

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090961 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.29

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.16

(54) АНТИТЕЛА К α -СИНУКЛЕИНУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/588,018; 62/687,848

(72) Изобретатель:

(32) 2017.11.17; 2018.06.21

Ли Сан Хун, Ю Вонкю, Ан Чжинхён,
Ан Сонвон, Чон Джинвон, Ли Бора,
Ким Донин, Сон Бёндже, Сон Ёнгию,
Ким Ёнчжу, Ом Джахён, Ан Сэвон,
Пак Ёндон, Ём Донхун, Сон Дэхе (KR)

(33) US

(86) PCT/KR2018/014123

(87) WO 2019/098763 2019.05.23

(88) 2019.07.11

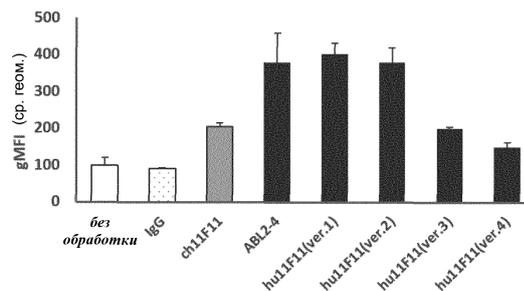
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

ЭйБиЭл БИО ИНК. (KR)

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Данное изобретение относится к антителам к альфа-синуклеину, предпочтительно распознающим агрегаты альфа-синуклеина, и к применению антител к альфа-синуклеину для обнаружения, диагностики и/или лечения или предупреждения различных заболеваний или симптомов заболеваний, связанных с накоплением агрегатов альфа-синуклеина.



A1

202090961

202090961

A1

РСТ/KR2018/014123 **МПК:** *C07K 16/18* (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

АНТИТЕЛА К α -СИНУКЛЕИНУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ
ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к антителу к альфа-синуклеину и его применению.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Альфа-синуклеин (α -синуклеин) экспрессируется преимущественно в пресинаптических окончаниях нейронов и представляет собой природно несвернутый мономер в нормальных условиях. Альфа-синуклеин способствует регуляции высвобождения дофамина, который является нейротрансмиттером, контролирующим произвольные или непроизвольные движения. В частности, функция альфа-синуклеина имеет важное значение при увеличении активности синапсов и старении и является важным фактором нейродегенерации.

Однако в патологическом состоянии альфа-синуклеин претерпевает структурные изменения в результате связывания и взаимодействия с каплями липидов, фосфолипидными бислоями или липидными мембранами, с образованием свернутой или свернутой в альфа-спираль вторичной структуры, таким образом, его количество разделяется. Образуются агрегаты, содержащие молекулы в форме димеров, олигомеров и/или фибрилл.

Известно, что такие агрегаты альфа-синуклеина оказывают токсическое действие на клетки и являются основным компонентом телец Леви, патологических белковых агрегатов, которые обнаруживают в нейронах при болезни Паркинсона (PD), болезни Паркинсона с деменцией (PDD), множественной системной атрофии (MSA), деменции с тельцами Леви (DLB) и различных заболеваниях. Также известно, что посттрансляционные модификации альфа-синуклеина, такие как фосфорилирование или убиквитинирование, также связаны с агрегацией и нейротоксичностью альфа-синуклеина. Известно, что альфа-синуклеин уничтожает дофаминовые нейроны и вызывает воспалительные реакции в экспериментах на животных и в экспериментах на клетках и вызывает двигательные симптомы, аналогичные болезни Паркинсона, у экспериментальных животных. Кроме того, известно, что агрегация альфа-синуклеина связана с этиологией группы нейродегенеративных заболеваний под названием альфа-синуклеинопатии, включающей болезнь Паркинсона, болезнь Паркинсона с деменцией,

деменцию с тельцами Леви, множественную системную атрофию и многие другие нейро-аксональные заболевания.

Кроме того, в образцах цереброспинальной жидкости и плазмы пациентов с болезнью Паркинсона были обнаружены как олигомерные, так и мономерные формы альфа-синуклеина, указывающие, что агрегаты альфа-синуклеина с низкой молекулярной массой могут проникать через клеточную мембрану и достигать межклеточного пространства. Также было показано, что свернутый альфа-синуклеин может высвобождаться из клеток посредством экзоцитоза и затем транспортироваться из одного участка головного мозга в другой участок посредством межклеточного транспорта, подобно белкам-прионам.

Таким образом, альфа-синуклеин является мишенью для разработки терапевтических агентов для α -синуклеинопатий, таких как болезнь Паркинсона. Основные стратегии разработок включают ингибирование образования агрегатов, сайленсинг генов и удаление агрегатов. В первом случае применяли эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG), 3-(1,3-бензодиоксилил-бромфенил)-1H-пиразол (anle138b), CLR0120 и ингибитор пролил-олигопептидазы KYP-20479.

Низкомолекулярные соединения необходимо вводить в высокой дозе из-за низкой специфичности связывания с мишенью и короткого времени полужизни. В отличие от низкомолекулярных соединений, антитело обладает специфичностью к мишени и длительным временем полужизни. Однако для увеличения терапевтического потенциала в отношении заболевания, необходимы антитела, которые предпочтительно связываются с агрегатами с высокой аффинностью. Таким образом, для лечения заболеваний, ассоциированных с аномальным накоплением агрегатов альфа-синуклеина, необходимо разработать антитела, способные предпочтительно связываться с альфа-синуклеином, в частности с агрегатами альфа-синуклеина.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ТЕХНИЧЕСКАЯ ЗАДАЧА

В данном описании изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные специфически связываться с альфа-синуклеином, в частности с агрегатом альфа-синуклеина. Антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент могут специфически распознавать и связывать альфа-синуклеин и, в частности, связываться с С-концевой областью альфа-синуклеина.

В одном воплощении настоящего изобретения предложено антитело, которое

специфически связывается с альфа-синуклеином или агрегатом альфа-синуклеина и снижает уровень альфа-синуклеина в нервной системе субъекта. Более конкретно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению имеют высокую аффинность связывания с агрегатом альфа-синуклеина, в частности с амилоидными фибриллами, протофибриллами и олигомерами, и особенно с фибриллами амилоида, но имеет низкую аффинность к мономеру альфа-синуклеина.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обладают по меньшей мере одним свойством, выбранным из группы, состоящей из: (1) специфического связывания с альфа-синуклеином или агрегатом альфа-синуклеина, (2) снижения уровня альфа-синуклеина или агрегата альфа-синуклеина в нервной системе субъекта, (3) снижения или ингибирования межклеточного переноса альфа-синуклеина или агрегатов альфа-синуклеина в нервных клетках и (4) улучшения фагоцитозного захвата альфа-синуклеина или агрегатов альфа-синуклеина нервными клетками. Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может обладать всеми свойствами (1)-(4).

Одно воплощение настоящего изобретения относится к композиции для предупреждения, облегчения, улучшения или лечения синуклеинопатий, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные специфически связываться с альфа-синуклеином, особенно с агрегатом альфа-синуклеина.

Одно воплощение настоящего изобретения относится к способу предупреждения, облегчения, улучшения или лечения синуклеинопатий, включающему стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способных специфически связываться с альфа-синуклеином, в частности с агрегатом альфа-синуклеина. Вводимое количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может представлять собой количество, эффективное для снижения уровня альфа-синуклеина, в частности агрегата альфа-синуклеина, в нервной системе, более конкретно, в межклеточном пространстве нервных клеток в нервной системе субъекта.

Одно воплощение настоящего изобретения относится к способу снижения уровня альфа-синуклеина, в частности агрегата альфа-синуклеина в нервной системе, более конкретно в межклеточном пространстве нервных клеток в нервной системе субъекта, или к применению для снижения уровня альфа-синуклеина, в частности агрегата альфа-синуклеина в межклеточном пространстве нервных клеток в нервной системе, включающему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные

специфически связываться с альфа-синуклеином, в частности с агрегатом альфа-синуклеина.

Одно воплощение настоящего изобретения относится к способу снижения или ингибирования межклеточного переноса альфа-синуклеина или агрегата альфа-синуклеина в нервной системе, в частности между нервными клетками субъекта, или к применению для снижения или ингибирования межклеточного переноса альфа-синуклеина или агрегата альфа-синуклеина между нервными клетками в нервной системе, включающему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные специфически связываться с альфа-синуклеином, в частности с агрегатом альфа-синуклеина.

Одно воплощение настоящего изобретения относится к способу увеличения фагоцитозного захвата альфа-синуклеина или агрегатов альфа-синуклеина микроглией в нервной системе или к применению для увеличения фагоцитозного захвата альфа-синуклеина или агрегатов альфа-синуклеина микроглией в нервной системе, включающему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные специфически связываться с альфа-синуклеином, в частности с агрегатом альфа-синуклеина.

ТЕХНИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ

Ниже данное изобретение будет описано более подробно.

В данном изобретении предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные специфически связываться с альфа-синуклеином, в частности с агрегатом альфа-синуклеина. Антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент могут специфически распознавать альфа-синуклеин и связываться с ним, не связываясь с бета(β)-синуклеином или гамма(γ)-синуклеином, и специфически распознают и связываются с агрегатом альфа-синуклеина, не связываясь с агрегатом бета-амилоида и агрегатом тау-белка.

В данном описании изобретения термин "антиген" или "иммуноген" означает молекулу или часть молекулы, которая, например, может быть связана антигенсвязывающим белком (например антителом или его иммунологически функциональным антигенсвязывающим фрагментом), и может быть использована для продуцирования у животного антитела, способного связываться с антигеном. Антиген может включать один или более чем один эпитоп, который может взаимодействовать с другим антителом или его фрагментом. В одном воплощении настоящего изобретения

антиген может представлять собой белок альфа-синуклеин или агрегат белка альфа-синуклеина. В частности, агрегат белка альфа-синуклеина может представлять собой амилоидные фибриллы, протофибриллы и олигомеры, в частности амилоидные фибриллы. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, способные специфически связываться с альфа-синуклеином или его агрегатом, в частности, могут специфически связываться с С-концевой областью альфа-синуклеина. Антитела к альфа-синуклеину, распознающие N-конец, не могут распознавать агрегаты при других заболеваниях, таких как множественная системная атрофия, относящаяся к синуклеинопатиям, которые совместно относятся к заболеваниям, связанным с альфа-синуклеином. Напротив, антитела к альфа-синуклеину, которые распознают С-концевую область, обладают преимуществом в распознавании агрегатов при других различных синуклеинопатиях, а также при болезни Паркинсона.

В данном описании изобретения термин "нейтрализация" относится к ингибированию или снижению биологической активности антигена, когда связывающийся белок специфически связывается с этим антигеном. В одном воплощении нейтрализующий белок или нейтрализующее антитело могут связываться с антигеном (альфа-синуклеином или агрегатом альфа-синуклеина), и таким образом снижать уровень антигена по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% в межклеточном пространстве нервных клеток в нервной системе субъекта или предупреждать повышение уровня антигена в межклеточном пространстве.

В данном описании "альфа-синуклеин" представляет собой нативный альфа-синуклеин (NCBI ID: NP_000336), состоящий из 140 аминокислот, кодируемый геном SNCA, и включает различные процессированные формы, а также полноразмерный непроцессированный белок. Кроме того, альфа-синуклеин включает природные варианты альфа-синуклеина, такие как мутанты, сплайс-варианты или аллельные варианты. Варианты представляют собой формы белка из 126 и 112 остатков, в которых делетированы экзон 3 и экзон 5 (CAG3339.1), а также белок из 140 остатков. Также известно, что специфические полиморфизмы или миссенс-мутации гена SNCA связаны с возникновением болезни Паркинсона, и такие варианты также включены в альфа-синуклеин. Также включены бета-синуклеин и гамма-синуклеин, которые являются гомологами альфа-синуклеина. В одном воплощении антитело по настоящему изобретению специфически распознает альфа-синуклеин. Аминокислотная

последовательность альфа-синуклеина приведена в SEQ ID NO: 225.

В данном описании "агрегат альфа-синуклеина" образуется вследствие конформационного изменения альфа-синуклеина и включает олигомер, протофибриллу, фибриллу и/или структуру или агрегат, включающие по меньшей мере одно из перечисленного.

