определение уровней α -синуклеина в плазме крови или ЦСЖ после введения испытуемому пациенту антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарность области (CDRs), VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, имеющие последовательности аминокислот SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6 соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, имеющие последовательности аминокислот SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9 соответственно; и сравнение полученного уровня α -синуклеина в образце плазмы крови или ЦСЖ с контрольным показателем; причем разница или сходство между уровнем α -синуклеина в образце плазмы крови или ЦСЖ и контрольным показателем коррелирует с уровнем α -синуклеина в головном мозге указанного пациента. Также предложен способ отслеживания уровня α -синуклеина в головном мозге пациента, представляющего собой человека, который проходит лечение от синуклеопатического заболевания, причем указанный способ включает анализ уровня α -синуклеина в плазме крови или ЦСЖ указанного пациента, после периферического введения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, при этом уровень α -синуклеина в плазме крови или ЦСЖ пациента коррелирует с уровнем в головном мозге указанного пациента.

034213
B1

034213
B1

Содержание поданного в электронном виде перечня последовательностей в виде текстового файла ASCII (Название: sequencelistingPCT_ascii.txt; размер: 5,199 байт; и дата создания: 18 октября 2012 г.), поданного вместе с заявкой, в полном объеме включено в данный текст посредством ссылки.

Область техники

Данное изобретение относится к способу определения повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге с применением антитела к α -синуклеину. В частности, данное изобретение относится к способу определения уровней α -синуклеина в плазме крови или цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), последующему введению испытываемому пациенту антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, который способен связываться с α -синуклеином с активностью, достаточной для того, чтобы изменить общий отток α -синуклеина из головного мозга в кровь или из головного мозга в ЦСЖ.

Уровень техники

Головной мозг млекопитающих отделен от крови гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ) со стороны капилляров мозга и субарахноидальными перегородками мягкой оболочки мозга и гематоликворным барьером (гемато-ЦСЖ барьером) со стороны хориоидного сплетения. В отсутствие патологий α -синуклеин присутствует в головном мозге в довольно большом количестве. Он является исходно неструктурированным белком, который находится преимущественно в цитозоле. Он играет важную роль для синаптической передачи и синаптической пластичности, приводя к увеличению выделения медиатора из пресинаптической терминали (Liu et al., EMBO J 23:4506-4516 (2004)). Мутации α -синуклеина связывают с редкими случаями наследственной болезни Паркинсона с ранним началом, а переход α -синуклеина из растворимой в агрегированную нерастворимую форму является одним из ключевых факторов в патогенезе нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви (ДТЛ) и некоторых других нейродегенеративных заболеваний. (Dawson et al., Science 302:819-822 (2003), Bennett et al., Pharmacol Ther. 105:311-331 (2005), George, JM., Genome Biol. 3(1): reviews3002.1-reviews3002.6 (2002)). К тому же, как мономерные так и олигомерные формы α -синуклеина были обнаружены в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и сыворотке крови пациентов с болезнью Паркинсона, так как α -синуклеин и даже его агрегированные формы, по-видимому, могут проникать через гематоэнцефалический барьер (El-Agnaf et al., FASEB J. 20:419-425 (2006), Tokuda et al., Biochem Biophys Res Commun. 349:162-166 (2006), Lee et al., J Neural Transm. 113:1435-1439 (2006), Mollenhauer et al., Exp Neurol. 213:315-325 (2008), El-Agnaf et al., FASEB J. 17:1945-1947 (2003), Li et al., Exp Neurol 204:583-588 (2007)).

Исследования по иммунизации в мышинных моделях болезни Паркинсона показывают, что мышинные моноклональные антитела к α -синуклеину могут уменьшить накопление внутриклеточных агрегатов α -синуклеина (Masliah et al., Neuron, 46: 857-868 (2005); Masliah et al., PLoS One, 6(4): e19338 (2011), подтверждая идею о том, что антитела, которые нейтрализуют нейротоксические агрегаты, не препятствуя при этом полезным функциям мономерной формы α -синуклеина, могут являться эффективными терапевтическими средствами. Тем не менее, терапевтической и диагностической пользе мышинных антител при применении на людях препятствует выработка человеческих антимышиных антител (ЧАА), связанная с их нечеловеческим происхождением.

Соответственно, существует потребность в разработке способа определения у пациентов повышенных уровней α -синуклеина в головном мозге.

Краткое описание изобретения

Один из вариантов реализации изобретения относится к способу определения повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге испытываемого пациента, который представляет собой человека, включающий (а) анализ уровня α -синуклеина в образце плазмы крови, взятом у испытываемого пациента через определенный временной интервал после периферического введения испытываемому пациенту антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело или его фрагмент может связывать α -синуклеин с аффинностью, достаточной для того, чтобы изменить общий отток α -синуклеина из головного мозга в кровь; (б) сравнение полученного уровня α -синуклеина у испытываемого пациента с контрольным показателем; причем разница или сходство между уровнем α -синуклеина в образце плазмы и контрольным показателем коррелирует с уровнем α -синуклеина в головном мозге испытываемого пациента.

Также раскрывается способ диагностики повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге испытываемого пациента, включающий: (а) обеспечение наличия антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело или его фрагмент может связывать α -синуклеин с аффинностью, достаточной для того, чтобы изменить общий отток α -синуклеина из головного мозга в кровь; (б) распоряжение о том, чтобы поставщик медицинских услуг осуществил периферическое введение испытываемому пациенту антитела и взял образец плазмы крови пациента через определенный временной интервал после введения; (в) анализ уровня α -синуклеина в образце плазмы крови; (г) сравнение полученного уровня α -синуклеина у испытываемого пациента с контрольным показателем; причем разница или сходство между уровнем α -синуклеина в образце плазмы и контрольным показателем коррелирует с уровнем α -синуклеина в головном мозге испытываемого пациента.

Дополнительно раскрывается способ диагностики повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента, включающий (а) периферическое введение испытуемому пациенту антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело или его фрагмент может связывать α -синуклеин с аффинностью, достаточной для того, чтобы изменить общий отток α -синуклеина из головного мозга в кровь; (б) получение образца плазмы крови испытуемого пациента через определенный временной интервал после введения и передачу образца для определения уровня α -синуклеина в образце; (в) сравнение уровня α -синуклеина в образце плазмы крови с контрольным показателем; причем разница или сходство между уровнем α -синуклеина в образце плазмы и контрольным показателем коррелирует с уровнем α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента.

Дополнительно раскрывается способ, соответствующий описанному в данном тексте, дополнительно включающий сравнение уровня α -синуклеина в указанном образце плазмы с образцом плазмы, взятом у испытуемого пациента до введения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента.

В конкретных вариантах реализации изобретения контрольным показателем, применяемым в вышеописанном способе, являются уровни α -синуклеина, измеренные у одного или более контрольных пациентов, причем контрольные пациенты являются нормальными здоровыми людьми и людьми с синуклеопатиями разной степени тяжести.

Дополнительно раскрывается способ отслеживания уровня α -синуклеина в головном мозге пациента, который проходит лечение от синуклеопатического заболевания, включающий анализ уровня α -синуклеина в образце плазмы крови пациента через определенное время после периферического введения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело или его фрагмент может связывать α -синуклеин с аффинностью, достаточной для того, чтобы изменить общий отток α -синуклеина из головного мозга в кровь; и в котором уровень α -синуклеина в образце плазмы крови пациента коррелирует с уровнем в головном мозге пациента. В отдельных вариантах реализации изобретения вышеописанный способ дополнительно включает анализ уровня α -синуклеина в образце плазмы крови пациента через определенное время после периферического введения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, и получение, таким образом, графика изменения со временем уровня α -синуклеина в головном мозге пациента.

Некоторые варианты реализации изобретения включают описанный в данном тексте способ, причем этот способ относится к диагностике повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента путем анализа уровня α -синуклеина в образце ЦСЖ, взятом у испытуемого пациента через определенные временные интервалы после введений антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело или его фрагмент может связывать α -синуклеин с аффинностью, достаточной для того, чтобы изменить общий отток α -синуклеина из головного мозга в ЦСЖ, а разница или сходство между уровнем α -синуклеина в образце ЦСЖ и контрольным показателем коррелирует с уровнем α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента. Некоторые варианты реализации изобретения включают описанный в данном тексте способ, дополнительно включающий сравнение уровня α -синуклеина в указанном образце ЦСЖ с образцом ЦСЖ, взятом у испытуемого пациента до введения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента.

Некоторые варианты реализации изобретения включают способ отслеживания уровня α -синуклеина в головном мозге пациента, который проходит лечение от синуклеопатического заболевания, включающий анализ уровня α -синуклеина в образце ЦСЖ пациента через определенное время после периферического введения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело или его фрагмент может связывать α -синуклеин с аффинностью, достаточной для того, чтобы изменить общий отток α -синуклеина из головного мозга в ЦСЖ; и в котором уровень α -синуклеина в образце ЦСЖ пациента коррелирует с уровнем в головном мозге пациента.

Некоторые варианты реализации изобретения включают описанный в данном тексте способ, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с тем же эпитопом α -синуклеина, что и контрольное антитело, содержащее VH и VL, причем VH содержит SEQ ID NO: 2, а VL содержит SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует контрольное антитело, содержащее VH и VL, причем VH содержит SEQ ID NO: 2, а VL содержит SEQ ID NO: 3.

Некоторые варианты реализации изобретения включают способ согласно описанному в данном тексте, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL, причем VH содержит аминокислотные последовательности VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3 с последовательностями SEQ ID NOs: 5, 6, 7, а VL содержит аминокислотные последовательности VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 с последовательностями SEQ ID NOs: 7, 8, 9 соответственно.

Некоторые варианты реализации изобретения включают способ согласно описанному в данном тексте, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2 и VL аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3.

Также раскрывается способ согласно описанному в данном тексте, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий фрагмент является одноцепочечным Fv фрагментом (scFv), F(ab') фрагментом, F(ab) фрагментом или F(ab')₂ фрагментом.

Некоторые варианты реализации изобретения включают способ согласно описанному в данном тексте, отличающийся тем, что введение препарата осуществляется путем внутривенной инъекции антитела. В одном варианте реализации антитело является человеческим.

Другие варианты реализации изобретения включают способ согласно описанному в данном тексте, отличающийся тем, что определенный временной интервал является меньшим, чем одна неделя, либо меньшим или равным 24 ч, либо меньшим или равным 3 ч.

Некоторые варианты реализации изобретения включают способ согласно описанному в данном тексте, отличающийся тем, что синуклеопатическое заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Паркинсона (БП), деменции при болезни Паркинсона (ДБП), деменции с тельцами Леви (ДТЛ), варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (ВБАТЛ), множественной системной атрофии (МСА), идиопатической ортостатической гипотензии (ИОГ), нейродегенерации с церебральным накоплением железа 1-го типа (НЦНЖ-1), болезни Альцгеймера, болезни Пика, младенческой нейроаксональной дистрофии (болезнь Галлервордена-Шпатца), бокового амиотрофического склероза, травматических повреждений головного мозга и синдрома Дауна.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 (А-В): зависящий от дозировки пик α -синуклеина в плазме после введения антитела 12F4 трансгенным мышам с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина.

Фиг. 2: временная зависимость пиковой концентрации человеческого α -синуклеина в плазме и концентрации антитела 12F4 в плазме.

Фиг. 3 (А-В): кратковременная терапия трансгенных мышей с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина высокими дозами антитела 12F4 снижает уровни человеческого α -синуклеина в головном мозге.

Фиг. 4 (А-В): уровни человеческого α -синуклеина в плазме в значительной степени отражают уровни α -синуклеина в головном мозге после инъекции антитела 12F4.

Фиг. 5 (А-В): уровни человеческого α -синуклеина в плазме (А) и уровни химерного антитела 12F4 (Б) были определены с помощью ИФА. (В) Наблюдали существенную корреляцию между уровнями α -синуклеина в плазме и головном мозге после длительной шестимесячной терапии трансгенных мышей с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина химерным антителом 12F4.

Фиг. 6: пик α -синуклеина в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и соотношение содержания 124F в сыворотке крови/ЦСЖ около 0,1% после введения 124F яванским макакам.

Фиг. 7: *in vivo* микродиализ трансгенных α -синуклеиновых мышей показывает снижение содержания α -синуклеина в интерстициальной жидкости головного мозга (ИЖМ) после введения 124F.

Детальное описание изобретения

I. Определения.

Следует отметить, что форма единственного числа может относиться к одному или более объектам; например, выражение "антитело к α -синуклеину" стоит понимать как обозначающее одно или более антител, которые специфически связываются с α -синуклеином. Таким образом, форма единственного числа и термины "один или более" или "по меньшей мере один" могут взаимозаменяемо употребляться в данном тексте.

Употребляемые в данном тексте термины "синуклеопатические заболевания" или "синуклеопатии" представляют группу разнообразных нейродегенеративных расстройств, которую объединяет общее патологическое нарушение, связанное с наличием агрегатов нерастворимого белка α -синуклеина в избирательно уязвимых популяциях нейронов и нейроглиальных клеток. Такие расстройства включают болезнь Паркинсона (БП), деменцию при болезни Паркинсона (ДБП), деменцию с тельцами Леви (ДТЛ), вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (ВБАТЛ), множественную системную атрофию (МСА), идиопатическую ортостатическую гипотензию (ИОГ), нейродегенерацию с церебральным накоплением железа 1-го типа (НЦНЖ-1), болезнь Альцгеймера, болезнь Пика, младенческую нейроаксональную дистрофию (болезнь Галлервордена-Шпатца), боковой амиотрофический склероз, травматические повреждения головного мозга и синдром Дауна. Клинически они характеризуются хроническим и прогрессирующим ухудшением двигательной функции, когнитивной, поведенческой функций и функции вегетативной нервной системы в зависимости от распространения патологических изменений.

Если не указано иное, термины "расстройство", "заболевание" и "болезнь" взаимозаменяемо употребляются в данном тексте.

Употребляемые в данном тексте термины "связывающая молекула" или "антиген-связывающая молекула" обозначают в широком смысле молекулу, которая специфически связывает антигенную детерминанту. Неограничивающими примерами антиген-связывающих молекул являются антитела и их фрагменты, которые сохраняют свойство антиген-специфического связывания, а также другие, не являющиеся антителами молекулы, которые связываются с α -синуклеином, включая, но не ограничиваясь этим,

гормоны, рецепторы, лиганды, молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГ), шапероны, такие как белки теплового шока (БТШ), а также молекулы межклеточной адгезии, такие как представители надсемейств кадгерина, интергрина, лектина С-типа и иммуноглобулина (Ig - от англ. "immunoglobulin"). Таким образом, чтобы исключить двусмысленное толкование, но не ограничивая объема изобретения, следующие варианты реализации описаны применительно к антителам и подобным антителам молекулам, которые представляют собой связывающие молекулы для разработки терапевтических и диагностических средств. В другом варианте реализации изобретения описанная связывающая молекула содержит по меньшей мере одну тяжелую или легкую цепь CDR-области молекулы антитела. В другом варианте реализации изобретения описанная связывающая молекула содержит по меньшей мере две CDR-области из одной или более молекул антител. В другом варианте реализации изобретения описанная связывающая молекула содержит по меньшей мере три CDR-области из одной или более молекул антител. В другом варианте реализации изобретения описанная связывающая молекула содержит по меньшей мере четыре CDR-области из одной или более молекул антител. В другом варианте реализации изобретения описанная связывающая молекула содержит по меньшей мере пять CDR-областей из одной или более молекул антител. В другом варианте реализации изобретения описанная связывающая молекула содержит по меньшей мере шесть CDR областей из одной или более молекул антител.

Раскрытый в данном тексте способ диагностики повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента включает введение пациенту α -синуклеин связывающей молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного. За исключением случаев, которые конкретно относятся к полноразмерным антителам, таким как антитела природного происхождения, термин "антитело к α -синуклеину" включает в себя полноразмерные антитела, а также антигенсвязывающие фрагменты, варианты, аналоги или производные таких антител, например молекулы антител природного происхождения или иммуноглобулина, либо искусственные молекулы антител или фрагменты, которые связывают антиген таким же образом, что и молекулы антител.

Термины "антитело" и "иммуноглобулин" взаимозаменяемо употребляются в данном тексте. Антитело или иммуноглобулин содержит по меньшей мере один вариабельный домен тяжелой цепи и обычно содержит по меньшей мере вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи. Основные структуры иммуноглобулина позвоночных относительно хорошо известны. См., например, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Употребляемый в данном тексте термин "иммуноглобулин" включает множество обширных классов полипептидов, которые можно определить биохимическим способом. Специалистам в данной области техники известно, что тяжелые цепи классифицируются по классам гамма, мю, альфа, дельта или ипсилон (γ , μ , α , δ , ϵ) с существованием среди них внутренних подклассов (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). "Класс" антитела определяется природой цепи и обозначается как IgG, IgM, IgA IgG или IgE соответственно. Подклассы иммуноглобулина (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д., хорошо характеризуют и, как известно, определяют функциональную специализацию. Модифицированные варианты каждого из этих классов и изотипов в контексте данного изобретения являются четко различимыми для специалиста в данной области техники и соответственно входят в объем данного изобретения. Понятно, что все классы иммуноглобулина входят в объем данного изобретения. Приведенное ниже обсуждение в общем случае относится к IgG классу молекул иммуноглобулина. В случае IgG типичная молекула иммуноглобулина содержит две идентичные легкие цепи полипептидов с молекулярной массой приблизительно в 23,000 Дальтон и две идентичные тяжелые цепи полипептидов с молекулярной массой 53,000-70,000. Обычно четыре цепи соединены с помощью дисульфидных связей в конфигурацию "Y"-типа, в которой легкие цепи скрепляют тяжелые цепи, располагаясь так, что их начало находится возле устья "Y", а продолжение проходит через всю вариабельную область.

Легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда (κ , λ). Тяжелая цепь любого класса может быть связана с легкой цепью как каппа, так и лямбда классов. Как правило, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а "хвостовые" части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями в случае, когда иммуноглобулины вырабатываются гибридомами, В-клетками или клетками-хозяевами, полученными методами генной инженерии. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности идут от N-конца, находящегося на разветвленных окончаниях Y конфигурации, до C-конца, находящегося внизу каждой цепи.

Как легкая, так и тяжелая цепи разделены на области, характеризующиеся структурной и функциональной гомологией. Термины "константный" и "вариабельный" употребляются функционально. В связи с этим следует принимать во внимание, что вариабельные домены фрагментов легкой (VL или VK) и тяжелой (VH) цепей определяют распознавание и специфичность антигена. И наоборот, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) определяют важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание с Fc рецептором, связывание компонента и тому подобное. Обычно нумерация доменов константных областей возрастает с увеличением расстояния от антигенсвязывающего участка или amino-конца антитела. N-концевой фрагмент является вариабельной областью, на C-концевом фрагменте находится константная область; домены CH3 и CL

обычно содержат карбокси-конец соответственно тяжелой или легкой цепей.

Как указано выше, наличие варибельной области позволяет антителу избирательно распознавать и специфически связывать эпитопы антигенов. Это означает, что VL домен и VH домен или совокупность из определяющих комплементарность областей (CDRs) в составе этих варибельных доменов антитела образуют вместе варибельную область, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий участок. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий участок, который находится на конце каждого из рукавов Y. В частности, антигенсвязывающий участок определяется тремя CDR областями на каждой из VL и VH цепей. В некоторых случаях, например в случае некоторых молекул иммуноглобулина, полученных от представителей семейства верблюдовых или полученных путем генной инженерии на основе иммуноглобулинов верблюдовых, вся молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей и не содержать легких цепей. См., например, Hamers-Casterman et al, Nature 363:446-448 (1993).

В антителах природного происхождения шесть "определяющих комплементарность областей" или "CDR-областей", присутствующих в каждом антигенсвязывающем участке, являются короткими, неприлегающими последовательностями аминокислот, которые специфически расположены таким образом, чтобы образовывать антигенсвязывающий домен, когда антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. Аминокислотные остатки антигенсвязывающих доменов, называемые "каркасными" областями, обладают меньшей межмолекулярной варибельностью. Каркасные области в большинстве случаев принимают β -складчатую конформацию, а CDR-области образуют петли, которые связывают и в некоторых случаях образуют часть β -складчатой структуры. Таким образом, каркасные области принимают участие в образовании каркаса, который обеспечивает расположение CDR-областей в правильной ориентации путем межцепевых нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный расположенными в определенном порядке CDR-областями, определяет комплементарность поверхности к эпитопу иммунореактивного антигена. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с соответствующим ему эпитопом. Специалист в данной области техники сможет легко идентифицировать аминокислоты, составляющие CDR-области и каркасные области соответственно, для каждого конкретного варибельного домена тяжелой или легкой цепей, так как они уже были точно определены (смотрите ниже).

В том случае, когда существует два или более определений термину, который употребляется и/или является принятым в данной области техники, определение термина, которое используется в данном тексте, включает все эти значения, если иное четко не указано. Конкретным примером является употребление термина "определяющая комплементарность область" ("CDR") для того, чтобы описать неприлегающие антигенсвязывающие участки, которые находятся в составе варибельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепей. Эта конкретная область была описана в работах Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" и Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), которые включены в данный текст посредством ссылок и в которых определения включают перекрытие или подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, любое из определений для обозначения CDR-области антитела или его вариантов входит в формулировку того термина, который определен и употреблен в данном тексте. Соответствующие аминокислотные остатки, которых входят в состав CDR-областей по определению любой из приведенных выше ссылок, приведены ниже в табл. 1 для сравнения. Точное количество остатков, которые входят в состав конкретной CDR-области, будет варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR-области. Специалисты в данной области техники легко могут определить, какие именно остатки входят в состав конкретной CDR-области данной аминокислотной последовательности варибельной области антитела.

Таблица 1. Определения CDR областей¹

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

¹Нумерация всех определений CDR-областей в табл. 1 соответствует системе нумерации, введенной Kabat et al. (см. ниже)

Kabat et al. также ввели систему нумерации для последовательностей варибельных доменов, которую можно применить к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначно применить систему "нумерации по Кабату" к любой последовательности варибельного домена без использования каких-либо экспериментальных данных за исключением самой последовательности. Употребляемое в данном тексте выражение "нумерация по Кабату" относится к системе нумерации, введен-

ной в работе Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest." Если не указано иное, ссылки на нумерацию положений конкретных аминокислотных остатков в антителе к α -синуклеину или его антигенсвязывающем фрагменте, варианте или производном, которые являются предметом настоящего изобретения, соответствуют системе нумерации по Кабату.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, являющиеся предметом настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются этим, поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитопсвязывающие фрагменты, например Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fvs, одноцепочечные Fvs (scFv), дисульфидсвязанные Fvs (sdFv), фрагменты, содержащие a VL или VH домен, фрагменты, полученные с помощью экспрессионной библиотеки Fab, и антиидиотипические (anti-Id) антитела. Молекулы ScFv известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 5892019. Молекулы иммуноглобулина или антитела, являющиеся предметом настоящего изобретения, могут принадлежать любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, and IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2 и т.д.) или подклассу молекул иммуноглобулина.

Употребляемый в данном тексте термин "фрагмент тяжелой цепи" обозначает аминокислотные последовательности, полученные из тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид, содержащий фрагмент тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один элемент из группы, состоящей из: VH домена, CH1 домена, шарнирного (например, верхней, средней и/или нижней шарнирной области) домена, CH2 домена, CH3 домена либо их вариантов или фрагментов. Например, связывающий полипептид, применяемый в изобретении, может содержать полипептидную цепь, содержащую CH1 домен; полипептидную цепь, содержащую CH1 домен, по меньшей мере фрагмент шарнирного домена и CH2 домен; полипептидную цепь, содержащую CH1 домен и CH3 домен; полипептидную цепь, содержащую CH1 домен, по меньшей мере фрагмент шарнирного домена и CH3 домен, или полипептидную цепь, содержащую CH1 домен, по меньшей мере фрагмент шарнирного домена, CH2 домен и CH3 домен. В другом варианте реализации полипептид, являющийся предметом настоящего изобретения, содержит полипептидную цепь, содержащую CH3 домен. Более того, в связывающем полипептиде, применяемом в изобретении, может отсутствовать по меньшей мере фрагмент CH2 домена (например, весь или часть CH2 домена). Как было указано выше, специалисту в данной области техники понятно, что все эти домены (например, фрагменты тяжелой цепи) могут быть модифицированы таким образом, что их аминокислотные последовательности будут отличаться от таковых в молекулах иммуноглобулина природного происхождения.

В некоторых вариантах реализации в описанных в данном тексте антителах к α -синуклеину либо их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных фрагменты тяжелой цепи одной полипептидной цепи мультимера идентичны таковым, принадлежащим второй полипептидной цепи мультимера. И напротив, являющиеся предметом настоящего изобретения мономеры, содержащие фрагменты тяжелой цепи, не являются идентичными. Например, каждый мономер может содержать отличный мишеньсвязывающий участок, образуя, например, биспецифическое антитело.

Фрагменты тяжелой цепи связывающей молекулы, применяемой в описанных в данном тексте способах, могут быть получены из разных молекул иммуноглобулина. Например, фрагмент тяжелой цепи полипептида может содержать C_{H1} домен, полученный из молекулы IgG1, и шарнирную область, полученную из молекулы IgG3. В другом примере фрагмент тяжелой цепи может содержать шарнирную область, полученную частично из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG3. В другом примере фрагмент тяжелой цепи может содержать химерную шарнирную область, полученную частично из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG4.

Употребляемый в данном тексте термин "фрагмент легкой цепи" обозначает аминокислотные последовательности, полученные из легкой цепи иммуноглобулина, например каппа или лямбда легкой цепи. Предпочтительно фрагмент легкой цепи содержит по меньшей мере один из доменов VL или CL.

Как было указано выше, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей различных классов иммуноглобулина хорошо известны. Употребляемый в данном тексте термин "VH домен" обозначает аминоконцевой вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, а термин "CH1 домен" обозначает первый (обычно аминоконцевой) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. CH1-домен прилегает к VH домену и является аминоконцевым по отношению к шарнирной области тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина.

Употребляемый в данном тексте термин "CH2-домен" обозначает фрагмент тяжелой цепи молекулы, который простирается, например, приблизительно от 244 до 360 остатка антитела согласно общепринятому порядку нумерации (остатки от 244 до 360 согласно системе нумерации по Кабату; и остатки 231-340 согласно Европейской системе нумерации; см. цитируемую работу Kabat EA et al.). CH2-домен является уникальным в том смысле, что он не является парным другому домену. Напротив, две N-связанные углеводные цепи расположены между двумя CH2-доменами исходной природной молекулы IgG. Также хорошо известно, что CH3-домен простирается от CH2-домена до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

Употребляемый в данном тексте термин "шарнирная область" обозначает фрагмент тяжелой цепи молекулы, который соединяет CH1 домен с CH2 доменом. Эта шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, позволяя, таким образом, двум N-концевым антигенсвязывающим участкам двигаться независимо. Шарнирные области можно разделить на три основных домена: верхний, средний и нижний домены (Roux et al., J. Immunol. 161:4083 (1998)).

Употребляемый в данном тексте термин "дисульфидная связь" обозначает ковалентную связь, которую образуют два атома серы. Такая аминокислота как цистеин содержит тиоловую группу, которая может образовывать дисульфидную связь или дисульфидный мостик со второй тиоловой группой. В большинстве молекул IgG природного происхождения CH1 и CL области связаны между собой дисульфидной связью, а две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 согласно системе нумерации по Кабату (положение 226 или 229 по Европейской системе нумерации).

Антитела к α -синуклеину либо их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, раскрытые в данном тексте, могут быть описаны или определены в таких терминах, как эпитоп(ы) или фрагмент(ы) антигена(ов), например целевого полипептида, описанного в данном тексте (например, α -синуклеина), который они распознают и специфически связывают. Фрагмент целевого полипептида, который специфически взаимодействует с антигенсвязывающим доменом антитела, называется "эпитопом" или "антигенной детерминантой". Целевой полипептид может содержать один эпитоп, но, как правило, он содержит по меньшей мере два эпитопа и имеет в своем составе любое количество эпитопов, которое зависит от размера, конформации и типа антигена. Кроме того, стоит отметить, что "эпитоп" целевого полипептида может представлять собой или может содержать элементы, не относящиеся к полипептиду, например эпитоп может содержать боковую углеводную цепь.

Считается, что для антитела минимальный размер эпитопа пептида или полипептида составляет около четырех-пяти аминокислот. Эпитопы пептида или полипептида предпочтительно содержат по меньшей мере семь, более предпочтительно по меньшей мере девять и наиболее предпочтительно между по меньшей мере 15 и около 30 аминокислотами. Так как CDR область может распознать пептид или полипептид антигена, находящийся в своей третичной форме, аминокислоты, входящие в состав эпитопа, не должны быть прилегающими, а в некоторых случаях могут даже не принадлежать одной пептидной цепи. Эпитоп пептида или полипептида, распознаваемый антителами к α -синуклеину, являющимися предметом настоящего изобретения, может содержать последовательность из по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, более предпочтительно по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или от около 15 до около 30 прилегающих или неприлегающих аминокислот α -синуклеина.

Под "специфически связывается" обычно подразумевают то, что антитело связывается с эпитопом с помощью своего антигенсвязывающего домена, и то, что связывание предусматривает наличие некоторой комплементарности между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно этому определению говорят, что антитело "специфически связывается" с эпитопом, в том случае, если оно связывается с этим эпитопом с помощью своего антигенсвязывающего домена более легко, чем оно связывалось бы с произвольным неродственным эпитопом. Термин "специфичность" употребляется в данном тексте для оценки относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, может считаться, что антитело "А" обладает более высокой специфичностью в отношении данного эпитопа, чем антитело "Б", или можно сказать, что антитело "А" связывается с эпитопом "В" с более высокой специфичностью, чем та, которой оно обладает в отношении эпитопа "Г".

Под выражением "предпочтительно связывается" подразумевается, что антитело специфически связывается с эпитопом более легко, чем оно связывалось бы с родственным, схожим, гомологичным или аналогичным эпитопом. Таким образом, антитело, которое "предпочтительно связывается" с данным эпитопом, более вероятно свяжется с этим эпитопом, чем с родственным эпитопом, несмотря даже на то, что такое антитело может давать перекрестную реакцию с родственным эпитопом.