Альфа-синуклеин, который может распознаваться предложенным в изобретении антителом, может быть выбран из альфа-синуклеинов млекопитающих: альфа-синуклеина человека, альфа-синуклеина обезьяны (например альфа-синуклеина макаки-резус), альфа-синуклеина мыши, альфа-синуклеина крысы и т.п. Например, альфа-синуклеин человека может представлять собой альфа-синуклеин (NCBI ID: NP_000336), но не ограничивается им. Если не указано иное, альфа-синуклеин может относиться к альфа-синуклеину человека, а антитела или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в данном описании изобретения, обладают свойством специфического связывания не только с альфа-синуклеином человека, но также и с альфа-синуклеином обезьяны (например макаки-резус), альфа-синуклеином крысы и/или альфа-синуклеином мыши.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с С-концевой областью альфа-синуклеина, в частности с С-концевой областью, включающей пептид, состоящий по меньшей мере из 11 или 12 последовательно расположенных аминокислотных остатков, включая остатки 110 - 120 или остатки 111 - 122 в SEQ ID NO: 126 человеческого альфа-синуклеина. Было подтверждено, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут распознавать область распознавания антигена и связываться с агрегатом альфа-синуклеина с высокой аффинностью связывания.

В данном описании изобретения "аффинность" или "степень аффинности" представляет собой силу взаимодействия между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и антигеном, и может определяться такими свойствами антигена как размер, форма и/или заряд антигена, и последовательностями CDR и/или физико-химическими свойствами (свойства гидрофильности/гидрофобности, электростатические свойства и т.д.) антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Способы определения аффинности известны в данной области техники, обычно обозначаются константой диссоциации (KD), но не ограничиваются указанным.

В данном описании "специфически связывающийся с альфа-синуклеином или агрегатом альфа-синуклеина" означает, что аффинность связывания с белком альфа-

синуклеина или агрегатом альфа-синуклеина относительно высокая по сравнению с другими антигенами и, например, аффинность антитела к агрегатам альфа-синуклеина, в частности к амилоидным фибриллам, протофибриллам и олигомерам, в частности к амилоидным фибриллам может составлять от $0,1 \times 10^{-10}$ М до 2×10^{-10} М, или от $0,05 \times 10^{-10}$ М до $0,3 \times 10^{-9}$ М при измерении посредством Octet анализ или методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), но не ограничиваться ими.

Гуманизированные антитела к альфа-синуклеину, включающие легкую цепь и тяжелую цепь согласно одному воплощению настоящего изобретения, например Hu11F11_ (ver.1), Hu11F11 (ver.2) и Hu11F11_ABL2-4, демонстрируют высокую активность в стимулировании фагоцитарного захвата по сравнению с химерными антителами к альфа-синуклеину. По сравнению с химерными антителами к альфа-синуклеину, Hu11F11 (ver.1), Hu11F11 (ver.2), Hu11F11 (ver.3), Hu11F11 (ver.4) и ABL2-4 демонстрируют высокую активность ингибитора связывания фибрилл с мембраной нервных клеток по сравнению с химерным антителом к альфа-синуклеину. Hu11F11 (ver.2), Hu11F11 (ver.4) и ABL2-4 обладают высокой активностью ингибитора проникновения альфа-синуклеина, секретированного клетками, сверхэкспрессирующими альфа-синуклеин, в другие нервные клетки по сравнению с химерным антителом к альфа-синуклеину и демонстрируют аффинность связывания с агрегатами альфа-синуклеина, например, аналогичную или превосходящую активность химерного антитела в отношении альфа-синуклеина в тесте на клетках.

Антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению может ингибировать такую функцию агрегатов альфа-синуклеина, секретированных нервными клетками в нервной системе субъекта, как перемещение к другим нормальным клеткам в межклеточном пространстве и поражение нервных клеток (ингибировать межклеточный перенос агрегатов) и обладает способностью стимулировать фагоцитоз агрегатов альфа-синуклеина микроглией в межклеточном пространстве. Агрегаты альфа-синуклеина проникают от одной клетки в другую подобно прионам, и альфа-синуклеин, в частности агрегаты альфа-синуклеина, распространяются в головном мозге, приводя к синуклеинопатиям в нормальных клетках. Таким образом, агрегаты альфа-синуклеина являются токсичными для нейронов головного мозга и, как хорошо известно, вызывают гибель нейронов головного мозга (нейродегенерацию) и нейровоспаление. Соответственно, по мере того как агрегаты альфа-синуклеина распространяются в различные части головного мозга, гибель клеток головного мозга и нейровоспалительные

реакции нарастают и приводят к гибели клеток головного мозга и в результате этого, к нарушению поведения и когнитивных функций, которые наблюдаются при прогрессировании синуклеинопатий, таких как болезнь Паркинсона.

Соответственно, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению может предупреждать явление распространения агрегатов альфа-синуклеина в различные отделы головного мозга путем ингибирования переноса альфа-синуклеина или агрегатов альфа-синуклеина между нервными клетками и снижать уровень агрегатов альфа-синуклеина, который является важной причиной синуклеинопатий, путем уменьшения или ликвидации самих агрегатов альфа-синуклеина в межклеточном пространстве нервных клеток в нервной системе субъекта со стимулированием фагоцитоза микроглией, что приводит к уменьшению гибели нервных клеток и нейровоспалительной реакции и при этом, как ожидается, может улучшать, облегчать или предупреждать симптомы и развитие синуклеинопатий, таких как болезнь Паркинсона.

Кроме того, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению обладает превосходными активностями в осуществлении обеих из следующих двух функций: (1) ингибирование переноса альфа-синуклеина или агрегата альфа-синуклеина между нервными клетками (см. результаты описанного в данном описании изобретения клеточного анализа) и (2) уменьшение уровня агрегатов альфа-синуклеина в головном мозге благодаря улучшенному фагоцитозу клетками микроглии. В частности, поскольку антитела к альфа-синуклеину, которые проходили клинические исследования или которые были описаны в научных публикациях, обладают одним из двух видов активности (1) и (2), можно предположить, что преимуществом антитела к альфа-синуклеину по настоящему изобретению по сравнению с известными антителами к альфа-синуклеину, является лучшее предупреждение или лечение синуклеинопатий. Следовательно, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению более эффективно снижает и устраняет агрегаты альфа-синуклеина и ингибирует влияние агрегатов альфа-синуклеина как этиологического фактора и, следовательно, является более эффективным в отношении синуклеинопатий или связанного с ними симптоматического заболевания (например нарушения когнитивной функции).

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, обладающие высокой аффинностью к агрегатам альфа-синуклеина, могут уменьшать образование агрегатов альфа-синуклеина, тем самым снижая концентрацию агрегатов в головном мозге. Кроме того, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему

изобретению, обладающие высокой аффинностью к агрегатам альфа-синуклеина, могут уменьшать образование агрегатов альфа-синуклеина за пределами центральной нервной системы и, наконец, изменять состояние равновесия между формами альфа-синуклеина, связанными с ВВВ (гематоэнцефалический барьер), тем самым оказывая эффект снижения концентрации агрегатов альфа-синуклеина в центральной нервной системе.

Это является огромным преимуществом для клинической практики, поскольку может быть достигнута достаточная эффективность даже при введении более удобным способом, например, посредством подкожной инъекции, без ограничения данным способом. Кроме того, поскольку антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, обладающие высокой аффинностью к агрегатам альфа-синуклеина, могут ингибировать и/или уменьшать образование, накопление и/или межклеточный перенос агрегатов альфа-синуклеина, они могут снижать концентрацию агрегатов альфа-синуклеина в головном мозге. Кроме того, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению с высокой аффинностью к агрегатам альфа-синуклеина могут уменьшать образование агрегатов альфа-синуклеина за пределами центральной нервной системы и таким образом изменять состояние равновесия между формами альфа-синуклеина, связанными с ВВВ. Они могут оказывать эффект снижения концентрации агрегатов альфа-синуклеина в центральной нервной системе. Кроме того, но без ограничения данной теорией, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут ингибировать образование агрегатов путем удаления мономеров или удаляют как мономеры, так и агрегаты.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, специфически связывающиеся с белками альфа-синуклеина или агрегатами альфа-синуклеина, могут не являться продуктом природного происхождения (они могут представлять собой продукт искусственного происхождения, например полученный посредством химического синтеза или рекомбинантным методом). Такие рекомбинантные методы хорошо известны в данной области техники.

В данном описании термин "антитело" означает полный иммуноглобулин любого изотипа или антигенсвязывающий фрагмент, который может конкурировать с полным антителом за связывание с антигеном-мишенью. Например, он охватывает химерные, гуманизированные, полностью человеческие антитела или антитела с двойной специфичностью или их антигенсвязывающие фрагменты. Само антитело является одним видом антигенсвязывающих белков. Полное антитело обычно содержит по меньшей мере

2 полноразмерных тяжелых цепи и 2 полноразмерных легких цепи, но в некоторых случаях антитело может содержать только тяжелые цепи.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут происходить из одного источника или быть химерным антителом. Химерное антитело содержит часть, происходящую из антител двух разных типов, и описано более подробно ниже. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены с использованием гибридомы, технологии рекомбинантной ДНК или ферментативного или химического расщепления интактного антитела. Если не указано иное, термин "антитело" включает антитела, содержащие 2 полноразмерные тяжелые цепи и 2 полноразмерные легкие цепи, а также их производные, варианты, фрагменты и мутанты, примеры которых описаны ниже.

В одном воплощении антитело включает моноклональное антитело, биспецифичное антитело, мини-антитело, доменное антитело, миметик антитела (или синтетическое антитело), химерное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело, слитое антитело (или конъюгат антитела) и их фрагменты, и различные типы антител, описанных в данном описании, но не ограничено ими. В одном воплощении фрагменты раскрытых в данном описании изобретения антител могут представлять собой Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fv-фрагменты, одноцепочечные фрагменты (scFv), диатело или молекулу одноцепочечного антитела из одной цепи, полученную путем соединения вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи через спейсер.

В данном описании изобретения "легкая цепь" включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность вариабельной области, обеспечивающую достаточную специфичность связывания с антигеном или эпитопом. Полноразмерная легкая цепь содержит домен VL вариабельного участка и домен CL константного участка. Вариабельный домен легкой цепи находится на N-конце полипептида легкой цепи. Типы легкой цепи включают цепи каппа и лямбда.

В данном описании изобретения "тяжелая цепь" включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность вариабельной области, обеспечивающую достаточную специфичность связывания с антигеном или эпитопом. Полноразмерная тяжелая цепь содержит вариабельный домен VH и три (3) константных домена CH1, CH2 и CH3. Домен VH присутствует на N-конце полипептида тяжелой цепи, и домен CH1 присутствует на карбокси-конце, а CH3 располагается ближе всех к C-концу.

Тяжелая цепь включает IgG (включая подтипы IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2) и изотипы IgM и IgE.

В данном описании термин "антигенсвязывающий фрагмент" означает часть антитела, обладающую определенной аффинностью связывания с антигеном, и/или полипептид, включающий эту часть. Например, антигенсвязывающий фрагмент может быть частью антитела, включающей аминокислотные остатки, обеспечивающие специфичность и/или аффинность антитела к антигену при взаимодействии с антигеном (например эпитопом), или полипептидом, включающим эту часть. Антигенсвязывающий фрагмент обычно содержит один или более чем один "участок, определяющий комплементарность (CDR)" и один или более "каркасных" участков (FR). CDR представляют собой аминокислотные последовательности, которые вносят вклад в специфичность и аффинность связывания антитела с антигеном, а каркасные участки представляют собой аминокислотные последовательности, способствующие поддержанию необходимой конформации этих CDR, и способствуют связыванию между антигенсвязывающим участком и антигеном.

При использовании в данном описании изобретения "антигенсвязывающий фрагмент" цепи (тяжелой или легкой цепи) антитела или иммуноглобулина включает часть антитела, в которой отсутствуют некоторые аминокислоты по сравнению с полноразмерной цепью, но которая может специфически связываться с антигеном. Данный фрагмент можно считать обладающим биологической активностью в том аспекте, что он может специфически связываться с антигеном-мишенью или может конкурировать с другими антителами или антигенсвязывающим фрагментом за связывание с определенным эпитопом. В одном аспекте такой фрагмент содержит по меньшей мере один CDR, присутствующий в полноразмерной легкой цепи или тяжелой цепи, и в некоторых воплощениях он содержит одну цепь из тяжелой цепи и/или легкой цепи или ее часть. Данный биологически активный фрагмент может быть получен при помощи технологии рекомбинантной ДНК или может быть получен, например, путем ферментативного или химического расщепления интактного антитела. Иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина включает Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, доменное антитело и одноцепочечное антитело (например scFv, scFv-Fc и т.д.), но не ограничен ими, и может происходить из организма любого млекопитающего, включая человека, мышь, крысу, верблюда или кролика, без ограничения ими. Функциональная часть антитела, такая как один или несколько CDR, описанных в данном описании изобретения, может

быть связана со вторым белком или низкомолекулярным соединением ковалентной связью, и может быть использована в качестве адресного терапевтического агента для определенной мишени.