В качестве неограничивающего примера можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает указанный первый эпитоп с константой диссоциации (K_D) меньшей, чем K_D антитела в случае второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый антиген, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая по своей величине по меньшей мере на порядок меньше, чем K_D антитела в случае второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая по своей величине по меньшей мере на два порядка меньше, чем K_D антитела в случае второго эпитопа.

В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$) меньшей, чем $k(\text{off})$ антитела в случае второго эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая по своей величине, по меньшей мере, на порядок меньше, чем $k(\text{off})$ антитела в случае второго

эпитопа. В другом неограничивающем примере можно считать, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью, которая по своей величине по меньшей мере на два порядка меньше, чем $k(\text{off})$ антитела в случае второго эпитопа.

Можно считать, что описанное в данном тексте антитело либо его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, связывает описанный в данном тексте целевой полипептид (например, человеческий α -синуклеин) либо его фрагмент или вариант со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$) меньшей либо равной $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, 10^{-2} c^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-3} c^{-1} . В более предпочтительных случаях можно считать, что антитело, являющееся предметом настоящего изобретения, связывает описанный в данном тексте целевой полипептид (например, человеческий α -синуклеин) либо его фрагмент или вариант со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$), меньшей либо равной $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, 10^{-4} c^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$, или 10^{-5} c^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$, 10^{-6} c^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-7} c^{-1} .

Можно считать, что описанное в данном тексте антитело либо его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, связывает описанный в данном тексте целевой полипептид (например, человеческий α -синуклеин) либо его фрагмент или вариант со скоростью ассоциации ($k(\text{on})$), большей либо 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 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. В более предпочтительных случаях можно считать, что антитело, являющееся предметом настоящего изобретения, связывает описанный в данном тексте целевой полипептид (например, человеческий α -синуклеин) либо его фрагмент или вариант со скоростью ассоциации ($k(\text{on})$), большей либо 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 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

Считается, что антитело конкурентно ингибирует связывание контрольного антитела с данным эпитопом, если оно предпочтительно связывается с этим эпитопом до состояния, когда оно в определенной степени блокирует связывание контрольного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование может быть определено любым известным в данной области техники способом, например методом конкурентного ИФА. Считается, что антитело конкурентно ингибирует связывание контрольного антитела с данным эпитопом на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80, по меньшей мере 70, по меньшей мере 60 или по меньшей мере 50%.

Употребляемый в данном тексте термин "аффинность" относится к определению силы связывания отдельного эпитопа с CDR областью молекулы иммуноглобулина. Смотрите, например, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.), страницы 27-28. Употребляемый в данном тексте термин "достаточная аффинность" означает достаточную силу связывания антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента с α -синуклеином или его эпитопом для того, чтобы изменить общий отток альфа синуклеина из головного мозга в кровь либо из головного мозга в ЦСЖ. Употребляемый в данном тексте термин "общий отток" означает полный поток α -синуклеина из головного мозга в кровь либо из головного мозга в ЦСЖ.

Употребляемый в данном тексте термин "авидитет" относится к общей стабильности комплекса между популяцией иммуноглобулинов и антигеном, то есть к эффективной силе связывания смеси иммуноглобулина и антигена. Смотрите, например, Harlow, страницы 29-34. Авидитет связан как с аффинностью отдельных молекул иммуноглобулина в популяции к специфическим эпитопам, так и с валентностями иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между бивалентным моноклональным антителом и антигеном с высокоповторяющейся структурой эпитопа, такой как полимер, будет характеризоваться высоким авидитетом.

Антитела к α -синуклеину либо их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, раскрытые в данном тексте, также могут быть описаны или определены в терминах их перекрестной реактивности. Употребляемый в данном тексте термин "перекрестная реактивность" обозначает способность антитела, специфического одному антигену, вступать в реакцию с другим антигеном; и является мерой родства между двумя различными антигенными соединениями. Таким образом, антитело является перекрестно реактивным, если оно связывается с эпитопом, отличным от того, который индуцировал его образование. Перекрестно реактивный эпитоп, как правило, содержит много таких же комплементарных структурных элементов, что и индуцирующий эпитоп, и в некоторых случаях может подходить лучше, чем основной.

Например, определенные антитела в некоторой степени обладают перекрестной реактивностью, которая позволяет им связывать родственные, но неидентичные эпитопы, к примеру, эпитопы на 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% идентичные (по расчету с помощью способов, известных в данной области техники и описанных в данном тексте) контрольному эпитопу. Считается, что антитело обладает низкой перекрестной реактивностью или не обладает ею вообще, если оно не связывает эпитопы менее чем на 95%, менее чем на 90, менее чем на 85, менее чем на 80, менее чем на 75, менее чем на 70, менее чем на 65, менее чем на 60, менее чем на 55 и менее чем на 50% идентичные (по расчету с помощью способов, известных в данной области техники и описанных в данном тексте) контрольному эпитопу. Антитело можно считать "высокоспецифическим" по отношению к определенному эпитопу, если оно не связывает любой другой ана-

лог, ортолог или гомолог этого эпитопа.

Связывающие α -синуклеин молекулы, например антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, описанные в данном тексте, также могут быть описаны или определены в терминах их аффинности связывания по отношению к полипептиду, являющемуся предметом данного изобретения, например человеческому α -синуклеину. Предпочтительные аффинности связывания включают такие, которые характеризуются константой диссоциации или K_d меньшей чем 5×10^{-2} М, 10^{-2} М, 5×10^{-3} М, 10^{-3} М, 5×10^{-4} М, 10^{-4} М, 5×10^{-5} М, 10^{-5} М, 5×10^{-6} М, 10^{-6} М, 5×10^{-7} М, 10^{-7} М, 5×10^{-8} М, 10^{-8} М, 5×10^{-9} М, 10^{-9} М, 5×10^{-10} М, 10^{-10} М, 5×10^{-11} М, 10^{-11} М, 5×10^{-12} М, 10^{-12} М, 5×10^{-13} М, 10^{-13} М, 5×10^{-14} М, 10^{-14} М, 5×10^{-15} М или 10^{-15} М.

Фрагменты антител, включая одноцепочечные антитела, могут содержать вариабельную область(и), как одну, так и в сочетании с каким-либо из следующих полноразмерных элементов или его фрагментом: шарнирной областью, СН1, СН2 и СН3 доменами. Также включены антигенсвязывающие фрагменты, также содержащие любую комбинацию из вариабельной области(ей) с шарнирной областью, СН1, СН2 и СН3 доменами. Связывающие молекулы, например описанные в данном тексте антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут иметь любое животное происхождение, включая птиц и млекопитающих. Антитела могут являться антителами человека, мыши, осла, кролика, козла, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или цыпленка. В другом варианте реализации изобретения вариабельная область может быть получена от хрящевых рыб (например, от акул).

Употребляемым в данном тексте термином "химерное антитело" принято обозначать любое антитело, в котором иммунореактивная область или участок принадлежит или получена от одного вида, а константная область (которая может быть полной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) принадлежит другому виду. Например, целевая связывающая область или участок могут быть нечеловеческого происхождения (например, от мыши или примата), а константная область может быть человеческого происхождения. И наоборот, связывающая область полностью человеческого происхождения может сочетаться с константной областью нечеловеческого происхождения (например, мышинной).

Употребляемые в данном тексте термины "муринизированное антитело" или "муринизированный иммуноглобулин" обозначают антитело, содержащее одну или более CDR областей, полученных из человеческого антитела, являющегося предметом настоящего изобретения; и человеческую каркасную область, которая содержит аминокислотные замещения и/или делеции, и/или инсерции на основе последовательности мышинного антитела. Человеческий иммуноглобулин, являющийся источником CDR областей, называется "родительским" или "акцепторным", а мышинное антитело, являющееся источником замещений в каркасной области, называется "донорным". Наличие константных областей не обязательно, но если они присутствуют, они, как правило, в значительной степени идентичны константным областям мышинного антитела, т.е. идентичны по меньшей мере на 85-90%, предпочтительно приблизительно на 95%. В связи с этим в некоторых вариантах реализации изобретения, полноразмерный человеческий муринизированный иммуноглобулин, содержащий тяжелую или легкую цепь, содержит мышиную константную область, человеческие CDR области и в значительной мере человеческую каркасную область, в которой имеется некоторое количество "муринизированных" аминокислотных замен. Обычно "муринизированное антитело" является антителом, содержащим муринизированную вариабельную легкую цепь и/или муринизированную вариабельную тяжелую цепь. Например, понятие муринизированного антитела не включает обычное химерное антитело потому, что полная вариабельная область химерного антитела является немышиной. Модифицированное антитело, которое было "муринизировано" с помощью процесса "муринизации", связывается с тем же самым антигеном, что и родительское антитело, которое является источником CDR областей и, как правило, является менее иммуногенным в мышинном организме по сравнению с родительским антителом.

Употребляемый в данном тексте термин "сконструированное антитело" обозначает антитело, в котором вариабельный домен в легкой или тяжелой цепи либо в обоих изменен путем, по меньшей мере, частичного замещения одной или более CDR областей антитела с известной специфичностью и при необходимости путем частичного замещения каркасной области и замены последовательностей.

Хотя CDR-области могут быть получены из антитела того же класса или даже подкласса, что и антитело, из которого получены каркасные области, предусматривается и то, что CDR области могут быть получены из антитела отличного класса и предпочтительно из антитела, принадлежащего отличному виду. Сконструированное антитело, в котором одна или более "донорных" CDR областей, полученных из антитела нечеловеческого происхождения с известной специфичностью, вставлены в человеческую каркасную область, содержащую тяжелую или легкую цепь, называется в данном тексте "гуманизированным антителом". Замещение всех CDR-областей полными CDR-областями из донорного вариабельного домена для того, чтобы перенести антигенсвязывающую способность от одного вариабельного домена на другой, может быть необязательным. Скорее необходимым является перенос только тех остатков, которые необходимы для сохранения активности целевого связывающего участка.

Употребляемые в данном тексте термины "человеческие" или "полностью человеческие" антитела

включают те антитела, которые содержат аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и включают антитела, выделенные из библиотек человеческого иммуноглобулина или из животных, трансгенных в отношении одного или более человеческих иммуноглобулинов, и не экспрессирующие эндогенные иммуноглобулины, как описано ниже и, например, Kucherlapati et al. в патенте США № 5939598. "Человеческие" или "полностью человеческие" антитела также включают те антитела, которые содержат по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи или, по меньшей мере, переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, в которых переменный домен(ы) содержит аминокислотную последовательность переменного домена(ов) человеческого иммуноглобулина.

"Человеческие" или "полностью человеческие" антитела также включают описанные в данном тексте "человеческие" или "полностью человеческие" антитела, которые содержат, в значительной степени состоят из или состоят из вариантов (включая производные) описанных в данном тексте молекул антител (например, VH областей и/или VL областей), при этом антитела или их фрагменты иммуноспецифически связываются с полипептидом α -синуклеина либо его фрагментом или вариантом. Для того чтобы внести мутации в нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческое антитело к α -синуклеину, можно применить стандартные технологии, известные специалистам в данной области техники, и включающие, но не ограничивающиеся этим, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, которые приводят к аминокислотным заменам. Предпочтительно варианты (включая производные) кодируют менее 50 аминокислотных замен, менее 40 аминокислотных замен, менее 30 аминокислотных замен, менее 25 аминокислотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 аминокислотных замен, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен или менее 2 аминокислотных замен, родственных контрольной VH области, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VL области, VLCDR1, VLCDR2 или VLCDR3.

В одном аспекте реализации антитела, являющегося предметом данного изобретения, является человеческим моноклональным антителом, выделенным из человеческого организма. В некоторых случаях каркасная область человеческого антитела выровнена и выбрана в соответствии с находящимися в базе данных последовательностями переменной области подходящей человеческой зародышевой линии; смотрите, например, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), принадлежащую MRC Centre for Protein Engineering (Кембридж, Великобритания). Например, аминокислоты, которые, как считается, потенциально могут отклоняться от последовательности чистой зародышевой линии, могут быть включены во время процесса клонирования с помощью ПЦР праймерной последовательности. По сравнению с искусственно полученными антителами, которые подобны человеческим, такими как одноцепочечные фрагменты антител (scFvs) из библиотеки идентифицированных фаговых антител или полученные от ксеногенных мышей, человеческие моноклональные антитела, являющиеся предметом данного изобретения, характеризуются тем, что (i) были получены с помощью человеческого иммунного ответа, а не являются имитаторами животного происхождения, т.е. антитело было образовано в ответ на естественный α -синуклеин, находящийся в своей обычной конформации в теле человека, (ii) защищают человека или по меньшей мере являются существенными для присутствия α -синуклеина, и (iii) по причине человеческого происхождения антитела риск перекрестной реактивности в отношении аутоантигенов сводится к минимуму. Таким образом, в соответствии с данным изобретением термины "человеческое моноклональное антитело", "человеческое моноклональное аутоантитело", "человеческое антитело" и им подобные употребляются для обозначения молекулы, связывающей α -синуклеин, которая имеет человеческое происхождение, т.е. которая была выделена из человеческой клетки, такой как В-клетка или ее гибридома, или кДНК которой была клонирована непосредственно из мРНК человеческой клетки, например человеческой В-клетки памяти. Человеческое антитело остается "человеческим" даже в случае, когда в антителе проведены аминокислотные замены, например для улучшения связывающих характеристик.

Антитела, полученные из библиотек человеческого иммуноглобулина или от животных, трансгенных в отношении одного или более человеческих иммуноглобулинов, и не экспрессирующие эндогенные иммуноглобулины, как описано ниже и, например, Kucherlapati et al. в патенте США № 5939598, называются антителами, подобными человеческим, с целью отличать их от истинно человеческих антител, которые являются предметом настоящего изобретения.

Употребляемый в данном тексте термин "образец" обозначает любой биологический материал, полученный от испытуемого или пациента. В одном аспекте реализации настоящего изобретения образец может содержать кровь, цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) или мочу. В других аспектах реализации образец может содержать цельную кровь, плазму, В-клетки, обогащенные из образцов крови, и культивированные клетки (например, В-клетки, полученные от пациента). Образец также может содержать биопсийный или тканевый образец, включая нервную ткань. В других аспектах реализации образец может содержать цельные клетки и/или лизат клеток. Образцы крови берут, используя известные в данной области техники способы. В одном аспекте реализации таблетка может быть переработана с помощью интенсивного перемешивания при 4°C в 200 мкл буфере (20 mM Трис, pH. 7,5, 0,5% Нонидет, 1 mM ЭДТК, 1 mM ФМСФ, 0,1M NaCl, ингибитор протеазы IX Sigma и 1 и 2 ингибиторы фосфатазы IX Sigma). Суспензию можно держать на льду на протяжении 20 мин, периодически интенсивно перемешивая. По-

сле центрифугирования при 15,000×g на протяжении 5 мин приблизительно при 4°C аликвоты надосадочной жидкости можно хранить приблизительно при -70°C.

Употребляемые в данном тексте термины "лечить" или "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам в случае, когда требуется предупредить или приостановить (уменьшить) нежелательные физиологические изменения, инфекцию или расстройство у пациента. Полезные или желательные клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, частичное снятие симптомов, снижение степени заболевания, стабилизацию (т.е. неухудшение) болезненного состояния, устранение или снижение количества возбудителей инфекции в организме пациента, приостановку или замедление прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (как частичную, так и полную), как выявляемые, так и невыявляемые. "Лечение" также может обозначать продление времени жизни по сравнению с прогнозируемым временем жизни в отсутствии лечения. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже инфицирован, имеет заболевание или расстройство, а также тех, кто предрасположен к заболеванию или расстройству, или тех, у кого следует предупредить заболевание или расстройство.

Под "испытуемым пациентом", или "человеком", или "животным", или "пациентом", или "млекопитающим" подразумевается любая подопытная особь, в частности особь млекопитающего, для которой существует потребность в диагностике, прогнозировании либо лечении. Особи млекопитающих включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных и животных из зоопарков, охотничьих животных или домашних питомцев, таких как собаки, кошки, гвинейские свиньи, кролики, крысы, мыши, лошади, рогатый скот, коровы, медведи и т.д.

II. Описание целевого полипептида.

Употребляемые в данном тексте термины " α -синуклеин", "альфа-синуклеин", " α -синуклеин" и "аСин" используются взаимозаменяемо для специального обозначения нативной мономерной формы α -синуклеина. Также термин " α -синуклеин" употребляется для общего определения других конформеров α -синуклеина, например, α -синуклеина, связанного с дофамин-хиноном (ДАХ) и олигомеров или агрегатов α -синуклеина. Также термин " α -синуклеин" употребляется для общего обозначения всех типов и форм α -синуклеина. Белковая последовательность человеческого α -синуклеина следующая:

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHG

VATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKN

EEGARQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA (SEQ ID NO: 1).

Аминокислотную последовательность α -синуклеина можно найти в литературе и соответствующих базах данных; см., например, Ueda et al., PNAS 90: 1282-11286 (1993); GenBank swissprot: locus SYUA_HUMAN, номер доступа P37840. Изначально α -синуклеин был идентифицирован в головном мозге человека как белок-предшественник не- β -амилоидного компонента (НАК) бляшек болезни Альцгеймера (БА); смотрите, например, Ueda et al., *ibid*, α -синуклеин является белком, состоящим из 140 аминокислот, и существует в своей нативной форме в виде случайной спирали. В то же время изменения уровня pH, молекулярной концентрации, содержания тяжелых металлов и уровней дофамина оказывают влияние на конформацию белка. Считается, что изменения в конформации до олигомерной, протофибриллярной, фибриллярной и агрегированной форм регулируют токсичность белка. Появляется все больше свидетельств того, что дофамин-приведенный α -синуклеин имеет более короткий период образования фибрилл, чем неприведенный белок. Более того, на фоне повышенной экспрессии α -синуклеина дофамин является токсичным.

НАК - высокогидрофобный домен в составе α -синуклеина - является белком, содержащим по меньшей мере 28 аминокислотных остатков (остатки 60-87) и, в некоторых случаях, 35 аминокислотных остатков (остатки 61-95). НАК проявляет тенденцию к образованию бета-складчатой структуры (Iwai et al., *Biochemistry*, 34: 10139-10145 (1995)). Аминокислотные последовательности НАК описаны в Jensen et al., *Biochem. J.* 310: 91-94 (1995); номер доступа GenBank S56746 и Ueda et al., *ibid*.

Дезагрегированный α -синуклеин или его фрагменты, включая НАК, представляют собой мономерные пептидные единицы. Дезагрегированный α -синуклеин или его фрагменты, как правило, растворимы и способны к самоагрегации до образования устойчивых олигомеров. Олигомеры α -синуклеина и его фрагментов обычно растворимы и существуют преимущественно в виде α -спиралей. Мономерный α -синуклеин можно приготовить *in vitro* путем растворения лиофилизированного пептида в чистом ДМСО с обработкой ультразвуком. Полученный раствор центрифугируют для того, чтобы удалить любые нерастворимые частицы. Агрегированный α -синуклеин или его фрагменты, включая НАК, представляют собой олигомеры α -синуклеина или его фрагментов, которые ассоциировали в нерастворимые β -складчатые объединения. Агрегированный α -синуклеин или его фрагменты, включая НАК, также представляют собой фибриллярные полимеры. Фибриллы обычно нерастворимы. Некоторые антитела связывают как растворимый α -синуклеин или его фрагменты, так и агрегированный α -синуклеин или его фрагменты. Некоторые антитела связываются с олигомерами α -синуклеина сильнее, чем с мономерными

формами или фибриллярными формами. Некоторые антитела связывают как растворимый, так и агрегированный α -синуклеин или его фрагменты, а в некоторых случаях и олигомерные формы.

III. Антитела к α -синуклеину.

Антитела, которые связывают α -синуклеин, были описаны в данной области техники. Смотрите, например, интернациональную публикацию патента WO 2010/069603, которая в полном объеме включена в данный текст посредством ссылки.

Описанные в данном тексте человеческие антитела к α -синуклеину специфически связываются с α -синуклеином и его эпитопами, а также различными конформациями α -синуклеина и их эпитопами. Например, в данном тексте описаны антитела, которые специфически связывают α -синуклеин, α -синуклеин в его нативной мономерной форме, полноразмерный и процессированный α -синуклеин и агрегаты α -синуклеина. Например, как описано в данном тексте, антитело 12F4 связывается с полноразмерным α -синуклеином и с процессированным α -синуклеином, содержащим аминокислоты (ак) 1-60 в, как показали результаты прямого ИФА, эпитопе 12F4 в пределах N-концевой амфипатической повторяющейся области альфа синуклеина. (смотрите WO 2010/069603).

Упоминание в данном тексте антитела, которое "специфически связывает", "избирательно связывает" или "предпочтительно связывает" α -синуклеин относится к антителу, которое не связывает другие неродственные белки. В одном примере описанное в данном тексте антитело к α -синуклеину может связывать α -синуклеин или его эпитоп, но не проявляет связывания в отношении других белков при фоновом значении, высшем приблизительно в 1,5 раз. Антителом, которое "специфически связывает" или "избирательно связывает" конформер α -синуклеина, называется антитело, которое не связывает все существующие конформации α -синуклеина, т.е. не связывает по меньшей мере один конформер α -синуклеина. Например, в данном тексте описаны антитела, которые способны различать мономерные и агрегированные формы α -синуклеина, человеческий и мышинный α -синуклеин; полноразмерный α -синуклеин и процессированные формы, а также отличать человеческий α -синуклеин от β - и γ -синуклеина. Так как человеческие антитела к α -синуклеину, являющиеся предметом данного изобретения, были выделены из пула пациентов преклонного возраста без признаков паркинсонизма и проявляющих α -синуклеин-специфический иммунный ответ, описанные в данном тексте антитела к α -синуклеину также можно называть "человеческими аутоантителами" с целью акцентировать внимание на том, что эти антитела действительно были экспрессированы пациентами и не были выделены из, например, библиотеки фагов, экспрессирующих человеческий иммуноглобулин, что до настоящего времени представляло один из обычных способов получения антител, подобных человеческим.

В широком смысле изобретение относится к методу диагностики повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента, включающему введение антитела, которое специфически связывается с α -синуклеином, или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного. Антитела к α -синуклеину могут применяться в предложенных в данном тексте способах. Антитела, которые могут применяться, включают, но не ограничиваются этим, рекомбинантные человеческие антитела к α -синуклеину NI-202.3G12, 12F4 или NI-202.3D8, а также их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, которые в полном объеме описаны в международной публикации патента WO 2010/069603.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к α -синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применяемое в предложенных в данном тексте способах, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80%, около 85, около 88, около 89, около 90, около 91, около 92, около 93, около 94 или около 95% идентична аминокислотной последовательности молекулы контрольного антитела к α -синуклеину, например той, которая описана в данном тексте. В дополнительном варианте реализации связывающая молекула обладает по меньшей мере около 96%, около 97, около 98, около 99 или 100% идентичностью последовательности с контрольным антителом. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с тем же самым эпитопом α -синуклеина, что и контрольное антитело, и содержит вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (VL), причем VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90 95 или 100% идентичную SEQ ID NO: 2, а VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95 или 100% идентичную SEQ ID NO: 3, как показано в табл. 2.

Дополнительно описывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применяемое в предложенных в данном тексте способах, которое специфически связывается с тем же самым эпитопом α -синуклеина, что и контрольное антитело, содержащее VH и VL, причем VH содержит аминокислотную последовательность, идентичную или идентичную за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти или более аминокислотных замен SEQ ID NO: 2, а VL содержит аминокислотную последовательность, идентичную или идентичную за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти или более аминокислотных замен SEQ ID NO: 3, как показано в табл. 2.

Некоторые варианты реализации изобретения включают антитело к α -синуклеину или его антиген-

связывающий фрагмент, вариант или производное, применяемое в предложенных в данном тексте способах, содержащее VH, причем одна или более из VHCDR1, VHCDR2 или VHCDR3 областей являются по меньшей мере на 80, 85, 90, 95 или 100% идентичными одной или более контрольным аминокислотным последовательностям VHCDR1, VHCDR2 и/или VHCDR3 областей тяжелой цепи, соответствующих одной или более последовательностям из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, как показано в табл. 3.

Дополнительно описывается антитело к α -синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применяемые в предложенных в данном тексте способах, содержащие VH, причем одна или более из VHCDR1, VHCDR2 или VHCDR3 областей VH являются идентичными или идентичными за исключением четырех, трех, двух или одной аминокислотной замены одной или более контрольным аминокислотным последовательностям VHCDR1, VHCDR2 или VHCDR3 областей тяжелой цепи, соответствующих одной или более последовательностям из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, как показано в табл. 3.

Также описывается антитело к α -синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применяемое в предложенных в данном тексте способах, содержащее VL, причем одна или более из VLCDR1, VLCDR2 или VLCDR3 областей являются по меньшей мере на 80, 85, 90, 95 или 100% идентичными одной или более контрольным аминокислотным последовательностям VLCDR1, VLCDR2 или VLCDR3 областей легкой цепи, соответствующих одной или более последовательностям из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, как показано в табл. 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения описывается антитело к α -синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применяемое в предложенных в данном тексте способах, содержащее VL, причем одна или более из VLCDR1, VLCDR2 или VLCDR3 областей VL являются идентичными или идентичными за исключением четырех, трех, двух или одной аминокислотной замены одной или более контрольным аминокислотным последовательностям VLCDR1, VLCDR2 или VLCDR3 областей легкой цепи, соответствующих одной или более последовательностям из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, как показано в табл. 3.

В других вариантах реализации изобретения антитело к α -синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, применяемые в предложенных в данном тексте способах, преимущественно содержат или содержат VH и VL аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95 или 100% идентичные последовательностям SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 3, как показано в табл. 2.

Таблица 2. Контрольные VH и VL аминокислотные последовательности*

VH	VL
EVQLVQSGGGLVEPGGSLRLSCAVSGFDFEK <u>AWMSWVRQAPGQGLQWVARIKSTADGGT</u> <u>TSYAAPVEGRFIISRDDSRNMLYLQMNLSLKT</u> EDTAVYYCTSAHWGQGLVTVSS	QSVLTQPPSVSVSPGQTARITCSGEAL <u>PMQFAHWYQQRPGKAPVIVVYKDSE</u> <u>RPSGVPERFSGSSSGTTATLTITGVQA</u> EDEADYYCQSPDSTNTYEVFGGGTK LTVL
SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3

* VH и VL CDR1, CDR2 и CDR3 аминокислотные последовательности подчеркнуты

Таблица 3. Контрольные VH и VL CDR1, CDR2 и CDR3 аминокислотные последовательности

VHCDR1	VHCDR2	VHCDR3	VLCDR1	VLCDR2	VLCDR3
KAWMS SEQ ID NO: 4	RIKSTADGGTTS YAAPVEG SEQ ID NO: 5	AH SEQ ID NO: 6	SGEALPMQF AH SEQ ID NO: 7	KDSERPS SEQ ID NO: 8	QSPDSTNTYEV SEQ ID NO: 9

Также для применения в описанных в данном тексте способах включены полипептиды, кодирующие описанные в данном тексте антитела α -синуклеину или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, полинуклеотиды, кодирующие такие пептиды, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, и клетки-хозяева, содержащие такие векторы или полинуклеотиды, которые имеют отношение к образованию антител к α -синуклеину или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных для применения в описанных в данном тексте способах.

Подходящие биологически активные варианты описанных в данном тексте антител α -синуклеину можно применять в способах настоящего изобретения. Такие варианты будут сохранять необходимые связывающие свойства родительского антитела α -синуклеину. Способы получения вариантов антител являются общедоступными в данной области техники.

Способы мутагенеза и внесения изменений в нуклеотидные последовательности хорошо известны в данной области техники. См., например, включенные в данный текст посредством ссылок Walker and Gastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985); Kunkel et al, Methods Enzymol. 154:367-382 (1987); Sambrook

et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); патент США № 4873192; а также перечисленные в них ссылки. Руководство по внесению целесообразных аминокислотных замен, которые не оказывают влияния на биологическую активность представляющего интерес полипептида можно найти в модели Дэйхофф и др. в Атласе белковых последовательностей и структур (*Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)), с. 345-352 (1978), который в полном объеме включен в данный текст посредством ссылки. В модели Дэйхофф и др. для определения подходящих аминокислотных замен используется матрица аминокислотного сходства PAM (от англ. Point Accepted Mutation - эволюционное расстояние, при котором произошла одна замена на определенное количество остатков) (матрица PAM 250). Предпочтительными могут являться такие консервативные замены, как замена одной аминокислоты другой, имеющей аналогичные свойства. Примеры консервативных аминокислотных замен с использованием матрицы PAM 250 модели Дэйхофф и др. включают, но не ограничиваются этим, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln, and Phe↔Trp↔Tyr.

Способы определения специфичности связывания антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного включают, но не ограничиваются этим, стандартные методы анализа конкурентного связывания, методы анализа для мониторинга секреции иммуноглобулина Т-клетками или В-клетками, методы анализа пролиферации Т-клеток, методы анализа апоптоза, методы ИФА и тому подобные. См., например, методы анализа, описанные в WO 93/14125; Shi et al, *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh et al., *J Immunol* 169:1175-1181 (2002); Watanabe et al., *J Immunol* 167:4321-4328 (2001); Wang et al., *Blood* 97:3498-3504 (2001); и Giraudon et al., *J Immunol* 172(2):1246-1255 (2004), которые все включены в данный текст посредством ссылок.

Когда при обсуждении в данном тексте говорится, что какой-либо конкретный полипептид, включая константные области, CDR области, VH домены или VL домены, которые описаны в данном тексте, является по меньшей мере на около 65%, около 70, около 75, около 80, около 85, около 90, около 91, около 92, около 93, около 94, около 95, около 96, около 97, около 98, около 99 или даже около 100% идентичным другому полипептиду, процент идентичности можно определить, используя известные в данной области техники методы и компьютерные программы/компьютерное обеспечение, такие как программа BESTFIT (*Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711*). В BESTFIT для того, чтобы найти лучший сегмент гомологичности между двумя последовательностями, применяется алгоритм локальной гомологичности, разработанный Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489. При использовании BESTFIT или любой другой программы для выравнивания последовательностей для того, чтобы определить, является ли данная последовательность, например, на 95% идентичной контрольной последовательности согласно настоящему изобретению, параметры выбираются таким образом, что процент идентичности рассчитывается относительно полной длины контрольного полипептида, а расхождения в гомологичности до 5% от полного количества аминокислот в контрольной последовательности являются разрешенными.