В данном описании "Fab-фрагмент" состоит из одной легкой цепи и одной тяжелой цепи, содержащей только переменный участок и СН1. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой тяжелой цепью.

В данном описании "Fc" участок содержит фрагменты двух тяжелых цепей, содержащих СН2 и СН3 домены антитела. Эти фрагменты 2 тяжелых цепей объединены друг с другом посредством двух или более дисульфидных связей и гидрофобного взаимодействия домена СН3.

В данном описании изобретения "Fab'-фрагмент" дополнительно содержит участок между СН1 и СН2 доменами тяжелой цепи, в дополнение к Fab-фрагменту, и может быть образован при помощи дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов.

В данном описании изобретения "F(ab')₂-фрагмент" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие переменную область, СН1 и часть константной области между доменами СН1 и СН2, как указано выше, и между 2 тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом, F(ab')₂-фрагмент состоит из двух Fab'-фрагментов, и два Fab'-фрагмента объединены между собой дисульфидной связью, образованной между ними.

В данном описании изобретения "Fv-область" представляет собой фрагмент антитела, который содержит каждую из переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, но не содержит константную область.

В данном описании изобретения "одноцепочечное антитело" представляет собой одну полипептидную цепь антигенсвязывающей области, образованную путем соединения переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи посредством гибкого линкера. Например, одноцепочечное антитело может представлять собой по меньшей мере антитело, выбранное из группы, состоящей из scFv, в котором переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи связаны в одноцепочечную форму, scFv-Fc, где переменная область тяжелой цепи, переменная область легкой цепи и Fc связаны в одноцепочечную форму, и т.п. Одноцепочечное антитело может относиться, например, к описанному в патенте US 5260203.

В данном описании изобретения "двухвалентный антигенсвязывающий белок" или

"двухвалентное антитело" содержит два антигенсвязывающих сайта. Два антигенсвязывающих сайта, содержащихся в таком двухвалентном антителе, могут обладать специфичностью к одному и тому же антигену или могут представлять собой антитело с двойной специфичностью, связывающееся с разными антигенами соответственно. В данном описании изобретения "мультиспецифичный антигенсвязывающий белок" или "мультиспецифичное антитело" нацелены на два или более антигена или эпитопа.

В данном описании изобретения "биспецифичный(ое)" или "обладающий(ее) двойной специфичностью" антигенсвязывающий белок или антитело представляет собой гибридный(ое) антигенсвязывающий(ое) белок или антитело, имеющие два разных антигенсвязывающих сайта. Такое биспецифичное антитело является одной разновидностью мультиспецифичного антигенсвязывающего белка или мультиспецифичного антитела и может быть получено различными известными способами, например такими способами как слияние гибридом или слияние Fab'-фрагментов. Например, можно обратиться к Songvilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 1990, 79:315-321; Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 1992, 148:1547-1553 и др. Два отличающихся друг от друга эпитопа, с которыми связываются два антигенсвязывающих сайта биспецифичного антигенсвязывающего белка или антитела, могут располагаться на одном и том же или на разных белках-мишенях. В одном воплощении антитело по настоящему изобретению может находиться в форме биспецифичного антитела, которое дополнительно содержит связь с носителем для доставки антитела через гематоэнцефалический барьер. Один способ доставки лекарственных средств через гематоэнцефалический барьер включает использование таких систем доставки в клетку как рецептор-опосредованный трансцитоз, такой как переносчик глюкозы, переносчик аминокислот, рецептор инсулина или рецептор трансферрина в клетке.

В данном описании изобретения "конъюгат" означает химерную молекулу антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном описании изобретения, с другой молекулой, в частности, осуществляющей транспорт через гематоэнцефалический барьер или с терапевтическим агентом, описанными ниже. В конъюгате антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связаны с другими молекулами посредством ковалентной связи или физического взаимодействия, такого как силы Ван дер Ваальса или гидрофобное взаимодействие, капсулирования, внедрения или комбинации перечисленного. В конъюгате по одному из воплощений антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть соединены пептидным линкером.

Данное изобретение также включает одну или более чем одну аминокислотную последовательность, по существу идентичную одной или более чем одной аминокислотной последовательности, раскрытой в данном описании изобретения. Идентичность последовательности по существу означает, что последовательность с вариацией сохраняет свойства, раскрытые в данном изобретении. В одном воплощении последовательность имеет примерно 90%, 95% или 99%-ную идентичность последовательности с раскрытой вариабельной областью тяжелой цепи. В одном воплощении последовательность имеет примерно 90%, 95% или 99%-ную идентичность последовательности с раскрытой вариабельной областью легкой цепи. Например, в случае варианта, демонстрирующего 90%, 95% или 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью антитела или антигенсвязывающего фрагмента, раскрытыми в настоящем изобретении, любая вариация последовательности происходит в каркасе вариабельной области, а не в CDR.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, специфически связывающиеся с альфа-синуклеином или его агрегатом, включают вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

В одном воплощении антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент может включать следующие последовательности CDR:

CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), выбранный из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6

CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), выбранный из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2 - 4 и SEQ ID NO: 7 - 8,

CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), выбранный из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9,

CDR1 легкой цепи (L-CDR1), выбранный из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 13,

CDR2 легкой цепи (L-CDR2), выбранный из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 14, и

CDR3 легкой цепи (L-CDR3), выбранный из аминокислотных последовательностей

SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 15.

Аминокислотные последовательности CDR1 - CDR3 тяжелой цепи и аминокислотные последовательности CDR1 - CDR3 легкой цепи приведены в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности CDR1 - CDR3 тяжелой цепи

ID клона	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VH_CDR1	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VH_CDR2	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VH_CDR3
ch11F11- VH	1	GFTFSDFYME	2	ASRNKANDYTTEYSASV KG	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VH1	1	GFTFSDFYME	3	AIRNKANDYTTEYAASV KG	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VH2	1	GFTFSDFYME	3	AIRNKANDYTTEYAASV KG	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VH3	1	GFTFSDFYME	3	AIRNKANDYTTEYADSV KG	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VH4	1	GFTFSDFYME	3	AIRNKANDYTTEYADSV KG	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VHv3	1	GFTFSDFYME	4	ATR NKANDYTTEYSASV KG	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 - VHv1mu 1 newmu	1	GFTFSDFYME	4	ATR NKANDYTTEYSASV KG	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VHv3 newmu	1	GFTFSDFYME	4	ATR NKANDYTTEYSASV KG	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VH-v1	1	GFTFSDFYME	2	ASRNKANDYTTEYSASV KG	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VH-v2	1	GFTFSDFYME	2	ASRNKANDYTTEYSASV KG	5	DAHGKPFAY

Hu11F11-VH-v3	1	GFTFSDFYME	2	ASRNKANDYTTTEYSASV KG	5	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH-v4	1	GFTFSDFYME	2	ASRNKANDYTTTEYSASV KG	5	DAHGKPFAY
ch3A9-VH	6	GFTFSSYAMS	7	TISNGGGYTYYPDSVKG	9	HITTVRPTKYFD Y
Hu3A9-VH1	6	GFTFSSYAMS	7	TISNGGGYTYYPDSVKG	9	HITTVRPTKYFD Y
Hu3A9-VH2	6	GFTFSSYAMS	8	TISNGGGYTYYADSVKG	9	HITTVRPTKYFD Y
Hu3A9-VH3	6	GFTFSSYAMS	7	TISNGGGYTYYPDSVKG	9	HITTVRPTKYFD Y
Hu3A9-VH4	6	GFTFSSYAMS	8	TISNGGGYTYYADSVKG	9	HITTVRPTKYFD Y
Hu3A9-VH-v1	6	GFTFSSYAMS	7	TISNGGGYTYYPDSVKG	9	HITTVRPTKYFD Y
Hu3A9-VH-v2	6	GFTFSSYAMS	7	TISNGGGYTYYPDSVKG	9	HITTVRPTKYFD Y

Таблица 2. Аминокислотные последовательности CDR1 - CDR3 легкой цепи

ID клона	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VL_CDR1	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VL_CDR1	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VL_CDR1
ch11F11-VL	10	KSSQSLLYSSNQKNYL A	11	WASTRES	12	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL1	10	KSSQSLLYSSNQKNYL A	11	WASTRES	12	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL2	10	KSSQSLLYSSNQKNYL A	11	WASTRES	12	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL3	10	KSSQSLLYSSNQKNYL A	11	WASTRES	12	QQYYSYPWT

Hu11F11-VL4	10	KSSQSLLYSSNQKNYL A	11	WASTRES	12	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL5	10	KSSQSLLYSSNQKNYL A	11	WASTRES	12	QQYYSYPWT
Hu11F11-VLv3 4c	10	KSSQSLLYSSNQKNYL A	11	WASTRES	12	QQYYSYPWT
ch3A9-VL	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL1	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL2	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL3	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL4	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL-v1	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL-v2	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL-v2	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT

В одном воплощении антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент может включать переменную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2 - 4, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Дополнительно, в одном воплощении, антитело к альфа-синуклеину или его

антигенсвязывающий фрагмент могут включать переменную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 7 - 8, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и переменную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

В другом воплощении антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать

каркасную область тяжелой цепи (H-FR1), расположенную на N-конце H-CDR1, содержащую полипептидный фрагмент, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16 - 17 и SEQ ID NO: 35 - 40,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), расположенную между H-CDR1 и H-CDR2, содержащую полипептидный фрагмент, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18 - 19 и SEQ ID NO: 41 - 44,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), расположенную между H-CDR2 и H-CDR3, содержащую полипептидный фрагмент, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20 - 31 и SEQ ID NO: 45 - 50,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), расположенную на C-конце H-CDR3, содержащую полипептидный фрагмент, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32 - 34 и SEQ ID NO: 51 - 52,

каркасную область легкой цепи (L-FR1), расположенную на N-конце L-CDR1, содержащую полипептидный фрагмент, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53 - 58 и SEQ ID NO: 71 - 77,

каркасную область легкой цепи (L-FR2), расположенную между L-CDR1 и L-CDR2, содержащую полипептидный фрагмент, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 59 - 61 и SEQ ID NO: 78 - 81,

каркасную область легкой цепи (L-FR3), расположенную между L-CDR2 и L-CDR3, содержащую полипептидный фрагмент, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 62 - 67 и SEQ ID NO: 82 - 88, и/или

каркасную область легкой цепи (L-FR4), расположенную на С-конце L-CDR3, содержащую полипептидный фрагмент, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 68 - 70 и SEQ ID NO: 89.

В качестве аминокислотных последовательностей, пригодных для каркасных областей в данном изобретении, последовательности каркасных областей тяжелой цепи приведены в Таблицах 3 и 4, а последовательности каркасных областей легкой цепи приведены в Таблицах 5 и 6.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности каркасных областей 1 - 2 тяжелой цепи

ID клона	SEQ ID NO	Последовательность VH-FR1	SEQ ID NO	Последовательность VH-FR2
ch11F11-VH	16	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH1	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	19	WVRQAPGKGGLEWIA
Hu11F11-VH2	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	19	WVRQAPGKGGLEWIA
Hu11F11-VH3	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	19	WVRQAPGKGGLEWIA
Hu11F11-VH4	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	19	WVRQAPGKGGLEWVA
Hu11F11-VHv3	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VHv1mu1newmu	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VHv3newmu	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v1	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA

VH-v2				
Hu11F11-VH-v3	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v4	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
ch3A9-VH	35	EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAAS	41	WVRQTPEKRLEWVA
Hu3A9-VH1	36	QVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS	42	WVRQAPGKGLEWVA
Hu3A9-VH2	37	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS	43	WVRQAPDKGLEWVA
Hu3A9-VH3	38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	42	WVRQAPGKGLEWVA
Hu3A9-VH4	38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	42	WVRQAPGKGLEWVA
Hu3A9-VH-v1	39	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS	44	WVRQTPEKGLEWVA
Hu3A9-VH-v2	40	EVQLLES GGGLVQPGGSLKLSAAS	44	WVRQTPEKGLEWVA

Таблица 4. Аминокислотные последовательности каркасных областей 3 - 4 тяжелой цепи

Клон	SEQ ID NO	Последовательность VH-FR3	SEQ ID NO	Последовательность в VH-FR4
ch11F11-VH	20	RFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDTAIYYCAR	32	WGQGTLVTVSA
Hu11F11-VH1	21	RFTVSRDTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR	33	WGQGTLVTVSS
Hu11F11-VH2	22	RFTISRDTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR	33	WGQGTLVTVSS
Hu11F11-VH3	23	RFTVSRDTSQNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	33	WGQGTLVTVSS