В рамках данного изобретения процент идентичности последовательностей может быть определен с помощью алгоритма поиска гомологичности Смита-Уотермана с использованием поиска аффинного гэпа, со штрафом за открытие гэпа в 12 и штрафом за продолжение гэпа в 2, и матрицей BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологичности Смита-Уотермана описан в Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489. Например, вариант может отличаться от контрольного антитела к α -синуклеину только лишь на 1-15 аминокислотных остатков, только лишь на 1-10 аминокислотных остатков, например на 6-10, только лишь на 5, только лишь на 4, 3, 2 или даже 1 аминокислотный остаток. "Консервативная аминокислотная замена" - это такая замена, при которой аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь с таким же самым зарядом. Семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи с одинаковыми зарядами, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В альтернативном варианте мутации могут быть внесены случайным образом по всей длине или части кодирующей последовательности, например путем насыщающего мутагенеза, а полученные мутанты могут быть исследованы на предмет биологической активности для того, чтобы идентифицировать тех мутантов, которые сохранили активность (например, способность связывать полипептид α -синуклеина).

Например, можно внести мутации только в каркасных областях или только в CDR областях молекулы антитела. Внесенные мутации могут являться молчащими или нейтральными миссенс-мутациями, т.е. не оказывать влияния либо оказывать небольшое влияние на способность антитела связывать антиген. Эти типы мутаций могут быть полезными для оптимизации частоты использования кодона или улучшения образования антител гибридами. И наоборот, миссенс-мутации, не являющиеся ней-

тральными, могут изменить способность антитела связывать антиген. Специалист в данной области техники сможет получить и протестировать мутантные молекулы с необходимыми свойствами, такими как отсутствие изменения активности связывания антигена или изменение активности связывания (например, улучшение активности связывания антигена или изменение специфичности антитела). После мутагенеза кодируемый белок может экспрессироваться естественным образом, а функциональная и/или биологическая активность кодируемого белка (например, способность иммуноспецифически связывать по меньшей мере один эпитоп полипептида α -синуклеина) может быть определена с помощью описанных в данном тексте способов или путем стандартных способов модификаций, известных в данной области техники.

IV. Способы диагностики и отслеживания, в которых применяются антитела к α -синуклеину.

Настоящее изобретение относится к применению связывающей молекулы α -синуклеина, например антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, для диагностики повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента (например, для определения риска развития у пациента синуклеопатического заболевания) или для мониторинга развития синуклеопатического заболевания или ответа на лечение синуклеопатического заболевания у испытуемого пациента.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном тексте способы относятся к применению описанных в данном тексте антител к α -синуклеину, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, для диагностики повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента путем (а) анализа уровня α -синуклеина в образце плазмы крови или ЦСЖ, взятом у испытуемого пациента через определенный временной интервал после периферического введения испытуемому пациенту антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело к α -синуклеину или его фрагмент может связывать α -синуклеин с аффинностью, достаточной для того, чтобы изменить общий отток α -синуклеина из головного мозга в кровь или из головного мозга в ЦСЖ; (б) сравнения полученного уровня α -синуклеина у испытуемого пациента с контрольным показателем; причем разница или сходство между уровнем α -синуклеина в образце плазмы или образце ЦСЖ и контрольным показателем коррелирует с уровнем α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента.

В других вариантах реализации изобретения описанные в данном тексте способы относятся к применению описанных в данном тексте антител к α -синуклеину, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, для диагностики повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента путем (а) анализа уровня α -синуклеина в образце плазмы крови или ЦСЖ, взятом у испытуемого пациента через определенный временной интервал после периферического введения испытуемому пациенту антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело к α -синуклеину или его фрагмент стабилизирует или блокирует α -синуклеин в крови или ЦСЖ; (б) сравнения полученного уровня α -синуклеина у испытуемого пациента с контрольным показателем; причем разница или сходство между уровнем α -синуклеина в образце плазмы или образце ЦСЖ и контрольным показателем коррелирует с уровнем α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном тексте способы относятся к применению описанных в данном тексте антител к α -синуклеину, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, для диагностики повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента путем (а) обеспечения наличия антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело или его фрагмент может связывать α -синуклеин с аффинностью, достаточной для того, чтобы изменить общий отток α -синуклеина из головного мозга в кровь или из головного мозга в ЦСЖ; (б) распоряжения о том, чтобы поставщик медицинских услуг осуществил периферическое введение испытуемому пациенту антитела и взял образец плазмы крови или образец ЦСЖ у пациента через определенный временной интервал после введения; (в) анализа уровня α -синуклеина в образце плазмы крови или образце ЦСЖ; (г) сравнения полученного уровня α -синуклеина у испытуемого пациента с контрольным показателем; причем разница или сходство между уровнем α -синуклеина в образце плазмы или образце ЦСЖ и контрольным показателем коррелирует с уровнем α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента.

В других вариантах реализации изобретения описанные в данном тексте способы относятся к применению описанных в данном тексте антител к α -синуклеину, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, для диагностики повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента путем (а) обеспечения наличия антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело или его фрагмент стабилизирует или блокирует α -синуклеин в крови или ЦСЖ; (б) распоряжения о том, чтобы поставщик медицинских услуг осуществил периферическое введение испытуемому пациенту антитела и взял образец плазмы крови или образец ЦСЖ у пациента через определенный временной интервал после введения; (в) анализа уровня α -синуклеина в образце плазмы крови или образце ЦСЖ; (г) сравнения полученного уровня α -синуклеина у испытуемого пациента с контрольным показателем; причем разница или сходство между уровнем α -синуклеина в образце

плазмы или образце ЦСЖ и контрольным показателем коррелирует с уровнем α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента.

Для применения способов и объектов данного изобретения образцы, которые берут у пациента, могут быть получены до или после введения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента. Образцы могут, например, быть запрошены поставщиком медицинских услуг (например, врачом) или поставщиком услуг медицинского обеспечения, взяты и/или обработаны тем же самым или другим поставщиком медицинских услуг (например, медбратом, больницей) или клинической лабораторией, а после обработки результаты могут быть направлены другому поставщику медицинских услуг, поставщику услуг медицинского обеспечения или пациенту. Аналогично анализ уровня α -синуклеина в образце, сравнение полученного уровня α -синуклеина у испытуемого пациента с контрольным показателем, оценка результатов могут быть осуществлены одним или более поставщиками медицинских услуг, поставщиками услуг медицинского обеспечения и/или клиническими лабораториями.

Употребляемый в данном тексте термин "поставщик медицинских услуг" относится к физическим лицам или учреждениям, которые напрямую взаимодействуют и оказывают помощь живым существам, например людям. Неограничивающие примеры поставщиков медицинских услуг включают врачей, медсестер, техников, терапевтов, фармацевтов, консультантов, практикующих нетрадиционную медицину специалистов, медицинские учреждения, врачебные кабинеты, больницы, пункты первой медицинской помощи, клиники, травмопункты, клиники/учреждения нетрадиционной медицины и любые другие субъекты, обеспечивающие общее и/или специализированное лечение, обследование, уход, терапию, назначение лекарственного средства и/или консультацию в отношении общего или частичного состояния здоровья пациента, включая, но не ограничиваясь этим, общее медицинское, специализированное медицинское и/или лечение любого другого типа, обследование, уход, терапию, назначение лекарственного средства и/или консультацию.

Употребляемый в данном тексте термин "клиническая лаборатория" относится к медицинскому учреждению для исследования или обработки материалов, полученных от живого существа, например человека. Неограничивающие примеры обработки включают биологическое, биохимическое, серологическое, химическое, иммуногематологическое, гематологическое, биофизическое, цитологическое, патологическое, генетическое либо другое исследование материалов, полученных из человеческого тела с целью получения информации, например для диагностики, предотвращения или лечения любого заболевания или расстройства, или обследования здоровья живых существ, например людей. Эти исследования также могут включать процедуры забора или другого способа получения образца, приготовления, определения, измерения или другого способа описания присутствия либо отсутствия различных веществ в теле живого существа, например человека, или образце, полученном из тела живого существа, например человека. В некоторых аспектах реализации изобретения клиническая лаборатория может быть "централизованной" или "местной", что означает, что все исследования образцов, поступивших со всех внешних источников, проводит небольшое количество лабораторий или одна лаборатория. В других аспектах реализации изобретения клинические лаборатории, имеющие много отделений и называемые также "спутниковыми" или "глобальными" лабораториями, способны обеспечить получение нормальных достоверных результатов, для которых легко можно провести сравнение.

Употребляемый в данном тексте термин "поставщик услуг медицинского обеспечения" включает отдельные физические лица, организации или группы, обеспечивающие, представляющие, предлагающие, оплачивающие полностью либо частично или в другой способ обеспечивающие доступ пациента к одному или более видам медицинского обеспечения, льготным планам, медицинскому страхованию и/или программам оплаты расходов на лечение.

В некоторых аспектах реализации изобретения поставщик медицинских услуг может осуществлять введение или давать указание другому поставщику медицинских услуг осуществить введение антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента. Поставщик медицинских услуг может выполнять или давать указание другому поставщику медицинских услуг или пациенту выполнять следующие действия: брать образец, обрабатывать образец, подавать образец, получать образец, передавать образец, анализировать или исследовать образец, количественно определять образец, предоставлять результаты, полученные после анализа/исследования/количественного определения образца, получать результаты, полученные после анализа/исследования/количественного определения образца, сравнивать/оценивать результаты, полученные после анализа/исследования/количественного определения одного или более образцов, предоставлять сравнение/оценку одного или более образцов, получать сравнение/оценку одного или более образцов, осуществлять лечение или введение лекарственного препарата (например, антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента), начинать лечение, прекращать лечение, временно прерывать лечение, увеличивать количество применяемого лекарственного препарата, уменьшать количество применяемого лекарственного препарата, увеличивать частоту применения лекарственного препарата, уменьшать частоту применения лекарственного препарата, соблюдать одинаковую частоту приема лекарственного препарата, заменять лечение или лекарственный препарат, по меньшей мере, другим способом лечения или добавочным лекарственным препаратом.

В некоторых аспектах реализации изобретения поставщик услуг медицинского обеспечения может разрешать или запрещать, например, взятие образца, обработку образца, подачу образца, получение образца, передачу образца, анализ или исследование образца, количественное определение образца, предоставление результатов, полученных после анализа/исследования/количественного определения образца, передачу результатов, полученных после анализа/исследования/количественного определения образца, сравнение/оценку результатов, полученных после анализа/исследования/количественного определения одного или более образцов, передачу сравнения/оценки одного или более образцов, осуществление лечения или введения лекарственного препарата, начало лечения или введения лекарственного препарата, прекращение лечения или введения лекарственного препарата, продолжение лечения или введения лекарственного препарата, временное прерывание лечения или введения лекарственного препарата, увеличение количества применяемого лекарственного препарата, уменьшение количества применяемого лекарственного препарата, продолжение применения определенного количества лекарственного препарата, увеличение частоты применения лекарственного препарата, уменьшение частоты применения лекарственного препарата, соблюдение одинаковой частоты приема лекарственного препарата, замену лечения или лекарственного препарата, по меньшей мере, другим способом лечения или добавочным лекарственным препаратом.

Дополнительно поставщики услуг медицинского обеспечения могут, например, разрешать или запрещать предписание лечения, разрешать или запрещать использование страховки на лечение, разрешать или запрещать покрытие расходов на лечение, определять либо опровергать приемлемость лечения.

В некоторых аспектах реализации изобретения клиническая лаборатория может, например, брать или получать образец, обрабатывать образец, подавать образец, получать образец, передавать образец, анализировать или исследовать образец, количественно определять образец, предоставлять результаты, полученные после анализа/исследования/количественного определения образца, получать результаты, полученные после анализа/исследования/количественного определения образца, сравнивать/оценивать результаты, полученные после анализа/исследования/количественного определения одного или более образцов, предоставлять сравнение/оценку одного или более образцов, получать сравнение/оценку одного или более образцов.

Вышеперечисленные действия могут быть выполнены поставщиком медицинских услуг, поставщиком услуг медицинского обеспечения или пациентом автоматически, с помощью компьютера (например, с помощью веб-сервиса или автономной компьютерной системы).

Употребляемый в данном тексте термин "отдавать распоряжение поставщику медицинских услуг" включает устное распоряжение, отдаваемое поставщику медицинских услуг, или письменное распоряжение, отдаваемое поставщику медицинских услуг, или и то и другое.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном тексте способы относятся к применению описанных в данном тексте антител к α -синуклеину, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, для диагностики повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента путем (а) периферического введения испытуемому пациенту антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело или его фрагмент может связывать α -синуклеин с аффинностью, достаточной для того, чтобы изменить общий отток α -синуклеина из головного мозга в кровь или из головного мозга в ЦСЖ; (б) получения образца плазмы крови или образца ЦСЖ испытуемого пациента через определенный временной интервал после введения и передачу образца плазмы крови или образца ЦСЖ для определения уровня α -синуклеина; (в) сравнения уровня α -синуклеина в образце плазмы крови с контрольным показателем; причем разница или сходство между уровнем α -синуклеина в образце плазмы или образце ЦСЖ и контрольным показателем коррелирует с уровнем α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента.

В других вариантах реализации изобретения описанные в данном тексте способы относятся к применению описанных в данном тексте антител к α -синуклеину, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, для диагностики повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента путем (а) периферического введения испытуемому пациенту антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело или его фрагмент стабилизирует или блокирует α -синуклеин в крови или ЦСЖ; (б) получения образца плазмы крови или образца ЦСЖ испытуемого пациента через определенный временной интервал после введения и передачу образца плазмы крови или образца ЦСЖ для определения уровня α -синуклеина; (в) сравнения уровня α -синуклеина в образце плазмы крови с контрольным показателем; причем разница или сходство между уровнем α -синуклеина в образце плазмы или образце ЦСЖ и контрольным показателем коррелирует с уровнем α -синуклеина в головном мозге испытуемого пациента. В некоторых вариантах реализации описанные в данном тексте антитела к α -синуклеину, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, могут связывать α -синуклеин с аффинностью, достаточной для того, чтобы изменить общий отток α -синуклеина из головного мозга в кровь или из головного мозга в ЦСЖ и стабилизировать или блокировать α -синуклеин в крови или ЦСЖ.

Диагностируемый испытуемый пациент может являться клинически здоровым или находится в до-клиническом состоянии в отношении заболевания. В отдельных вариантах реализации изобретения испытуемые пациенты включают тех пациентов, которые находятся в предсимптоматическом состоянии или имеют доклиническое синуклеопатическое заболевание.

В отдельных вариантах реализации изобретения "контрольный показатель" в описанных в данном тексте способах содержит уровни α -синуклеина, измеренные у одного или более контрольных пациентов, причем контрольные пациенты включают нормальных здоровых пациентов и пациентов с нуклеопатиями разной степени тяжести. Например, контрольный пациент имеет нуклеопатическое заболевание, например, болезнь Паркинсона (БП), деменцию с тельцами Леви (ДТЛ) или вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (ВБАТЛ), причем сходство между уровнем α -синуклеина и контрольным показателем указывает на то, что диагностируемый пациент имеет синуклеопатическое заболевание. В другом варианте или в качестве дополнения в виде второго контроля контрольный пациент не имеет синуклеопатического заболевания, при этом разница между уровнем α -синуклеина и контрольным показателем указывает на то, что диагностируемый пациент имеет синуклеопатическое заболевание. Предпочтительно, чтобы диагностируемый пациент и контрольный пациент(ы) находились в одной возрастной группе.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном тексте способы дополнительно включают сравнение уровня α -синуклеина в образце плазмы (т.е. тестируемом образце) и образце плазмы (т.е. фоновом образце), полученном от испытуемого пациента до введения антитела к α -синуклеину, включая его антигенсвязывающие фрагменты, варианты и производные. В других вариантах реализации изобретения описанные в данном тексте способы дополнительно включают сравнение уровня α -синуклеина в образце ЦСЖ (т.е. тестируемом образце) и образце ЦСЖ (т.е. фоновом образце), полученном от испытуемого пациента до введения антитела к α -синуклеину, включая его антигенсвязывающие фрагменты, варианты и производные. Например, может быть проведено сравнение с фоновым образцом вместо или в дополнение к сравнению с контрольным показателем. В связи с этим фоновый образец может быть использован для калибровки тестируемых образцов по отношению к контрольному показателю (например, измерение является разницей или отношением, а не абсолютной величиной).

В дополнительном варианте реализации изобретения связывающие α -синуклеин молекулы, в частности описанные в данном тексте антитела к α -синуклеину, также могут применяться в способе диагностики расстройств у пациента путем получения образца биологической жидкости испытуемого пациента, который может являться образцом крови, образцом лимфы, образцом ЦСЖ или любым другим образцом биологической жидкости, и приведения биологической жидкости в контакт с описанным в данном тексте антителом к α -синуклеину в условиях, в которых возможно образование комплексов антитело-антиген. Затем с помощью известных в данной области техники способов определяется уровень таких комплексов, причем уровень, который значительно выше, чем уровень, образуемый в контрольном образце, указывает на наличие заболевания у испытуемого пациента. Таким же образом может использоваться специфическое связывание антигена описанными в данном тексте антителами к α -синуклеину. Таким образом, изобретение относится к *in vitro* иммуноанализу, в котором применяется связывающая α -синуклеин молекула, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, являющиеся объектами данного изобретения.

Уровень α -синуклеина может быть определен любым подходящим способом, известным в данной области техники, включая, например, анализ α -синуклеина с помощью одного или более методов, выбранных из Вестерн-блоттинга, иммунопреципитации, иммуноферментного анализа (ИФА), радиоиммунологического анализа (РИА), сортировки флуоресцентно-активированных клеток (СФАК), двумерного гель-электрофореза, масс-спектропии (МС), матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации времяпролетной МС (МАЛДИ-ВП), усиленной поверхностью лазерной десорбции/ионизации времени пролета (УПЛДИ-ВП), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), жидкостной экспресс-хроматографии белков (ЖЭХБ), многомерной жидкостной хроматографии (ЖХ) с последующей тандемной масс-спектрометрией (ЖХ/МС) и лазерной денситометрии. Предпочтительно указанная *in vivo* визуализация α -синуклеина включает позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭТ), оптическую визуализацию в ближней инфракрасной (БИК) области или магнитно-резонансную визуализацию (МРВ).

Как хорошо известно в области техники медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретный препарат для введения, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья и другие одновременно принимаемые лекарственные препараты. В общем случае дозировки могут находиться в диапазоне, например, от около 0,0001 до 100 мг/кг, и чаще от 0,01 до 5 мг/кг (например, 0,02, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 мг/кг и т.д.) массы тела пациента. Например, дозировки могут составлять 1 мг/кг массы тела, или 10 мг/кг массы тела, или находиться в диапазоне 1-10 мг/кг. Дозировки, составляющие промежуточные значения в вышеупомянутых диапазонах, также входят в объем данного изобретения. Термин "периферическое введение" описан в другом месте данного текста.

В некоторых вариантах реализации могут применяться матрицы на основе антител, которые, к при-

меру, заполнены антителами к α -синуклеину или эквивалентными антигенсвязывающими молекулами, являющимися предметом данного изобретения, которые специфически распознают α -синуклеин. Суть микроматричного иммунологического анализа обобщена в Kusnezow et al., Mol. Cell Proteomics 5:1681-1696 (2006). Соответственно изобретение также относится к микроматрицам, заполненным связывающими α -синуклеин молекулами, определяемыми согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном тексте способы также относятся к применению описанных в данном тексте антител к α -синуклеину, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, для отслеживания уровня α -синуклеина в головном мозге пациента, который проходит лечение от синуклеопатического заболевания, и включают анализ уровня α -синуклеина в плазме крови пациента или ЦСЖ пациента через определенный временной интервал после периферического введения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело или его фрагмент может связывать α -синуклеин с аффинностью, достаточной для того, чтобы изменить общий отток α -синуклеина из головного мозга в кровь или из головного мозга в ЦСЖ; а уровень α -синуклеина в плазме крови пациента или ЦСЖ пациента коррелирует с уровнем в головном мозге пациента. В отдельных вариантах реализации изобретения описанный в данном тексте способ дополнительно включает анализ уровня α -синуклеина в плазме крови пациента или ЦСЖ пациента через определенный временной интервал после дополнительных периферических введений антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, таким образом, и получение, таким образом, графика изменения со временем уровня α -синуклеина в головном мозге пациента.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном тексте способы также относятся к применению описанных в данном тексте антител к α -синуклеину, включая их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, для отслеживания уровня α -синуклеина в головном мозге пациента, который проходит лечение от синуклеопатического заболевания, и включают анализ уровня α -синуклеина в плазме крови пациента или ЦСЖ пациента через определенный временной интервал после периферического введения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, причем антитело или его фрагмент стабилизирует или блокирует α -синуклеин в крови или ЦСЖ; а уровень α -синуклеина в плазме крови пациента или ЦСЖ пациента коррелирует с уровнем в головном мозге пациента. В отдельных вариантах реализации изобретения описанный в данном тексте способ дополнительно включает анализ уровня α -синуклеина в плазме крови пациента или ЦСЖ пациента через определенный временной интервал после дополнительных периферических введений антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, и получение, таким образом, графика изменения со временем уровня α -синуклеина в головном мозге пациента.

Некоторые варианты реализации изобретения включают описанные в данном тексте способы, в которых определенный временной интервал составляет менее чем 12 месяцев, менее чем 11 месяцев, менее чем 10 месяцев, менее чем 9 месяцев, менее чем 8 месяцев, менее чем 7 месяцев, менее чем 6 месяцев, менее чем 5 месяцев, менее чем 4 месяца, менее чем 3 месяца, менее чем 2 месяца, менее чем 1 месяц, менее чем одна неделя либо менее или ровно 24 ч, либо менее или ровно 3 ч.

V. Составы и способы применения.

Способы изготовления и введения антител к α -синуклеину или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных нуждающемуся в этом пациенту хорошо известны или могут быть легко определены специалистом в данной области техники. Способ применения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного может быть пероральным, парентеральным, путем ингаляции или местным. Употребляемый в данном тексте термин "периферическое введение" включает, например, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное применение. Так как все эти формы применения четко рассматриваются как такие, которые входят в объем данного изобретения, примером формы для применения может быть раствор для инъекции, в частности для внутривенной или внутриартериальной инъекции или капельного вливания. Подходящий фармацевтический состав для инъекции может содержать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное соединение (например, полисорбат), в некоторых случаях - стабилизирующее вещество (например, человеческий альбумин) и т.д.

Как описывается в данном тексте, антитела к α -синуклеину или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные могут быть приготовлены в виде лекарственного препарата таким образом, чтобы способствовать применению и обеспечивать стабильность активного вещества. В отдельных вариантах реализации фармацевтические составы согласно настоящему изобретению содержат фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, такой как физиологический раствор, нетоксичные буферы, консерванты и тому подобное. Для возможности быстрого применения фармацевтически эффективное количество антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного должно составлять количество, достаточное для достижения эффективного связывания с целью и для достижения полезного эффекта, например изменения общего оттока α -синуклеина из головного мозга в кровь или изменения общего оттока α -синуклеина из головного мозга в ЦСЖ.

Применяемые в данном изобретении фармацевтические составы содержат фармацевтически приемлемые носители, например ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, неполные глицеридные смеси насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протаминасульфат, двузамещенный фосфорнокислый натрий, фосфорнокислый калий, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, полиакрилаты, воски, полиэтилен-полиоксипропилен блок-полимеры, полиэтиленгликоль и ланолин.

Препараты для периферического 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, например, воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевые и буферные среды. В рамках настоящего изобретения фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются этим, 0,01-0,1 М фосфатный буфер или 0,8% солевой раствор. Другие общеизвестные парентеральные растворители включают раствор фосфата натрия, декстрозы Рингера, декстрозы и хлорида натрия, лактата Рингера и нелетучие масла. Внутривенные растворы включают жидкие и питательные наполнители, наполнители на основе электролитов, например на основе декстрозы Рингера и тому подобные. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные вещества, антиоксиданты, хелатирующие вещества и инертные газы и т.п.

В частности, подходящие для инъекционного применения фармацевтические составы включают стерильные водные растворы (растворимых в воде веществ) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления по индивидуальному рецепту стерильных инъекционных растворов или дисперсий. В таких случаях состав должен быть стерильным и разжиженным до такой степени, чтобы легко проходить через иглу шприца. Он должен быть стабильным в условиях производства и хранения и предпочтительно защищенным от заражающего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может являться растворяющей или дисперсионной средой, например водой, этанолом, полиолом (например, глицеролом, пропиленгликолем и жидким полиэтиленгликолем и тому подобным) и их подходящими смесями. Поддерживать надлежащую текучесть можно, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Составы, подходящие для применения в раскрытых в данном тексте терапевтических способах, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980).

Защита от воздействия микроорганизмов может быть осуществлена с помощью различных антибактериальных и антигрибковых веществ, например парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и подобных. Во многих случаях предпочтительным будет наличие в составе изотонических веществ, например сахаров, полиспиртов, таких как маннитол, сорбитола или хлорида натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных составов может быть осуществлено путем включения в состав вещества, которое замедляет всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

В любом случае стерильные инъекционные растворы могут быть изготовлены путем внесения активного соединения (например, антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, как одного, так и в комбинации с другими активными веществами) в нужном количестве в подходящий растворитель с одним из или комбинацией из перечисленных в тексте ингредиентов, в соответствии с требованиями, с последующей фильтрующей стерилизацией. Как правило, дисперсии изготавливают путем внесения активного соединения в стерильный растворитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для изготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами изготовления являются вакуумная сушка и лиофильная сушка, которые позволяют получить порошок из активного ингредиента плюс любой необходимый дополнительный ингредиент из предварительно отфильтрованного стерильного раствора. Препараты для инъекций изготавливают, помещают в емкости, такие как ампулы, пакеты, бутылки, шприцы или флаконы, и запечатывают в антисептических условиях согласно с известными в данной области техники способами. Также препараты могут запаковываться и продаваться в виде наборов. У таких продуктов могут быть этикетки или листки-вкладыши, указывающие, что соответствующие составы применимы для лечения пациентов, имеющих или предрасположенных к заболеванию или расстройству.

Парентеральные составы могут применяться в виде единичной болюсной дозы, инфузионной или ударной болюсной дозы с последующим введением поддерживающей дозы. Эти составы могут вводиться через конкретные фиксированные или изменяющиеся интервалы, например один раз в день или по мере надобности.

Определенные фармацевтические составы, описанные в данном тексте, могут применяться перорально в приемлемой лекарственной форме, например капсул, таблеток, водных суспензий или раство-

ров. Определенные фармацевтические составы также могут быть изготовлены в виде солевых растворов с содержанием бензилового спирта или других подходящих консервантов, стимуляторов всасывания для повышения биологической усвояемости и/или других общепринятых растворяющих или диспергирующих веществ.

Количество антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, которое нужно соединить с веществами-носителями для получения единичной дозированной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от объекта лечения и от конкретного способа применения. Состав может применяться в виде единичной дозы, множественных доз или вливания через установленный период времени. Схемы приема лекарственного препарата также могут быть скорректированы для того, чтобы обеспечить оптимальный необходимый ответ (например, терапевтический или профилактический ответ).

В реализации настоящего изобретения применяются, если другое не оговорено, общепринятые методы цитобиологии, клеточного культивирования, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, геной инженерии и иммунологии, которые известны в данной области техники. Эти методы полностью описаны в литературе. См., например,

Molecular Cloning

A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook *et al.*, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, ed., Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1992), *DNA Cloning*, D. N. Glover ed., Volumes I and II (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, M. J. Gait ed., (1984), Mullis *et al.* патент США №: 4,683,195; *Nucleic Acid Hybridization*, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); *Transcription And Translation*, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); *Culture Of Animal Cells*, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., (1987); *Immobilized Cells And Enzymes*, IRL Press, (1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology*, Academic Press, Inc., N.Y.; *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, J. H. Miller and M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155 (Wu *et al.* eds.); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology*, Caner and Walker, eds., Academic Press, London (1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV, D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., (1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); и в Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

Основные принципы инженерии антител изложены в *Antibody Engineering*, 2nd edition, C.A.K. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press (1995). Основные принципы белковой инженерии изложены в *Protein Engineering, A Practical Approach*, Rickwood, D., et al, Eds., IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng. (1995). Основные принципы антител и антитело-гаптен связывания изложены в Nisonoff, A., *Molecular Immunology*, 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); and Steward, M.W., *Antibodies, Their Structure and Function*, Chapman and Hall, New York, NY (1984). Дополнительно стандартные методы иммунологии, известные в данной области техники, но отдельно не описанные, применяются в общем случае согласно *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites et al. (eds) , *Basic and Clinical -Immunology* (8th ed.), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) and Mishell and Shiigi (eds), *Selected Methods in Cellular Immunology*, W.H. Freeman and Co., New York (1980).

Стандартные справочные работы, в которых изложены основные принципы иммунологии, включают

Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein, J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination*, John Wiley & Sons, New York (1982); Kennett, R., *et al.*, eds., *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, New York (1980); Campbell, A., "Monoclonal Antibody Technology" in Burden, R., *et al.*, eds., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Elsevier, Amsterdam (1984), *Kuby Immunology* 4th ed. Ed. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt and Barbara A. Osborne, H. Freeman & Co. (2000); Roitt, I., Brostoff, J. and Male D., *Immunology* 6th ed. London: Mosby (2001); Abbas A., Abul, A. and Lichtman, A., *Cellular and Molecular Immunology* Ed. 5, Elsevier Health Sciences Division (2005); Kontermann and Dubel, *Antibody Engineering*, Springer Verlag (2001); Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press (2001); Lewin, *Genes VIII*, Prentice Hall (2003); Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); Dieffenbach and Dveksler, *PCR Primer* Cold Spring Harbor Press (2003).