Hu11F11-VH4	24	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	33	WGQGTTLTVSS
Hu11F11-VHv3	25	RFTISRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR	34	WGQGTTLTVSS
Hu11F11-VHv1mu 1 newmu	26	RFTISRDTSQSSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR	34	WGQGTTLTVSS
Hu11F11-VHv3 newmu	27	RFTISRDTSQSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR	34	WGQGTTLTVSS
Hu11F11-VH-v1	28	RFTISRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR	34	WGQGTTLTVSS
Hu11F11-VH-v2	29	RFTVSRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR	34	WGQGTTLTVSS
Hu11F11-VH-v3	30	RFTISRDTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR	34	WGQGTTLTVSS
Hu11F11-VH-v4	31	RFTVSRDTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR	34	WGQGTTLTVSS
ch3A9-VH	45	RFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCAR	51	WGQGTTLTVSS
Hu3A9-VH1	46	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDSAMYYCAR	52	WGQGTTLTVSS
Hu3A9-VH2	47	RFTISRDNKNTLYLQMSSLKAEDSAVYYCAR	52	WGQGTTLTVSS
Hu3A9-VH3	48	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	52	WGQGTTLTVSS
Hu3A9-VH4	49	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	52	WGQGTTLTVSS
Hu3A9-VH-v1	50	RFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDAMYYCAR	51	WGQGTTLTVSS
Hu3A9-VH-v2	50	RFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDAMYYCAR	51	WGQGTTLTVSS

Таблица 5. Аминокислотные последовательности каркасных областей 1 - 2 легкой цепи

Клон	SEQ ID NO	Последовательность VH-FR1	SEQ ID NO	Последовательность VH-FR2
ch11F11-VL	53	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSC	59	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu11F11-VL1	54	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	60	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VL2	55	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTITC	60	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VL3	56	DIVMTQSPSSLAVSLGERATINC	60	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VL4	57	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC	61	WYQQKPGKAPKLLIY
Hu11F11-VL5	53	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSC	60	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VLv3 4c	58	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTMSC	59	WYQQKPGQSPKLLIY
ch3A9-VL	71	DIVMTQSPKFMSTSVGDRVSITC	78	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu3A9-VL1	72	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC	79	WYQQKPGKAPKLLIY
Hu3A9-VL2	73	DIVMTQSPSTLSASVGDRVITIC	80	AWYQQKPGKAPKLLIY
Hu3A9-VL3	74	DIVMTQSPATLSVSLGERATLSC	81	WYQQKPGQAPRLLIY
Hu3A9-VL4	75	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC	79	WYQQKPGKAPKLLIY
Hu3A9-VL-v1	76	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC	78	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu3A9-VL-v2	77	DIVMTQSPSSMSTSVGDRVITIC	78	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu3A9-VL-	77	DIVMTQSPSSMSTSVGDRVITIC	78	WYQQKPGQSPKLLIY

v2				
----	--	--	--	--

Таблица 6. Аминокислотные последовательности каркасных областей 3 - 4 легкой цепи

Клон	SEQ ID NO	Последовательность VH-FR3	SEQ ID NO	Последовательность VH-FR4
ch11F11-VL	62	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLAVYYC	68	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VL1	63	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC	69	FGGGTKVEIK
Hu11F11-VL2	64	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYC	68	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VL3	63	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC	68	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VL4	65	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	70	FGQGTKVEIK
Hu11F11-VL5	66	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYC	68	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VLv3 4c	67	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDVAVYYC	68	FGGGTKLEIK
ch3A9-VL	82	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFC	89	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL1	83	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	89	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL2	84	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFASYC	89	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL3	85	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	89	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL4	86	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	89	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL-v1	87	GVPDRFSGSGSGTDFTFTISSMQSEDIATYFC	89	FGAGTKLELR

Hu3A9-VL-v2	88	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSMQSEDLADYYC	89	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL-v2	88	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSMQSEDLADYYC	89	FGAGTKLELR

В другом воплощении антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2 - 4 и SEQ ID NO: 7 - 8, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9,

где вариабельная область тяжелой цепи дополнительно содержит каркасную область тяжелой цепи (H-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16 - 17 и SEQ ID NO: 35 - 40, каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18 - 19 и SEQ ID NO: 41 - 44, каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20 - 31 и SEQ ID NO: 45 - 50, и каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32 - 34 и SEQ ID NO: 51 - 52. Более конкретно, вариабельная область тяжелой цепи содержит каркасную область тяжелой цепи (H-FR1), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18, каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 29 - 31 и каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

Кроме того, антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент может включать вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 13, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 14, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную

последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 15,

где переменная область легкой цепи дополнительно содержит каркасную область легкой цепи (L-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53 - 58 и SEQ ID NO: 71 - 77, каркасную область легкой цепи (L-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 59 - 61 и SEQ ID NO: 78 - 81, каркасную область легкой цепи (L-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 62 - 67 и SEQ ID NO: 82 - 88 и каркасную область легкой цепи (L-FR4), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 68 - 70 и SEQ ID NO: 89. Более конкретно, переменная область легкой цепи содержит каркасную область легкой цепи (L-FR1), содержащую полипептидный фрагмент, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 58, каркасную область легкой цепи (L-FR2), содержащую полипептидный фрагмент, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 59, каркасную область легкой цепи (L-FR3), содержащую полипептидный фрагмент, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 67, и каркасную область легкой цепи (L-FR4), содержащую полипептидный фрагмент, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

Однако антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению не включает мышинное антитело или химерное антитело или их антигенсвязывающий фрагмент, включая антитело, состоящее из CDR1-CDR3 тяжелой цепи, состоящих из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2 и 5, CDR1 - CDR3 легкой цепи, состоящих из SEQ ID NO: 10, 11 и 12, каркасных областей 1 - 4 тяжелой цепи, состоящих из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 16, 18, 20 и 32, и каркасных областей 1 - 4 легкой цепи, состоящих из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 53, 59, 62 и 68. Кроме того, антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению не включают мышинное антитело, или химерное антитело, или их антигенсвязывающий фрагмент, включая антитело, состоящее из CDR1-CDR3 тяжелой цепи, состоящих из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 6, 7 и 9, CDR1 - CDR3 легкой цепи, состоящих из SEQ ID NO: 13, 14 и 15, каркасных областей 1 - 4 тяжелой цепи, состоящих из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 35, 41, 45 и 51, и каркасных

областей 1 - 4 легкой цепи, состоящих из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 71, 78, 82 и 89. В качестве конкретного примера, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению не включает антитело, состоящее из вариабельной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 90 (ch11F11-VH), и вариабельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 109 (ch11F11-VL), или антитело Ch3A9, состоящее из вариабельной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 102 (ch11F11-VH), и вариабельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 116 (ch11F11-VL).

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному воплощению настоящего изобретения могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2 - 4, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12,

где вариабельная область тяжелой цепи содержит каркасную область тяжелой цепи (H-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16 - 17, каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18 - 19, каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20 - 31 и каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32 - 34, и

где вариабельная область легкой цепи содержит каркасную область легкой цепи (L-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53 - 58, каркасную область легкой цепи (L-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 59 - 61, каркасную область легкой цепи (L-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 62 - 67 и каркасную область легкой цепи (L-FR4), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 68 - 70.

Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному воплощению настоящего изобретения содержит вариабельную область тяжелой

цепи, содержащую CDR1 - CDR3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 5, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 - CDR3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12, где переменная область тяжелой цепи содержит каркасную область тяжелой цепи (H-FR1), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18, каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 29 - 31, и каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 34, и переменная область легкой цепи содержит каркасную область легкой цепи (L-FR1), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 58, каркасную область легкой цепи (L-FR2), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 59, каркасную область легкой цепи (L-FR3), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 67, и каркасную область легкой цепи (L-FR4), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 34.

Антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному воплощению настоящего изобретения содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7 - 8, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15,

где переменная область тяжелой цепи содержит каркасную область тяжелой цепи (H-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 35 - 40, каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 41 - 44, каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 45 - 50, и каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 51 - 53, и

где переменная область легкой цепи содержит каркасную область легкой цепи (L-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 71 - 77, каркасную область легкой цепи (L-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 78 - 81, каркасную область легкой цепи (L-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 82 - 88 и каркасную область легкой цепи (L-FR4), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89.

В полноразмерных формах легкой цепи и тяжелой цепи переменная область и константная область соединены участком "J" длиной примерно 12 или более аминокислот, а тяжелая цепь также содержит участок "D" длиной примерно 10 или более аминокислот. См., например, *Fundamental Immunology*, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press. Как правило, переменные области пары легкая цепь и тяжелая цепь могут образовывать антигенсвязывающий участок.

Переменные области цепи иммуноглобулина обычно имеют одинаковую общую структуру и содержат относительно консервативную каркасную область (FR), соединенную тремя гиперпеременными участками, которые называются "областью или доменом, определяющим комплементарность" или CDR. CDR переменных областей каждой цепи, образующей пару тяжелая цепь/легкая цепь, обычно выстроены при помощи каркасных областей так, чтобы образовать структуру, специфически связывающуюся с определенным эпитопом белка-мишени (альфа-синуклеина). Эти элементы переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи природного происхождения обычно включены в следующем порядке от N-конца к C-концу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Положение аминокислотной последовательности, соответствующее каждому из этих элементов в переменной области, обозначено согласно системе нумерации Kabat (*Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest*), согласно описанию 1987 и 1991 годов, NIH, Bethesda, MD)) или Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia et al., 1989, *Nature* 342: 878-883.

Различные переменные области тяжелой цепи и переменные области легкой цепи, раскрытые в данном описании изобретения, приведены в Таблицах 7 и 8. Каждая из этих переменных областей может быть соединена с константной областью тяжелой цепи и с константной областью легкой цепи с образованием тяжелой цепи и легкой цепи интактных антител. Кроме того, полученные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи также можно комбинировать с образованием структуры полного антитела. Например,

антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент согласно данному изобретению может включать переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 90 - 101 или SEQ ID NO: 102 - 108, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 109 - 115 или SEQ ID NO: 116 - 123, и более конкретно, переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 90 - 101, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 109 - 115, или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 102 - 108, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 116 - 123.

В конкретном воплощении настоящего изобретения антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 98 - 101, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 115 (например Hu11F11_ (ver.1), Hu11F11_ (ver.2), Hu11F11_ (ver.3), Hu11F11_ (ver.4) и т.д.), или могут включать переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113 (например антитело Hu11F11_ (ABL2-4)).

Однако антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент не включает антитело, состоящее из переменной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 90 и переменной области легкой цепи с SEQ ID NO: 109, и антитело, состоящее из переменной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 102 и переменной области легкой цепи с SEQ ID NO: 116.

Аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно одному воплощению приведены в Таблицах 7 и 8.