Примеры

Детальное описание общепринятых способов, таких как те, что применяются в данном изобретении, можно найти в списке литературы. Если другое не указано ниже, идентификация α -синуклеин-специфических В-клеток и молекулярное клонирование антител к α -синуклеину, которые обладают представляющей интерес специфичностью, могут быть осуществлены способами, описанными в примерах и в разделе "Дополнительные способы" международной патентной заявки РСТ/ЕР2008/000053, опубликованной как WO2008/081008, и международной патентной заявки РСТ/ЕР2009/009186, опубликованной как WO2010/069603, содержание которых в полном объеме включено в данный текст посредством ссылок.

Пример 1. Зависящий от дозировки пик α -синуклеина в плазме крови после введения 12F4 трансгенным мышам с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина.

Этот пример описывает определение уровней α -синуклеина в мышинной плазме крови после инъекции 12F4 трансгенным мышам с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина. Трансгенным мышам в возрасте трех с половиной месяцев с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина дикого типа (wt - от англ. "wild-type") (PDGF β -h[wt] α -синуклеин; т.е. D-линия; Masliah *et al.*, *Science*, 287(5456): 1265-9 (2000)) проводили внутрибрюшинную инъекцию единичной дозы, состоящей из 0, 0,3, 1, 3, 10 или 30 мг/кг антитела 12F4. Функциональные рекомбинантные моноклональные антитела 12F4 и химерные 12F4 получали путем котрансфекции экспрессионного вектора тяжелой цепи иммуноглобулина и экспрессионного вектора каппа или лямбда легкой цепи иммуноглобулина в клетки ЯКХ (или клетки любой другой подходящей реципиентной клеточной линии человеческого или мышинного происхождения). После этого рекомбинантное моноклональное антитело очищали от кондиционированной среды с помощью стандартной колоночной очистки белка А, описанной в WO2008/081008. Человеческое рекомбинантное моноклональное антитело может вырабатываться в неограниченных количествах как временно, так и стабильно трансфицированными клетками. Химерное антитело 12F4 содержит праймер-индуцированные мутации в N-концевой части вариабельных областей иммуноглобулина, приведенные к последовательностям зародышевой линии (ЗЛ) человеческих вариабельных тяжелой и легкой цепей (смотрите WO2010/069603), и экспрессируется в виде химерной молекулы, в которой приведенные человеческие вариабельные домены соединены с мышинными константными областями IgG2a.

Трансгенных экспрессирующих α -синуклеин мышей из D-линии содержали в стандартных условиях с повторяемым 12ч:12ч светотемновым циклом и свободным доступом к пище и воде. Группы, проходящие терапию, были сбалансированы относительно возраста и пола. Через 24 ч после инъекции готовили образцы плазмы и определяли концентрации человеческого α -синуклеина в плазме с помощью сэндвич-ИФА (Invitrogen, США). Образцы плазмы разбавляли в соотношении 1:4 и готовили пробу в разбавленном буферном растворе с 1:4 плазмы мышей дикого типа. С помощью данных ИФА проводили контроль результатов на влияние антитела 12F4. Уровни антитела 12F4 в плазме определяли с помощью ИФА Fcg-захвата, используя в качестве пробы рекомбинантное 12F4 известной концентрации. Стандарт готовили в ФСП буфере, содержащем разбавленную плазму мышей дикого типа.

Уровни человеческого α -синуклеина в плазме были существенно повышены после единичной дозы в 1, 3, 10 или 30 мг/кг антитела 12F4 по сравнению с контрольным раствором. Повышение уровня α -

синуклеина в плазме в значительной мере зависит от дозировки (фиг. 1 А-Б). У мышей, которые прошли терапию только контрольным раствором, не наблюдали существенных уровней человеческого α -синуклеина (фиг. 1Б).

Пример 2. Временная зависимость пиковой концентрации человеческого α -синуклеина в плазме и концентрации 12F4 в плазме.

Этот пример описывает временную зависимость изменений уровней человеческого α -синуклеина и уровней антитела 12F4 в плазме трансгенных мышей с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина, определяемую в течение продолжительного периода. Трансгенным мышам в возрасте восьми месяцев с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина A53T (Prp-h[A53T] α -синуклеин) (Giasson et al., *Neuron*, 34: 521-533 (2001)) проводили внутрибрюшинную инъекцию единичной дозы, составляющей 5 мг/кг антитела 12F4, а образцы плазмы брали через временные интервалы, составляющие 0, 1, 24, 72 и 168 ч после инъекции. Уровень человеческого α -синуклеина в плазме определяли количественно с помощью ИФА, как описано в примере 1. На фиг. 2 показано, что уровень человеческого α -синуклеина в плазме достигает пика в момент времени, равный 1 ч, а потом спадает со временем. С другой стороны, наивысшие уровни антитела 12F4 наблюдали в момент времени, равный 24 ч, а уровни 12F4 в плазме спадают более медленно, чем уровни человеческого α -синуклеина.

Пример 3. Кратковременная терапия трансгенных мышей с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина высокими дозами 12F4 снижает уровни человеческого α -синуклеина в головном мозге, коррелирующие с уровнями человеческого α -синуклеина в плазме.

Этот пример описывает определение уровней человеческого α -синуклеина в образцах, взятых из головного мозга, после инъекции антитела 12F4. Трансгенным мышам в возрасте трех с половиной месяцев с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина дикого типа (PDGF β -h[wt] α -синуклеин; D-линия) на протяжении 8 дней четыре раза проводили внутрибрюшинную инъекцию антитела 12F4 в дозировках 50 мг/кг (через 72, 144 и 192 ч после первой инъекции). Через 24 ч после последней инъекции животных умерщвляли и перфузировали ФСР. Кору головного мозга и гиппокамп гомогенизировали в ФСР, а растворимые (ФСР-растворимые) и нерастворимые (ФСР-нерастворимые) фракции головного мозга готовили с помощью дифференциального центрифугирования. В частности, мозг удаляли, расщипывали и замораживали при -80°C . Замороженные ткани головного мозга гомогенизировали в 10 объемах (масса/объем) ФСР с помощью гомогенизатора Даунса (500 об/мин, 30 ударов) и на протяжении 1 мин разбивали ультразвуком. Клеточный детрит удаляли с помощью центрифугирования при 5000 g на протяжении 5 мин (4°C). Надосадочную жидкость (НЖ) центрифугировали на протяжении 1 ч (4°C) при 35000 об/мин (Ti51 ротор; Beckman-Coulter). Полученная НЖ являлась выделенной растворимой фракцией. Осадок перерастворяли в 1% Triton ФСР и разбивали ультразвуком (3×1 мин). Эта фракция являлась выделенной нерастворимой фракцией.

Уровни человеческого α -синуклеина в обеих фракциях определяли количественно с помощью сэндвич-ИФА (Invitrogen, США) и нормировали относительно содержания белка. Как показано на фиг. 3А, уровни кортикального растворимого человеческого α -синуклеина у мышей, проходящих терапию 12F4, были существенно снижены на 34% (190 ± 29 мкг/г для 12F4 по сравнению с 288 ± 36 мкг/г для контрольного раствора, $n=10$, $p<0.05$, критерий Стьюдента). Аналогично после кратковременной терапии высокими дозами 12F4 наблюдали 33% снижение уровней растворимого человеческого α -синуклеина в гиппокампе (фиг. 3Б) (119 ± 22 мкг/г для 12F4 по сравнению с 178 ± 30 мкг/г для контрольного раствора, $n=9-10$, $p=0.14$, критерий Стьюдента) и 26% снижение уровней нерастворимого человеческого α -синуклеина в гиппокампе (фиг. 3В) (23 ± 3 мкг/г для 12F4 по сравнению с 31 ± 6 мкг/г для контрольного раствора, $n=9-10$, $p=0.29$, критерий Стьюдента). Эти результаты показывают, что кратковременная терапия 12F4 приводит к снижению α -синуклеин патологии в головном мозге у трансгенных мышей с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина.

Чтобы узнать, связано ли наблюдаемое возрастание уровней человеческого α -синуклеина в плазме с мозговой α -синуклеин патологией, на график наносили зависимость уровней человеческого α -синуклеина в плазме от уровней человеческого α -синуклеина в головном мозге. Наблюдали высоко значимую корреляцию между уровнями человеческого α -синуклеина в плазме и уровнями кортикального растворимого человеческого α -синуклеина (фиг. 4А) с уровнями растворимого человеческого α -синуклеина в гиппокампе (фиг. 4Б) и уровнями нерастворимого человеческого α -синуклеина в гиппокампе (фиг. 4В) после кратковременной терапии высокими дозами 12F4. При терапии контрольным раствором корреляции между уровнями α -синуклеина в плазме и головном мозге не наблюдали.

Пример 4. Корреляция между уровнями человеческого α -синуклеина в плазме и головном мозге после длительной терапии 12F4 трансгенных мышей с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина.

Этот пример описывает определение уровней человеческого α -синуклеина в образцах, взятых из головного мозга, после инъекций антитела 12F4, проводимых раз в неделю на протяжении шести месяцев.

Трансгенным мышам в возрасте шести месяцев с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина дикого типа A30P (Thyl-h[A30P]- α -синуклеин) (Kahle et al., Am JPathol., 159(6): 2215-2225 (2001)) еженедельно на протяжении 6 месяцев проводили внутрибрюшинную инъекцию химерного 12F4 в дозировке 10 мг/кг. Образцы плазмы и мозгового вещества готовили через 24 ч после последней инъекции. Кору головного мозга/гиппокамп совместно гомогенизировали в ФСР, а растворимые (ФСР-растворимые) и нерастворимые (ФСР-нерастворимые) фракции головного мозга готовили с помощью дифференциального центрифугирования, как описано в примере 3. Уровни человеческого α -синуклеина в обеих фракциях определяли количественно с помощью ИФА и нормировали относительно содержания белка как описано в примере 3. Уровни человеческого α -синуклеина в плазме (фиг. 5А) и уровни химерного 12F4 (фиг. 5Б) определяли с помощью ИФА. Уровни человеческого α -синуклеина в плазме определяли так, как это описано в примере 1, а уровни химерного 12F4 в плазме определяли с помощью прямого α -синуклеин ИФА, используя в качестве пробы рекомбинантное химерное 12F4 известной концентрации.

Чтобы узнать, коррелируют ли уровни α -синуклеина в плазме и головном мозге после длительной терапии химерным 12F4, на график наносили зависимость уровней человеческого α -синуклеина в плазме от уровней человеческого α -синуклеина в головном мозге. Наблюдали значительную корреляцию между уровнями α -синуклеина в плазме и головном мозге после длительной шестимесячной терапии химерным 12F4 трансгенных мышей с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина (фиг. 5В).

Пример 5. Пик α -синуклеина в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) после введения 124F яванским макакам.

Этот пример описывает определение уровней 12F4 в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), а также уровней эндогенного α -синуклеина в ЦСЖ яванских макаков после введения 124F. Трех взрослым, ранее не подвергавшимся экспериментам яванским макакам проводили внутрибрюшинную инъекцию единичной дозы, составляющей 10 мг/кг антитела 12F4. Животным не давали пищи за 1-12 мин до введения 12F4 и на протяжении 2 ч после дозирования во время забора образцов ЦСЖ. Образцы крови (около 0,5 мл/образец) брали из бедренной вены/артерии через 0,5, 2, 5, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 408, 504, 672 и 840 ч после дозирования. Образцам позволяли сворачиваться на протяжении по меньшей мере 30 мин, а затем центрифугировали в условиях окружающей среды с последующим завершением забора образцов в каждом интервале. Полученную сыворотку сепарировали и хранили замороженной при температуре от -50 до -90° до тех пор, пока не переносили на сухой лед для анализа. Уровни 12F4 в сыворотке определяли с помощью сэндвич-ИФА (Covance).

С помощью ИФА (Covance) также определяли концентрации 12F4 и эндогенного α -синуклеина в образцах ЦСЖ, взятых из мостомозжечковой цистерны в разные моменты времени после дозирования. Перед забором образцов ЦСЖ животных усыпляли с помощью внутримышечной (ВМ) инъекции 0,1 мг/кг ацепромазина малеата с дополнительным введением поддерживающих доз в случае надобности. Анестезию проводили путем ВМ инъекции 20 мг/кг кетамина. Заднюю часть головы обривали для того, чтобы обеспечить доступ к мостомозжечковой цистерне, а место доступа обрабатывали скрабом хлоргексидина и раствором хлоргексидина в пределах стерильного поля. Животное укладывали в положение, промежуточное между положением на животе и на боку, а голову наклоняли вперед, пока подбородок не касался груди. Для того чтобы получить доступ к мостомозжечковой цистерне с помощью метода асептики, использовали катетер с внутренней иглой. Каждый день забора образцов трижды на день, приблизительно каждые 6-9 ч (начиная перед забором образцов ЦСЖ), животным внутримышечно вводили 0,01 мг/кг бупренорфина. После анестезии и забора образцов ЦСЖ на протяжении восстановления животных тщательно контролировали на предмет физиологических нарушений, включающих сердечно-сосудистую/дыхательную недостаточность, гипотермию и обильное кровотечение из послеоперационной раны. Образцы ЦСЖ (около 0,2 мл/образец) брали через 2, 24, 72, 168, 336, 504 и 672 ч после дозирования из помещенной на лед мостомозжечковой цистерны. Образцы хранили замороженными при температуре от -50 до -90° до тех пор, пока не переносили на сухой лед для анализа.

Соотношение между ЦСЖ/12F4 в сыворотке составило около 0,1%, как и прогнозировалось для человеческого IgG антитела. Уровень α -синуклеина в ЦСЖ возрос приблизительно в 5 раз после лечения 12F4 (фиг. 6).

Пример 6. In vivo микродиализ трансгенных мышей, экспрессирующих α -синуклеин.

Этот пример описывает определение уровней α -синуклеина в плазме и в интерстициальной жидкости головного мозга (ИЖМ) после введения 124F трансгенным мышам, экспрессирующим A53T α -синуклеин. In vivo микродиализ трансгенных мышей, экспрессирующих α -синуклеин, проводили после введения 124F или контрольного раствора (контрольное IgG-антитело). В частности, направляющие канюли стереотаксически вживляли в стриатум 6-9-месячных трансгенных мышей, экспрессирующих A53T α -синуклеин (B6;C3-Tg(PrP-SNCA*A53T)83Vle/J) под изофлурановой анестезией (4-2.5%). Голову обривали, а кожу срезали стерильным скальпелем, чтобы открыть череп. Над правым стриатумом просверливали отверстия в соответствии с атласом Паксиноса и Франклина (The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Second Edition (2004)) (координаты, AP=+0.5 мм, ML= -2.2 мм, DV= -2.4 мм). Направляющие

канюли СМА-12 (СМА Microdialysis AB, Швеция) вводили и прикрепляли к черепу с помощью винтов из нержавеющей стали и зубного цемента. Мышей снимали со стереотаксического устройства и помещали в отдельные клетки для восстановления. Через пять дней после операции мышей перемещали в клетку(и) для микродиализа. Индивидуально сделанные зонды СМА-12 (2 мм, 100 кДа отрезок) вводили и соединяли с СМА насосом с постоянной скоростью тока жидкости в 0,6 мкл/мин. Перфузию проводили в искусственной ЦСЖ, содержащей в качестве осмотически-активного вещества БСА. Перед забором образцов зонд находился в равновесном состоянии на протяжении 4-20 ч при той же скорости тока жидкости. Фоновые пробы брали в основном раз в два часа на протяжении 2 ч. 12F4 или контрольный раствор вводили внутривентриально единичной дозой, составляющей 30 мг/кг. После инъекции образцы брали ежедневно на протяжении приблизительно 24 ч. Все образцы брали с помощью коллектора охлажденных частиц и хранили при -80°C до проведения анализа с помощью амбулаторного ультрачувствительного сэндвич-ИФА (Emmanouilidou et al., PLoS ONE 6(7): e22225 (2011)). Образцы плазмы также брали до дозирования и через 2 и 24 ч после дозирования, а затем анализировали с помощью специфического к человеческому α -синуклеину сэндвич-ИФА (Invitrogen, Carlsbad CA).

Наблюдали приблизительно 60% снижение внеклеточного α -синуклеина в ИЖМ через 2-3 ч после введения 12F4. Контрольный раствор не приводил к изменению уровней α -синуклеина в ИЖМ в микродиализате (фиг. 7).

Пример 7. Влияние антитела к α -синуклеину на концентрацию α -синуклеина в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) в крысиной модели с ААВ- α -синуклеин комплексом.

Влияние антитела к α -синуклеину на концентрацию α -синуклеина в ЦСЖ будет оценено для крысиной модели с аденоассоциированным вирусным (ААВ)- α -синуклеин комплексом. Будут созданы такие ААВ векторы, которые экспрессируют человеческий α -синуклеин дикого типа или один из вариантов последовательности человеческого α -синуклеина, которые ассоциируются с наследственной болезнью Паркинсона (например, A53T или A30P). ААВ- α -синуклеин вектор будет внесен в определенный участок головного мозга взрослой крысы (например, стриатум, кору или гиппокамп) либо в боковой желудочек новорожденной крысы. За период в один или несколько месяцев в головном мозге будет накапливаться концентрация человеческого α -синуклеина. В это время крысы будут проходить лечение антителом к α -синуклеину путем внутривентриального или внутривенного введения, а образцы ЦСЖ будут брать в разное время. Концентрацию α -синуклеина будут определять в образцах ЦСЖ с помощью ИФА.

Объем данного изобретения не ограничивается описанными конкретными вариантами реализации, которые являются единичными иллюстративными примерами отдельных аспектов изобретения, а любые составы или способы, которые являются функционально эквивалентными, входят в объем данного изобретения. Действительно, на основании вышеизложенного описания и прилагаемых чертежей для специалиста в данной области техники будет очевидно существование различных модификаций изобретения дополнительно к тем, которые были показаны и описаны в данном тексте. Такие модификации включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

Все упоминаемые в описании изобретения публикации и патентные заявки включены в данный текст посредством ссылок в той же степени, как если бы было отмечено, что каждая отдельная публикация или патентная заявка специально и отдельно включена посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения уровня α -синуклеина в головном мозге субъекта, представляющего собой человека, включающий:

(а) осуществление анализа уровня α -синуклеина в образце плазмы крови или цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), взятом у указанного субъекта, после периферического введения указанному субъекту антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарности области (CDRs), VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, имеющие последовательности аминокислот SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6 соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, имеющие последовательности аминокислот SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9 соответственно; и

(б) сравнение полученного уровня α -синуклеина в образце плазмы крови или ЦСЖ с контрольным показателем; причем разница или сходство между уровнем α -синуклеина в образце плазмы крови или ЦСЖ и контрольным показателем коррелирует с уровнем α -синуклеина в головном мозге указанного субъекта.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный способ включает определение повышенного уровня α -синуклеина в головном мозге субъекта, представляющего собой человека.

3. Способ по п.1, дополнительно включающий сравнение уровня α -синуклеина в образце плазмы крови, полученном после введения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, и образце плазмы крови, взятом у указанного субъекта до введения антитела к α -синуклеину или его анти-

генсвязывающего фрагмента.

4. Способ по п.1, дополнительно включающий сравнение уровня α -синуклеина в образце ЦСЖ, полученном после введения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, и образце ЦСЖ, взятом у указанного субъекта до введения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что контрольный показатель содержит уровни α -синуклеина, измеренные у одного или более контрольных субъектов, причем контрольные субъекты представляют собой нормальных здоровых индивидуумов или индивидуумов с синуклеопатиями разной степени тяжести.

6. Способ отслеживания уровня α -синуклеина в головном мозге субъекта, представляющего собой человека, который проходит лечение от синуклеопатического заболевания, включающий осуществление анализа уровня α -синуклеина в плазме крови или ЦСЖ указанного субъекта, после периферического введения антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарности области (CDRs), VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, имеющие последовательности аминокислот SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6 соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, имеющие последовательности аминокислот SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9 соответственно; и при этом уровень α -синуклеина в плазме крови или ЦСЖ субъекта коррелирует с уровнем в головном мозге указанного субъекта.

7. Способ по п.6, дополнительно включающий анализ уровня α -синуклеина в плазме крови субъекта после дополнительных периферических введений антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, и получение, таким образом, графика изменения уровня α -синуклеина в головном мозге указанного субъекта.

8. Способ по п.6, дополнительно включающий анализ уровня α -синуклеина в ЦСЖ субъекта после дополнительных периферических введений антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента, и получение, таким образом, графика изменения уровня α -синуклеина в головном мозге указанного субъекта.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что антитело к α -синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность VH SEQ ID NO: 2 и аминокислотную последовательность VL SEQ ID NO: 3.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный Fv фрагмент (scFv), F(ab') фрагмент, F(ab) фрагмент или F(ab')₂ фрагмент.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что введение осуществляется путем внутривенной инъекции антитела к α -синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента.

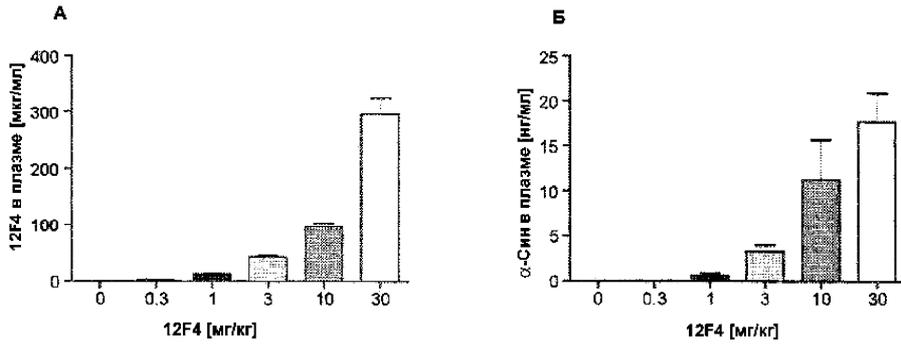
12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что антитело к α -синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим.

13. Способ по любому из пп. 1-5 или 9-12, отличающийся тем, что образец получен от указанного субъекта менее чем через неделю после периферического введения.

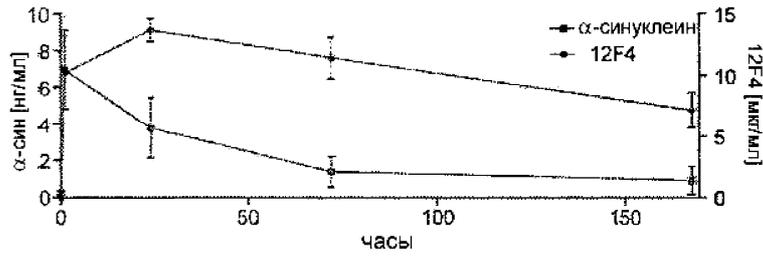
14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что образец получен от указанного субъекта через 24 ч или менее после периферического введения.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что образец взят у указанного субъекта через 3 ч или менее после периферического введения.

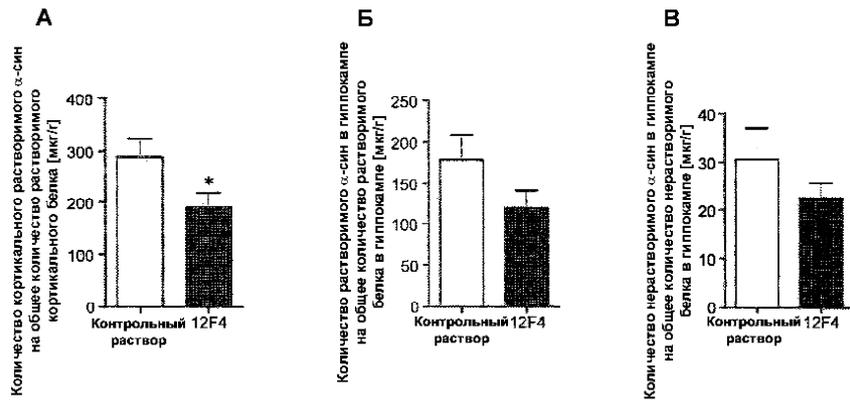
16. Способ по любому из пп. 6-8, отличающийся тем, что синуклеопатическое заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Паркинсона (БП), деменции при болезни Паркинсона (ДБП), деменции с тельцами Леви (ДТЛ), варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (ВБАТЛ), множественной системной атрофии (МСА), идиопатической ортостатической гипотензии (ИОГ), нейродегенерации с церебральным накоплением железа 1-го типа (НЦНЖ-1), болезни Альцгеймера, болезни Пика, младенческой нейроаксональной дистрофии (болезни Галлервордена-Шпатца), бокового амиотрофического склероза, травматических повреждений головного мозга и синдрома Дауна.



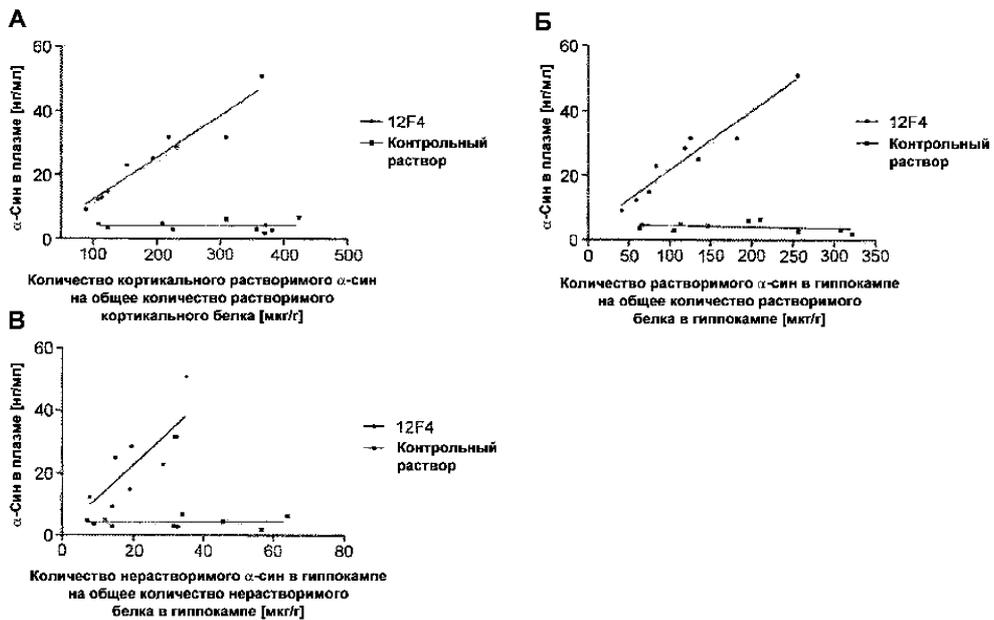
Фиг. 1



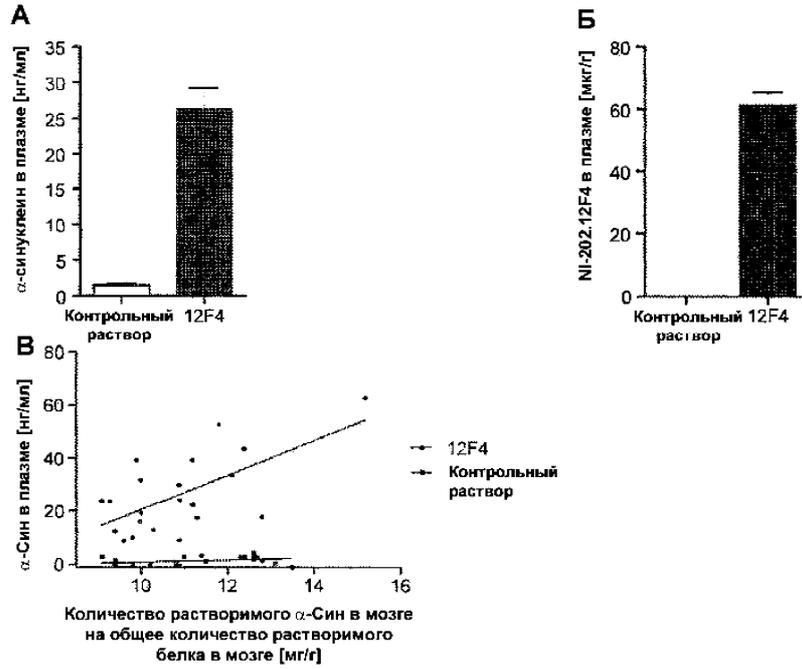
Фиг. 2



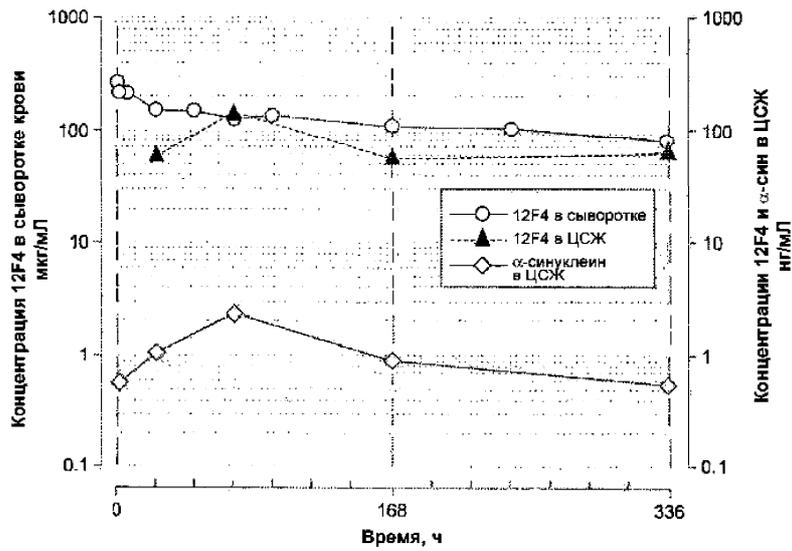
Фиг. 3



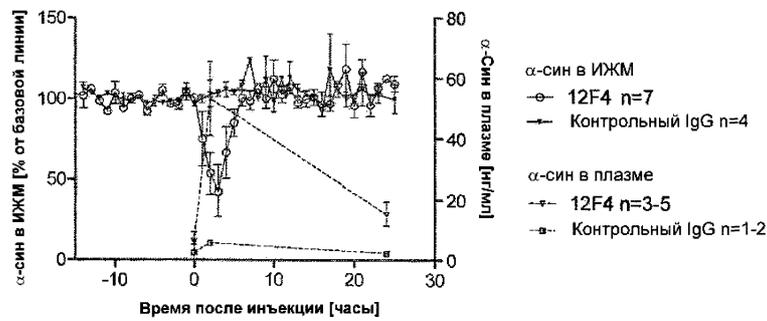
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7