Таблица 7. Переменная область тяжелой цепи

Клон	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
------	-----------------	-----------------------------------

ch11F11-VH	90	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWV RQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSRD TSQSILYLQMNALRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQ GTLVTVSA
Hu11F11- VH1	91	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWV RQAPGKGLEWIAAIRNKANDYTTEYAASVKGRFTVSR DTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAHGKPFAYW GQGLVTVSS
Hu11F11- VH2	92	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWV RQAPGKGLEWIAAIRNKANDYTTEYAASVKGRFTISR DTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAHGKPFAYWG QGLVTVSS
Hu11F11- VH3	93	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWV RQAPGKGLEWIAAIRNKANDYTTEYADSVKGRFTVSR DTSQNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAHGKPFAYW GQGLVTVSS
Hu11F11- VH4	94	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWV RQAPGKGLEWVAIRNKANDYTTEYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRDAHGKPFAYW GQGLVTVSS
Hu11F11- VHv3	95	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWV RQPPGKRLEWIAATR NKANDYTTEYSASVKGRFTISR DSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQ GTTVTVSS
Hu11F11- VHv1mu1 newmu	96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWV RQPPGKRLEWIAATR NKANDYTTEYSASVKGRFTISR TSQSSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAHGKPFAYWG QGTTVTVSS
Hu11F11- VHv3 newmu	97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWV RQPPGKRLEWIAATR NKANDYTTEYSASVKGRFTISR TSQSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQ GTTVTVSS
Hu11F11-VH-	98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWV

v1		RQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTISR DSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARD AHGKPFAYWG GTTVTVSS
Hu11F11-VH- v2	99	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCATSGFTFSDFYMEWV RQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTVSR DDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARD AHGKPFAYWG QGTTVTVSS
Hu11F11-VH- v3	100	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCATSGFTFSDFYMEWV RQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTISR TSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARD AHGKPFAYWG GTTVTVSS
Hu11F11-VH- v4	101	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCATSGFTFSDFYMEWV RQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTVSR DTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARD AHGKPFAYWG QGTTVTVSS
ch3A9-VH	102	EVQLQESGGGLVKP GGSRLKLSAASGFTFSSYAMSWV RQTPEKRLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMY YCARHITTVRPTKYFDY WGQTTLVSS
Hu3A9-VH1	103	QVQLLES GGGLVQP GGSRLRLS CAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNSLRSEDSAMY YCARHITTVRPTKYFDY WGQGLTVSS
Hu3A9-VH2	104	EVQLVQSGGGLVQP GGSRLRLS CAASGFTFSSYAMSWV RQAPDKGLEWVATISNGGGYTY YADSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMSSLKAEDSAVYY CARHITTVRPTKYFDY WGQGLTVSS
Hu3A9-VH3	105	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLS CAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARHITTVRPTKYFDY WGQGLTVSS
Hu3A9-VH4	106	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLS CAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVATISNGGGYTY YADSVKGRFTISADT

		SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARHITTVRPTKYFDY WGQGLTVTVSS
Hu3A9-VH- v1	107	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQTPEKGLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDN KNTLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHITTVRPTKYFDYW GQGTTTLTVSS
Hu3A9-VH- v2	108	EVQLLES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWV RQTPEKGLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDN KNTLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHITTVRPTKYFDYW GQGTTTLTVSS
ch9B11-VH	124	EVQLQES GGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWW RQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISR DDSQSM LYLQMN NLKTEDTAMYYCVRQDFDYWGQG TTLTVSS

Таблица 8. Варибельная область легкой цепи

Клон	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
ch11F11-VL	109	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNY LAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGT DFTLTISVKAEDLAVYYCQQYYSPWTFGGGKLEIK
Hu11F11-VL1	110	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYL AWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF TLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPWTFGGGKVEIK
Hu11F11-VL2	111	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTITCKSSQSLLYSSNQKNYL AWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF TLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSPWTFGGGKLEIK
Hu11F11-VL3	112	DIVMTQSPSSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYL AWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF TLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPWTFGGGKLEIK
Hu11F11-VL4	113	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQKNYL AWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDF

		TLTISSLQPEDFATYYCQQYYSYPWTFGQGTKVEIK
Hu11F11-VL5	114	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSVQAEDLAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIK
Hu11F11- VLv3 4c	115	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNY LAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGT DFTLTISSVKAEDVAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIK
ch3A9-VL	116	DIVMTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTTVAWYQ QKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS NMQSEDLADYFCQQYSNYPLTFGAGTKLELR
Hu3A9-VL1	117	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYSNYPLTFGGGTKLEIK
Hu3A9-VL2	118	DIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTEFTLTISS LQPDDFASYCQQYSNYPLTFGQGTKVEIK
Hu3A9-VL3	119	DIVMTQSPATLSVSLGERATLSCKASQNVGTTVAWYQ QKPGQAPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYCQQYSNYPLTFGGGTKVEIK
Hu3A9-VL4	120	DIQMTQSPSSLSA ¹ SVGDRVTITCKASQNVGTTVAWY QQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYSNYPLTFGQGTKVEIK
Hu3A9-VL-v1	121	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQ QKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTFTISS MQSEDIATYFCQQYSNYPLTFGQGTKLEIK
Hu3A9-VL-v2	122	DIVMTQSPSSMSTSVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQ QKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS MQSEDIADYYCQQYSNYPLTFGQGTKLEIK
Hu3A9-VL-v2	123	DIVMTQSPSSMSTSVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQ QKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS MQSEDLADYYCQQYSNYPLTFGQGTKLEIK
ch9B11-VL	125	DIVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLH WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT

		LKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPLTFGAGTKLEQKR
--	--	--------------------------------------

Кроме того, приведенные в качестве примера антитела, содержащие комбинацию варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи и константной области антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно одному воплощению, представлены в Таблице 9.

Таблица 9

е	Цепь	Аминокислотная последовательность
hu11F11(ver.1))	тяжелая (SEQ ID NO: 127)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWV RQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTISR DDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
	легкая (SEQ ID NO: 128)	DIVMTQSPSSLAIVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKN YLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSG TDFTLTISSVKAEDVAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL TLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hu11F11(ver.2))	тяжелая (SEQ ID NO: 129)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWV RQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTVSR DDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL

		SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
	легкая (SEQ ID NO: 130)	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKN YLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSG TDFTLTISSVKAEDVAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hu11F11(ver.3)	тяжелая (SEQ ID NO: 131)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWV RQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTISR DTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDAGHKPFAYW GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
	легкая (SEQ ID NO: 132)	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKN YLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSG TDFTLTISSVKAEDVAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

hu11F11(ver.4)	тяжелая (SEQ ID NO: 133	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWV RQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTVSR DTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
	легкая (SEQ ID NO: 134	DIVMTQSPSSLAIVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKN YLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSG TDFTLTISSVKAEDVAVYYCQQYYSPWTFGGGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hu11F11(H2L 4)	тяжелая (SEQ ID NO: 135	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEW VRQAPGKGLEWIAAIRNKANDYTTEYAASVKGRFTIS RDTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAHGKPFAY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGK
	легкая	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKSSQSLLYSSNQKNY

	(SEQ ID NO: 136)	LAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSPWTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLK KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hu3A9(VH5/L 3)	тяжелая (SEQ ID NO: 137)	EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSW VRQTPEKGLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDN NAKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCARHITTVRPTKYF DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
	легкая (SEQ ID NO: 138)	DIVMTQSPATLSVSLGERATLSCKASQNVGTTVAWY QQKPGQAPRLLIYSASNRYSYTGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYSNYPLTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLKADY EKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Чтобы вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи, описанные в данном описании изобретения, образовали тяжелую цепь и легкую цепь интактного антитела, каждая вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи может быть связана с константной областью тяжелой цепи и константной областью легкой цепи. Каждая из тяжелой цепи и легкой цепи, полученных, как описано выше, может быть надлежащим образом скомбинирована с образованием комбинации тяжелая цепь-легкая цепь, и комбинация тяжелая цепь-легкая цепь может образовать мультимер (например димер для антитела IgG типа), в результате чего образуется

структура интактного антитела.

Константная область может быть надлежащим образом выбрана из константных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов (например иммуноглобулинов человека). Например, константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область тяжелой цепи IgG1, константную область тяжелой цепи IgG3 или константную область тяжелой цепи IgG4, и константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа-цепи или константную область лямбда-цепи, но не ограничена ими. Другие типы константных областей или модифицированных константных областей могут быть надлежащим образом выбраны и использованы для стабильности антитела, возможности их получения, аффинности к антигену и/или других желаемых характеристик, которые ясны специалистам в данной области техники.

В другом воплощении каждая из переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи, раскрытых в Таблицах 7 и 8, могут быть свободно скомбинированы друг с другом с образованием различных антител и соединены в одну цепь с получением одноцепочечных антител, таких как scFv.

Антитело, описанное в данном описании изобретения, может иметь общие специфические области или последовательности с другим антителом, описанным в данном описании изобретения. В одном воплощении антитело может иметь общую константную область с другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В другом воплощении оно может иметь общую область Fc.

В одном воплощении антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению также охватывает моноклональное антитело и поликлональное антитело. В другом воплощении антитело к альфа-синуклеину может быть человеческим антителом, гуманизированным антителом, химерным антителом или антителом животного происхождения. В другом воплощении антитело к альфа-синуклеину может быть получено рекомбинантным способом или синтезировано химически.

Антигенсвязывающие фрагменты или фрагменты антител, описанные в данном изобретении, могут представлять собой по меньшей мере фрагмент, выбранный из группы, состоящей из одноцепочечных молекул антител scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab', F(ab')₂, мини-антитела, диатела, scFv и т.п.

В другом воплощении антитело, предложенное в данном изобретении, может представлять собой гуманизированное антитело или человеческое антитело и может быть разных изотипов (например IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE или IgD), в частности IgG1-,

IgG2-, IgG3- или IgG4-типа, например IgG1- или IgG2- типа.

В другом воплощении антитело к альфа-синуклеину может содержать только тяжелую цепь или легкую цепь, описанные выше. В другом воплощении антитело к альфа-синуклеину имеет только вариабельную область тяжелой цепи или только вариабельную область легкой цепи.

Специалисту в данной области техники понятно, что, когда антитело содержит один или более чем один CDR, описанных в данном описании изобретения, каждый описанный здесь CDR может быть выбран независимо от других и скомбинирован. Таким образом, антитела могут быть получены так, чтобы включать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR, выбранных независимо. Кроме того, специалисту в данной области техники очевидно, что, когда CDR выбирают для комбинирования, один и тот же тип CDR не используют повторно, и, например, обычно не получают антитело, включающее две области CDR-H2.

В одном воплощении антитело может представлять собой моноклональное антитело или поликлональное антитело. Описанные в данном описании изобретения антитела включают моноклональные антитела, связывающиеся с альфа-синуклеином. Моноклональные антитела могут быть получены с использованием любого известного в данной области техники способа. Например, они могут быть получены путем иммортализации клеток селезенки, взятых у иммунизированных трансгенных животных. Моноклональные антитела, секретируемые клетками гибридомы, могут быть очищены с использованием методик, известных в данной области техники.

В других воплощениях антитело может представлять собой антитело животного происхождения (например мышинное антитело и т.д.), химерное антитело (например химерное антитело мышцы-человека), гуманизированное антитело или антитело человека. Антитело также может быть модифицировано различными способами для разных целей. Также предложены химерные антитела и гуманизированные антитела. Химерные антитела представляют собой антитела, в которых полипептидные фрагменты происходят из разных антител и ковалентно связаны с образованием иммунологически функциональной легкой цепи, тяжелой цепи или их фрагмента.

В таком моноклональном антителе определенный аминокислотный остаток, обычно входящий в состав части антитела, не участвующей в распознавании антигена, модифицируют так, чтобы он был гомологичен соответствующему остатку изоформа, соответствующего человеческому антителу. Гуманизацию можно осуществлять различными известными способами, например путем замены по меньшей мере части

вариабельной области грызуна соответствующей областью человеческого антитела (патенты US 5585089 и 5693762; Jones et al., Nature 1986, 321: 522-525; Riechmann et al., Nature 1988, 332: 323-27; Verhoeyen et al., Science 1988, 239: 1534-1536).

Полностью человеческое антитело может быть получено путем иммунизации трансгенного животного (обычно мыши), которое может продуцировать человеческое антитело из-за отсутствия продуцирования эндогенного иммуноглобулина. Полностью человеческое антитело также может быть получено с использованием библиотеки фагового дисплея. Если используют полностью человеческие антитела, это может минимизировать иммуногенные и аллергические реакции, которые могут быть вызваны введением людям моноклонального антитела (mAb) мыши или мышинового происхождения.

В одном воплощении человеческие антитела к альфа-синуклеину по настоящему изобретению выбирают методом фагового дисплея. Моноклональные фаговые антитела, специфичные к альфа-синуклеину, выбранные методом фагового скрининга, конвертируют в полноразмерную форму IgG, используя рекомбинантный метод. Для рекомбинантного получения антител к альфа-синуклеину устанавливают последовательность каждого моноклонального фагового антитела. После соединения последовательности вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью константной области тяжелой цепи и последовательности вариабельной области легкой цепи с последовательностью константной области легкой цепи в полученных последовательностях, аминокислотные последовательности конвертируют в нуклеотидную последовательность с использованием метода оптимизации кодонов. После клонирования полученных нуклеотидных последовательностей в векторы, используемые для культуры клеток животных, осуществляют трансформацию клеток-хозяев, используемых для продуцирования белка, таких как клетки СНО (яичники китайского хомячка), и культивируют. Для очистки антител, содержащихся в культуральной среде, рекомбинантные антитела выделяют и очищают с использованием такого метода очистки, как аффинная хроматография.

В другом воплощении антитело может иметь типичную структуру антитела природного происхождения или модифицированную структуру.

Антитело, имеющее типичную структуру, может иметь мультимерную структуру, включающую структурные единицы, содержащие две разные полипептидные цепи (т.е. тяжелая цепь и легкая цепь). Эти две разные полипептидные цепи включают одну полноразмерную легкую цепь (примерно 25 кДа) и одну полноразмерную тяжелую цепь

(примерно 50 - 70 кДа). Каждая цепь демонстрирует характерный паттерн укладки и состоит из нескольких доменов иммуноглобулинов, состоящих из примерно 90 - 110 аминокислот. Эти домены представляют собой основные единицы, составляющие полипептид антитела. Амино-концевая часть каждой цепи обычно содержит участок, называемый вариабельной областью, или V-областью, который является участком, распознающим антиген. Карбокси-концевая часть является эволюционно более консервативной, чем амино-концевая, и содержит участок, называемый константной областью, или C-областью. Легкие цепи человека обычно подразделяют на легкие цепи каппа(κ) или лямбда(λ), и они содержат одну вариабельную область и одну константную область. Тяжелые цепи обычно подразделяют на цепи мю(μ), дельта(δ), гамма(γ), альфа(α) или эпсилон(ϵ), и они определяются как изоотипы IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG включает IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и неограниченное количество многочисленных подтипов, без ограничения ими. Константная область тяжелой цепи обычно включает один или более чем один домен, демонстрирующий эффекторную функцию. Число доменов в константной области тяжелой цепи различается в зависимости от изоотипов. Тяжелая цепь IgG, например, содержит 3 домена C-области, известные как CH1, CH2 и CH3 соответственно. Антитело, описанное в данном описании изобретения, может относиться к любому из указанных изоотипов и подтипов. В одном воплощении антитело по настоящему изобретению относится к подтипу IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 или IgG4.

Антитело, описанное в данном описании изобретения, также охватывает вариант антитела, описанного в данном описании изобретения. Например, часть антигена содержит консервативные аминокислотные замены одного или более остатков в тяжелой или легкой цепи, вариабельной области или последовательности CDR, описанных выше. Специалист в данной области техники определит подходящий вариант полипептида, описанного в данном описании изобретения, используя известные способы. Специалист в данной области техники найдет область, в которой можно осуществить замену без ликвидации активности белка, нацеливаясь на область, которая не считается важной для активности полипептида.

В данном изобретении также предложено производное антитела, раскрытого в данном описании изобретения. Дериватизированное антитело или его фрагмент может включать любую молекулу или вещество, обеспечивающие антителу или его фрагменту желаемые свойства, например увеличенное время полужизни при определенных применениях. Дериватизированное антитело может содержать, например, детектируемый

(или меченый) остаток (например радиоактивную, колориметрическую, антигенную или ферментную молекулу), детектируемую гранулу (например магнитную или электронно-плотную (например золотую) гранулу) или молекулу, связывающуюся с другими молекулами (например биотин или стрептавидин), остаток терапевтического или диагностического назначения (например радиоактивный, цитотоксический или фармацевтически активный остаток) или молекулу, увеличивающую пригодность антитела для конкретных применений (например для введения субъекту, такому как человек, или для других применений *in vivo* или *in vitro*).

Другое воплощения относится к димеру, содержащему два слитых белка, в которых альфа-синуклеин-связывающий белок слит с Fc-областью антитела. Например, димер может быть получен путем встраивания слитого гена, кодирующего слитый белок, в подходящий экспрессионный вектор, экспрессии слитого гена в клетке-хозяине, трансформированной рекомбинантным экспрессионным вектором, и обеспечение возможности объединения экспрессированного слитого белка аналогичным образом с молекулой антитела, при сборке димера образуется межцепочечная дисульфидная связь между остатками Fc.

Термин "Fc-полипептид". используемый в данном описании изобретения, представляет собой полипептид, происходящий из Fc-области антитела, и включает дикий тип или мутантный тип. Также включена расщепленная форма полипептида, содержащая шарнирный участок, облегчающий димеризацию. Слитый белок, содержащий Fc, или образованный из него олигомер имеют преимущество легкого разделения, которое осуществляют посредством аффинной хроматографии с использованием колонок с белком А или с белком G.

В другом аспекте настоящего изобретения также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. В другом аспекте настоящего изобретения также предложен экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по настоящему изобретению. В другом аспекте настоящего изобретения также предложена прокариотическая или эукариотическая клетка или линия клеток, трансформированные экспрессионным вектором по настоящему изобретению.

В другом воплощении настоящего изобретения дополнительно предложен способ получения выделенного антитела, специфически связывающегося с альфа-синуклеином, или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки по

настоящему изобретению в условиях, обеспечивающих достаточную экспрессию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клеточной линии.

Кроме того, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном описании изобретения, имеют различные полезные применения. Например, их можно применять в анализе специфического связывания, в аффинной очистке альфа-синуклеина или в способе скрининга для исследования антагонистов альфа-синуклеина и т.п. В одном воплощении антитело и его антигенсвязывающий фрагмент могут быть полезными для ингибирования образования агрегатов альфа-синуклеина, удаления агрегатов альфа-синуклеина из нервной системы, подавления межклеточного перемещения агрегатов альфа-синуклеина и удаления или уменьшения количества агрегатов альфа-синуклеина за пределами клетки посредством фагоцитоза агрегатов альфа-синуклеина.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут применяться для обнаружения и/или лечения различных заболеваний, ассоциированных с альфа-синуклеином или агрегатом альфа-синуклеина. Например, антитело и его антигенсвязывающий фрагмент могут быть полезными для обнаружения, лечения, облегчения или улучшения заболеваний, симптомов или нарушений, ассоциированных с агрегатами альфа-синуклеина. Кроме того, антитела согласно данному описанию можно применять для диагностики различных заболеваний или симптомов, ассоциированных с альфа-синуклеином или агрегатами альфа-синуклеина, или для обнаружения наличия или отсутствия альфа-синуклеина или агрегатов альфа-синуклеина.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обладают по меньшей мере одним свойством, выбранным из группы, состоящей из: (1) специфического связывания с альфа-синуклеином или агрегатом альфа-синуклеина, (2) снижения уровня альфа-синуклеина или агрегата альфа-синуклеина в нервной системе субъекта, (3) снижения или ингибирования межклеточного переноса альфа-синуклеина или агрегатов альфа-синуклеина между нервными клетками и (4) повышения фагоцитозного захвата альфа-синуклеина или агрегатов альфа-синуклеина в нервных клетках. Предпочтительно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обладают всеми свойствами (1)-(4).

Одно воплощение настоящего изобретения относится к композиции для предупреждения, облегчения, улучшения или лечения синуклеинопатий, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные специфически связываться с

альфа-синуклеином, особенно с агрегатом альфа-синуклеина.

Одно воплощение настоящего изобретения относится к способу предупреждения, облегчения, улучшения или лечения синуклеинопатий, включающему стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способных специфически связываться с альфа-синуклеином, в частности с агрегатом альфа-синуклеина. Вводимое количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может представлять собой количество, эффективное для снижения уровня альфа-синуклеина, в частности агрегата альфа-синуклеина, в нервной системе, более конкретно, в межклеточном пространстве нервных клеток в нервной системе субъекта.

Одно воплощение настоящего изобретения относится к способу снижения уровня альфа-синуклеина, в частности агрегата альфа-синуклеина, в нервной системе, более конкретно в межклеточном пространстве нервных клеток в нервной системе субъекта, или к применению в снижении уровня альфа-синуклеина, в частности агрегата альфа-синуклеина, в межклеточном пространстве нервных клеток в нервной системе, включающему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные специфически связываться с альфа-синуклеином, в частности с агрегатом альфа-синуклеина.

В другом аспекте настоящего изобретения предложены композиция или набор, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. Композиция может быть предложена для фармацевтического применения или диагностического применения, и фармацевтическая композиция может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент, а диагностическая композиция может дополнительно включать агент, необходимый для диагностики или обнаружения.

В данном изобретении термин "гематоэнцефалический барьер" или BBB представляет собой барьер, образованный плотными контактами в мембране эндотелия капилляров головного мозга, который существует между головным мозгом и позвоночным столбом и окружающей их кровеносной системой. Этот барьер такой прочный, что он ограничивает прохождение в головной мозг молекул с низкой молекулярной массой примерно 60 Да. Гематоэнцефалический барьер головного мозга, барьер между кровеносными сосудами и спинным мозгом и гемато-ретикулярный барьер представляют собой непрерывные капиллярные барьеры в центральной нервной системе, обычно упоминаемые как BBB.

В данном изобретении "переносчик через гематоэнцефалический барьер" может проходить через гематоэнцефалический барьер и доставлять антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, например включать белок, включая пептид и полипептид, нуклеиновую кислоту, антитело или низкомолекулярное соединение.

В данном описании изобретения "терапевтический агент" означает молекулу, которую необходимо вводить субъекту для желаемого терапевтического эффекта. Субъект включает млекопитающих, не являющихся человеком, таких как приматы, или человека. Примеры терапевтического агента включают белок, включая пептид и полипептид, нуклеиновую кислоту, антитело или низкомолекулярное соединение. В другом аспекте терапевтический агент, связываясь с антителом по настоящему изобретению, может применяться в качестве терапевтического агента при заболеваниях, ассоциированных с агрегатом альфа-синуклеина.

Хотя точные механизмы, посредством которых накопление альфа-синуклеина при синуклеинопатиях индуцирует типичные проявления нейродегенерации и присущие синуклеинопатиям симптомы, до конца не изучены, последние исследования показали, что аномальное образование и накопление агрегатов альфа-синуклеина связано с возникновением синуклеинопатий и прогрессированием дегенеративных явлений.

В данном изобретении термин "альфа-синуклеинопатии" включает все нейродегенеративные нарушения, характеризующиеся патологическими агрегатами синуклеина. Болезнь Паркинсона, болезнь Паркинсона с деменцией (PDD), деменция с тельцами Леви (DLB), болезнь телец Леви, деменцию, сопровождающуюся тельцами Леви, синдром Паркинсона с деменцией, множественную системную атрофию (MSA), множественную атрофию нервной системы и нейродегенерацию I типа с накоплением железа в мозге (NBIA I типа) обозначают общим термином синуклеинопатии. Помимо этого, агрегация альфа-синуклеина также обнаруживается вторично при болезни Альцгеймера (Kim et al. *Alzheimer's Research & Therapy* 2014, 6:73).

Синуклеинопатии представляют собой гетерогенную группу нейродегенеративных нарушений, имеющих общие патологические признаки: в невропатических аспектах характерные повреждения могут быть обнаружены в виде аномальных агрегатов альфа-синуклеина в выбранных группах нейронов и олигодендроцитов. Альфа-синуклеин (ранее известный как PARK1 и PARK4) представляет собой белок, состоящий из 140 аминокислот, который широко экспрессируется в неокортексе, гиппокампе, зубчатой

извилине, нейросфере заднего мозга, полосатом теле, таламусе и мозжечке. Альфа-синуклеин также экспрессируется на высоком уровне в гемопоэтических клетках, включая моноциты, такие как В-клетки, Т-клетки, НК-клетки и тромбоциты. Точная роль в этих клетках неизвестна, но связана с дифференцировкой мегакариоцитов (предшественники тромбоцитов).

Антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению, специфично распознающее агрегат альфа-синуклеина с высокой аффинностью, может быть полезным для диагностики или обнаружения этих заболеваний. Кроме того, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению, специфично распознающее агрегаты альфа-синуклеина, ингибирует образование агрегатов альфа-синуклеина, разрушает агрегаты альфа-синуклеина или ингибирует межклеточный перенос агрегатов и поэтому может эффективно применяться для лечения синуклеинопатий, таких как болезнь Паркинсона.

В данном изобретении "заболевание, связанное с агрегатами альфа-синуклеина" представляет собой группу нейродегенеративных заболеваний, называемых синуклеинопатиями, при которых агрегаты альфа-синуклеина обнаруживаются в очагах поражения, включая нейроны и глию, которые имеют такие характеристики как дегенерация дофаминовой системы, изменение двигательной функции, когнитивное нарушение и образование телец Леви и/или нейритов Леви (Kim et al. *Alzheimer's Research & Therapy* 2014, 6:73; McKeith et al., *Neurology* (1996) 47:1113-24). Эти заболевания включают болезнь Паркинсона, болезнь Паркинсона с деменцией, деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви, комбинированную болезнь Паркинсона и Альцгеймера, множественную системную атрофию и многие другие нейроаксональные заболевания, без ограничения перечисленным. В одном воплощении антитело по настоящему изобретению эффективно применяют для лечения болезни Паркинсона.

В данном описании "эффективная доза" обычно означает количество, достаточное для снижения тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, в частности заболевания, связанного с α -синуклеином, устранения симптомов заболевания, в частности заболевания, связанного с альфа-синуклеином, и/или основополагающей причины возникновения заболевания, или для предупреждения возникновения симптомов заболевания, в частности заболевания, связанного с альфа-синуклеином, и/или основополагающей причины, и/или для улучшения или коррекции повреждений вследствие заболевания, в частности заболевания, связанного с α -синуклеином. В

некоторых воплощениях эффективная доза представляет собой терапевтически эффективную дозу или профилактически эффективную дозу. "Терапевтически эффективная доза" представляет собой количество, достаточное для лечения заболевания, в частности симптомов или состояний, связанных с α -синуклеином, или для предупреждения, задерживания заболевания, в частности симптомов или состояний, ассоциированных с α -синуклеином, или реверсирования их развития. "Профилактически эффективная доза" представляет собой количество для предупреждения или задерживания возникновения или рецидива заболевания, в частности заболевания, связанного с альфа-синуклеином, или симптомов заболевания, в частности заболевания, связанного с α -синуклеином, и снижения его вероятности. Полный терапевтический или профилактический эффект может быть достигнут скорее при многократном введении дозы, чем при однократном введении дозы. Таким образом, терапевтически или профилактически эффективная доза может быть доставлена посредством одного или более введений.

В другом аспекте изобретения предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению или содержащей их композиции для лечения синуклеинопатий у субъекта, страдающего синуклеинопатий. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или содержащая их композиция ингибируют межклеточный перенос агрегатов альфа-синуклеина, разрушают агрегаты альфа-синуклеина, ингибируют образование агрегатов альфа-синуклеина или улучшают фагоцитоз агрегатов альфа-синуклеина микроглией субъекта или в головном мозге субъекта.

В данном описании термин "лечение" означает все действия, включающие облегчение или устранение заболевания или симптома или болезненного состояния, включая уменьшение, ослабление, облегчение или устранение заболевания или симптома заболевания, придание пациенту способности противостоять симптому или болезненному состоянию, замедления скорости ухудшения заболевания, или симптома, или патологического состояния. Термин "субъект" или "пациент" включает человека или пациента-человека.

Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективную дозу антитела и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, растворитель, эмульгатор, консервант и/или добавку. Кроме того, например, включен способ лечения онкологического пациента путем введения такой фармацевтической

композиции. Термин "пациент" включает пациента-человека, заболевание которого связано с α -синуклеином. После составления фармацевтические композиции можно хранить в стерильном флаконе в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого, кристаллического или дегидратированного либо лиофилизированного порошка. Такие композиции можно хранить в форме, готовой к применению, или в форме, приготавливаемой непосредственно перед введением (например лиофилизированными).

В пути введения фармацевтической композиции можно использовать известные способы, например пероральное введение; внутривенное, внутрибрюшинное, интрацеребральное (интерстициальное), внутрижелудочковое, внутримышечное, внутриглазное, внутриартериальное, интрапортальное или внутриочаговое введение; посредством системы с пролонгированным высвобождением или имплантированного устройства. В конкретном воплощении композицию можно непрерывно вводить посредством болюсной инъекции, или инъекции, или имплантированного устройства.

Фармацевтическую композицию или набор можно применять для лечения синуклеинопатий, например болезни Паркинсона, болезни Паркинсона с деменцией, деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви, комбинированной болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера и множественной системной атрофии.

В других аспектах настоящего изобретения предложен способ лечения синуклеинопатии у субъекта или изменения концентрации агрегатов альфа-синуклеина у субъекта, включающий стадию введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению или содержащей их композиции субъекту, который нуждается в лечении α -синуклеинопатии и/или изменении концентрации агрегатов альфа-синуклеина.

В одном воплощении антитело по настоящему изобретению можно применять в связанной с переносчиком форме для переноса через гематоэнцефалический барьер (БВБ). Описано множество способов доставки лекарственных средств через гематоэнцефалический барьер. Например, существует способ преодоления осмотического давления БВБ при помощи такого метода как брадикинин или HIGU (высокоинтенсивный фокусированный ультразвук). Они также включают применение клеточной системы доставки, например переноса глюкозы и аминокислот, а также рецепторно опосредованный транцитоз инсулина или трансферрина, либо блокирование эффлюксного переносчика гликопротеинов.

В другом воплощении антитела по настоящему изобретению можно применять в комбинации с другими терапевтическими агентами для лечения заболеваний, ассоциированных с агрегатами альфа-синуклеина. Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективную дозу антитела и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, растворитель, солубилизатор, консервант и/или вспомогательное вещество.

Приемлемое для композиции вещество является нетоксичным для реципиента в используемом объеме и концентрации. В конкретном воплощении предложена фармацевтическая композиция, которая содержит терапевтически эффективную дозу антитела к альфа-синуклеину человека. В конкретном воплощении приемлемое вещество композиции предпочтительно является нетоксичным в используемом объеме и концентрации. Например, в одном воплощении фармацевтическая композиция может содержать определенное вещество композиции для обеспечения pH, осмоляльности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, модификации, поддержания или сохранения абсорбции или проникновения.

В конкретном воплощении оптимальная фармацевтическая композиция может быть определена специалистом в данной области техники в зависимости, например, от предполагаемого способа введения, способа доставки и способности к нацеливанию (см. выше REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES). В конкретном воплощении данная композиция может влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и клиренс *in vivo* антитела, описанного в данном описании изобретения. В конкретном воплощении основная несущая среда или носитель в фармацевтической композиции могут быть водными или неводными. Например, в композиции для парентерального введения подходящая несущая среда или носитель могут представлять собой воду для инъекций, физиологический раствор с добавлением других стандартных веществ. Кроме того, в конкретном воплощении антитело к альфа-синуклеину человека может быть приготовлено лиофилизированным с использованием подходящего эксципиента, например сахарозы.

Фармацевтическую композицию можно доставлять парентерально, и терапевтическая композиция может содержать белок, связывающий альфа-синуклеин человека, в фармацевтически приемлемой несущей среде или быть представлена в форме апирогенного водного раствора, подходящего для парентерального введения.

После приготовления фармацевтическую композицию можно хранить в стерильном флаконе в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристаллического, или дегидратированного, или лиофилизированного порошка. Такие композиции можно хранить в форме, готовой к применению, или в форме, подготавливаемой непосредственно перед введением (например в лиофилизированной). Также предложен набор для приготовления доз препарата для однократного введения. Набор содержит первый контейнер, в котором находится высушенный белок, и второй контейнер, в котором содержится водная композиция. На частоту введения могут влиять фармакокинетические параметры используемой композиции антитела к альфа-синуклеину человека.

Кроме того, может быть предпочтительным применять фармацевтическую композицию, содержащую антитело к альфа-синуклеину человека, *ex vivo*. В таком случае клетка, ткань или орган, извлеченные у пациента, могут подвергаться воздействию фармацевтической композиции, содержащей антитело к альфа-синуклеину человека, после чего быть имплантированы пациенту. В частности, антитело к альфа-синуклеину человека может быть доставлено путем имплантации конкретной клетки, генетически сконструированной с использованием способов, описанных в данном описании изобретения, для экспрессии и секреции полипептида.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен способ обнаружения агрегата альфа-синуклеина в биологическом образце, включающий предоставление антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению и приведение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в контакт с биологическим образцом, в котором обнаруживают агрегат альфа-синуклеина. Биологические образцы включают различные образцы, в которых необходимо обнаружение агрегата альфа-синуклеина, включая, например, цереброспинальную жидкость, кровь, включая плазму, или мочу, а также клетки, ткани или органы. Способ может быть осуществлен *in vitro* или *in vivo*. Визуализация *in vivo* может быть осуществлена, например, с использованием позитронно-эмиссионной томографии (PET), однофотонной эмиссионной томографии (SPECT), оптической визуализации в ближнем инфракрасном диапазоне (NIR) или магниторезонансной визуализации (MRI).

В другом воплощении настоящего изобретения предложен способ диагностирования синуклеинопатии у субъекта, которому необходимо диагностировать синуклеинопатию, включающий измерение/определение концентрации или межклеточной

локализации агрегата альфа-синуклеина у субъекта с использованием любого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению и сравнение концентрации или межклеточной локализации агрегата альфа-синуклеина, определенных у субъекта, с контрольным образцом, где сходство или различие по сравнению с результатом контрольного образца указывает на субъекта с α -синуклеинопатией. Контрольная группа может представлять собой нормальный образец или образец пациента с α -синуклеинопатией. Для обнаружения или диагностического применения антитело обычно может быть меченым детектируемым метящим веществом.

Антитело, описанное в данном описании изобретения, можно успешно использовать для обнаружения, диагностирования или мониторинга заболеваний или симптомов, ассоциированных с альфа-синуклеином. В одном воплощении способ по настоящему изобретению представляет собой способ диагностирования синуклеинопатии у субъекта, которому необходимо выполнить диагностику синуклеинопатии, включающий определение концентрации или межклеточной локализации агрегата альфа-синуклеина у субъекта с использованием антитела и антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению и сравнение концентрации или межклеточной локализации агрегата альфа-синуклеина, определенных у субъекта, с результатом в контрольном образце, где сходство или различие по сравнению с результатом контрольного образца указывает на то, что субъект страдает синуклеинопатией.

В данном способе субъект включает пациентов, у которых отсутствуют симптомы или у которых симптомы еще не возникли. В одном воплощении контрольной группой может быть пациент с синуклеинопатией, включая болезнь Паркинсона (PD), деменцию с тельцами Леви (DLB) или множественную системную атрофию (MSA), и сходство с контрольной группой на стадии сравнения позволяет диагностировать, что субъект является пациентом с синуклеинопатией. В другом воплощении, когда контрольной группой является образец взятый у нормального субъекта, различие с контрольной группой на стадии сравнения, например увеличение концентрации агрегатов, позволяет диагностировать, что субъект является пациентом с синуклеинопатией. В другом воплощении субъект и контроль могут иметь сопоставимый возраст. Способ может быть осуществлен *in vivo* или в биологическом образце, взятом у субъекта, таком как образцы крови, цереброспинальной жидкости (CSF) или мочи.

Для диагностического применения антитело обычно может быть меченым детектируемым метящим веществом. Подходящие метящие вещества включают

радиоактивный изотоп или радионуклид (например ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентное вещество (например FITC (флуоресцеин изотиоцианат), родамин, лантаноидный флуоресцентный субстрат), фермент (например пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентную группу, биотинилированную группу или полипептидный эпитоп, распознаваемый вторичным репортером (например последовательность лейциновой застёжки, сайт связывания вторичного антитела, домен связывания металлов, эпитопная метка), без ограничения ими.

В другом аспекте антитело по настоящему изобретению может применяться для идентификации ткани, содержащей агрегат альфа-синуклеина. В конкретном воплощении антитело мечено метящим веществом, и определяют связывание меченого антитела с агрегатом альфа-синуклеина. В одном воплощении связывание антитела с агрегатом альфа-синуклеина определяют *in vivo*.

В другом аспекте настоящего изобретения раскрыто обнаружение или выбор тестовых веществ, конкурирующих с антителом по настоящему изобретению за связывание с агрегатом альфа-синуклеина. Например, включена стадия определения количества несвязанных антител в растворе, содержащем агрегат альфа-синуклеина в присутствии или в отсутствие тестовых веществ.

Повышенная концентрация свободного антитела, т.е. антитела, которое не связано с агрегатом альфа-синуклеина, может указывать на то, что исследуемое вещество может конкурировать с антителом за связывание с альфа-синуклеином. В одном воплощении антитело мечено метящей группой. Альтернативно, тестовые вещества являются мечеными, а количество свободных тестовых веществ отслеживают по наличию или отсутствию антитела.

Кроме того, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном описании изобретения, имеют различные полезные применения. Например, его можно использовать для анализа специфичности связывания, для аффинной очистки альфа-синуклеина или в способе скрининга для исследования антагонистов альфа-синуклеина и т.п.

Антитела, описанные в данном описании изобретения пригодны для обнаружения в биологическом образце альфа-синуклеина, в частности агрегатов альфа-синуклеина, таких как тельца Леви, и идентификации клеток или тканей, содержащих агрегаты альфа-синуклеина. Например, антитело к альфа-синуклеину можно применять для диагностики, например для обнаружения и/или количественного анализа агрегатов альфа-синуклеина в

биологическом образце, таком как кровь, включая сыворотку, цереброспинальная жидкость (CSF) или моча, ткань или клетки, и диагностирования α -синуклеинопатии на этом основании.

ТЕХНИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Антитела, описанные в данном описании изобретения, предпочтительно связываются с альфа-синуклеином, в частности с агрегатами альфа-синуклеина, с высокой аффинностью связывания. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, обладающие высокой аффинностью, могут уменьшать образование агрегатов альфа-синуклеина, тем самым снижая концентрацию агрегатов в головном мозге. Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, обладающие высокой аффинностью к агрегатам альфа-синуклеина, могут уменьшать образование агрегатов альфа-синуклеина за пределами центральной нервной системы, и изменять состояние равновесия между формами альфа-синуклеина, связанными ВВВ, в результате чего снижается концентрация агрегатов в центральной нервной системе. Кроме того, их преимуществом является то, что их можно вводить в низких дозах благодаря их высокой аффинности. Для клинической практики это является огромным преимуществом, поскольку достаточная эффективность может быть достигнута, например, при введении посредством простой подкожной инъекции, но без ограничения ею.

Антитела, описанные в данном описании изобретения, могут эффективно удалять агрегаты альфа-синуклеина или способствовать их разрушению, а также ингибировать межклеточный перенос альфа-синуклеина, и таким образом, могут найти полезное применение в лечении заболеваний, ассоциированных с накоплением агрегатов альфа-синуклеина.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 представлен результат исследования методом дот-блот, демонстрирующие, что моноклональное антитело, полученное в одном воплощении настоящего изобретения, специфически связывается с нативным альфа-синуклеином в агрегированной форме.

На Фиг. 2 показан результат анализа аффинности моноклонального антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, методом ELISA.

На Фиг. 3а показан результат ВІАсоге анализа специфичности и аффинности предпочтительного связывания моноклонального антитела, полученного в одном

воплощении настоящего изобретения, с агрегатами альфа-синуклеина. На Фиг. 3б результаты, показанные на Фиг. 3а, представлены в таблице.

На Фиг. 4а показан результат Octet анализа специфичности предпочтительного связывания моноклонального антитела, полученного в воплощении настоящего изобретения, с агрегатами альфа-синуклеина. На Фиг. 4б результаты, показанные на Фиг. 4а, представлены в таблице.

На Фиг. 5 показан принцип анализа способности моноклонального антитела, полученного в воплощении настоящего изобретения, ингибировать межклеточный перенос (верхняя панель) и результат эксперимента.

На Фиг. 6а представлен результат окрашивания ткани головного мозга мыши и определения с использованием антитела p-129 к α -синуклеину после введения антитела мыши для выяснения способности моноклонального антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, удалять агрегат альфа-синуклеина в мышинной модели (TG), сверхэкспрессирующей человеческий альфа-синуклеин. На фигуре NP означает гиппокамп, p-129 α -syn означает форму, имеющую фосфорилированный 129-й остаток, и маркер агрегата, и стрелка указывает на фосфорилированный альфа-синуклеин.

На Фиг. 6б представлен результат окрашивания и определения по существу в таком же эксперименте, как и на Фиг. 6а, путем окрашивания антителом против всего альфа-синуклеина в качестве маркера. Стрелкой указан человеческий альфа-синуклеин. Антитела 9B11, 11F4 и 11F11 ингибировали накопление альфа-синуклеина.

На Фиг. 7а показан результат окрашивания ткани головного мозга мышей и определения с использованием антитела к Iba-1 (микроглиоз) в качестве маркера после введения антитела мышам для исследования способности моноклонального антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, подавлять микроглиоз *in vivo*, стрелками показана активированная микроглия.

На Фиг. 7б показан результат окрашивания ткани головного мозга мышей и определения с использованием антитела к GFAP (астроглиоза) в качестве маркера после введения антитела мышам для исследования способности моноклонального антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, подавлять астроглиоз *in vivo*, стрелка указывает активированный астроцит.

На Фиг. 7в показан результат окрашивания ткани головного мозга мышей и определения с использованием антитела к IL-бета (IL-1 β) в качестве маркера после введения антитела мыши для исследования способности моноклонального антитела,

полученного в одном воплощении настоящего изобретения, уменьшать уровень воспалительных цитокинов *in vivo*, стрелка указывает клетки, экспрессирующие IL-1 бета.

На Фиг. 7г показан результаты окрашивания ткани головного мозга мышей и определения с использованием антитела к IL-6 в качестве маркера после введения антитела мыши для исследования способности моноклонального антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, уменьшать уровень воспалительных цитокинов *in vivo*, стрелками показаны клетки, экспрессирующие IL-6.

На Фиг. 8а и 8б показан результат определения способности моноклональных антител 3А9 и 11F11 в одном воплощении настоящего изобретения специфически распознавать тельца Леви и нейриты Леви соответственно, в ткани головного мозга человека. Показано, что антитела по настоящему изобретению связываются с тельцами Леви (стрелка) и нейритами Леви (нитевидная структура в нижней левой части).

Фиг. 9 является схематическим представлением результатов картирования эпитопов для антител согласно одному воплощению настоящего изобретения, при этом антитела по настоящему изобретению преимущественно связываются с С-концевой областью.

На Фиг. 10а и Фиг. 10б представлены результаты анализа способности химерного антитела и гуманизированного антитела способствовать фагоцитозу агрегатов альфа-синуклеина клетками микроглии, Фиг. 10а относится к гуманизированному антителу 11F11, и Фиг. 10б относится к гуманизированному антителу 3А9.

На Фиг. 11 представлены результаты анализа способности химерного антитела и гуманизированного антитела ингибировать связывание агрегатов альфа-синуклеина с поверхностью нервных клеток.

На Фиг. 12 представлены результаты исследования эффективности химерных антител и гуманизированных антител по настоящему изобретению в ингибировании межклеточного переноса, когда агрегаты альфа-синуклеина секретируются нервными клетками, сверхэкспрессирующими альфа-синуклеин, и переносятся к нормальным нервным клеткам.

На Фиг. 13 показан результат анализа методом ELISA аффинности химерного антитела и гуманизированного антитела 11F11, полученных в одном воплощении настоящего изобретения.

На Фиг. 14 показан результат ВІАcore анализа специфичности и аффинности предпочтительного связывания химерного антитела и гуманизированного антитела 11F11,

полученных в одном воплощении настоящего изобретения, с агрегатами альфа-синуклеина.

На Фиг. 15а, 15б, 15в и 15г представлены результаты дот-блот анализа, демонстрирующие, что химерное антитело, полученное в одном воплощении настоящего изобретения, специфически связывается с альфа-синуклеином, в частности с агрегатом альфа-синуклеина, но не с бета-синуклеином, гамма-синуклеином или агрегатами, происходящими от амилоида бета₁₋₄₂ или тау-белка.

ВАРИАНТ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее данное изобретение будет описано более подробно на примерах, которые приведены только с целью иллюстрации, но не ограничивают объем настоящего изобретения.

Пример 1. Получение антитела к альфа-синуклеину

Иммунизация

Полноразмерный (140 остатков) или с отщепленными 21 С-концевыми остатками (119 остатков) мономер α -синуклеина помещали в термомиксер при 37°C, вызывали агрегацию при перемешивании со скоростью 1050 об/мин в течение 14 суток и подвергали воздействию ультразвука. Каждую из фибрилл α -синуклеина, из 140 остатков и 119 остатков, в концентрации 1 мг/мл смешивали с адьювантом в соотношении 1:1 (об.:об.).

Альфа-синуклеин Homo sapiens	Аминокислотная последовательность
SEQ ID NO:126	MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAAEAGKTKEGVLY VGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVA QKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPV DPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA

Затем 200 мкл полученной смеси подкожно инъецировали самкам мышей BALB/c в возрасте от 5 до 7 недель. Через 2 недели 200 мкл полученной смеси дополнительно подкожно инъецировали для бустер-стимуляции антитела. Через одну неделю после бустер-стимуляции собирали кровь и выполняли иммунизационное титрование методом ELISA с использованием введенного антигена. Затем выполняли третью бустер-стимуляцию путем подкожного введения только одного антигена.

Получение гибридомы

Извлекали селезенку иммунизированной мыши и из селезенки получали клетки

селезенки. Клетки селезенки суспендировали в среде Hybridoma-SFM (Thermo Fisher Scientific, USA) с добавлением 10% FBS (эмбриональной телячьей сыворотки). Для получения гибридомы клетки селезенки и клетки миеломы мыши SP2/0-Ag14 смешивали в среде Hybridoma-SFM без сыворотки и затем центрифугировали для удаления среды. Затем добавляли ПЭГ к полученному осадку клеток и инкубировали при 37°C в течение 1 минуты для индукции слияния клеток.

Клонирование одиночных клеток

После слияния в течение 2 недель верифицировали слияние с антитело-продуцирующими В-клетками мыши методом ELISA с использованием антигена, введенного мышам, и среды для культивирования клеток. Затем клонировали одиночные клетки с использованием гибридомы, чтобы отобрать 16 гибридом, продуцирующих моноклональные антитела. Клоны 9B11 (IgG1 каппа) получали с использованием агрегата полноразмерного (140 остатков) α -синуклеина в качестве антигена, и клоны 3A9 и 11F11 (IgG2b каппа и IgG2b каппа соответственно) получали с использованием в качестве антигенов агрегатов α -синуклеина с отщепленными 21 С-концевыми остатками.

Очистка антител

Для очистки антитела каждую гибридому культивировали в среде RPMI1640, содержащей 10% FBS. Для получения антител культуральную среду заменяли бессывороточной средой (SFM) и культивировали примерно в течение примерно 4 суток. Культуральную супернатант отделяли, центрифугировали, фильтровали через фильтр 0,22 мкм и очищали на колонке с белком G для IgG1 типа и на колонке с белком A для остальных антител.

Определение последовательности вариабельной области

Последовательности вариабельных областей и CDR определяли согласно Ahn et of al, Mol. Cells 2004, 18 (2): 237-241. Гибридомы культивировали и центрифугировали для выделения только клеток. Из выделенной гибридомы выделяли РНК путем добавления триазола и использовали для синтеза кДНК в качестве матрицы. Последовательности вариабельных областей и CDR подтверждали посредством секвенирования.

Пример 2. Анализ антиген-связывающей специфичности и аффинности связывания с использованием антитела к альфа-синуклеину

2-1. Дот-блот анализ с использованием антитела к α -синуклеину

Дот-блот эксперименты проводили для анализа, способно ли антитело по настоящему изобретению связываться с мономерами или агрегатами в нативном

состоянии. Для этого эксперимента 50 нг или 100 нг мономера α -синуклеина или фибриллярного белка (изготовленного профессором Lee Seung-jae, Seoul National University; *Bae et al., J. Neurosci* 32: 13454, 2012) наносили на нитроцеллюлозную мембрану в виде пятен. Мономер или фибриллярные белки в двукратном разведении последовательно наносили на мембрану в количестве 12,5, 25, 50, 100 нг в направлении от правого конца к левому. Мембрану блокировали 5% раствором обезжиренного сухого молока в TBST (смесь трис-буферного солевого раствора и полисорбата 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. 1 мг/мл антитела к α -синуклеину, полученного в Примере 1, добавляли к TBST, содержащему 1% бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывания TBST сигналы анализировали, используя хемилюминесцентный субстрат (NEN) в качестве субстрата и вторичное антитело, конъюгированное с HRP (пероксидаза хрена) согласно инструкциям производителя. Результаты визуализировали, используя систему анализа люминесцентных изображений LAS-3000 Luminescent Image Analysis System (FUJIFILM Life Science). Результаты показаны на Фиг. 1.

Как показано на Фиг. 1, было обнаружено, что антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению предпочтительно связывается только с агрегатами, по сравнению с мономерами альфа-синуклеина. В частности, 9B11, 3A9 и 11F11 связывались только с агрегатом. Антитело 274 (Bae et al., *J Neurosci*. 2012 Sep 26; 32 (39): 13454-13469), которое связывается как с мономерами, так и с агрегатами, использовали в качестве сравнительного антитела.

2-2. Анализ ELISA с использованием моноклонального антитела к α -синуклеину

Анализ методом ELISA выполняли для количественного определения аффинности связывания антитела по настоящему изобретению с антигеном. Для этого антитело к альфа-синуклеину, полученное в Примере 1, наносили на 96-луночный планшет в концентрации 1 мкг/мл и обрабатывали агрегатами фибрилл альфа-синуклеина в концентрации 10, 100, 1000 и 10000 нг/мл. После промывания PBS вносили стрептавидин, конъюгированный с HRP, и конъюгат вторичного антитела с биотином, и затем проводили реакцию с ТМВ (тетраметилбензидин) в качестве субстрата. Измеряли поглощение, и результаты показаны на Фиг. 2.

Как показано на Фиг. 2, было обнаружено, что антитела по настоящему изобретению предпочтительно связываются с агрегатами с высокой аффинностью

связывания. Результаты ELISA показали, что антитела, предпочтительно связывающиеся с агрегатами, имеют аффинность от $0,1 \times 10^{-9}$ М до 2×10^{-9} М, тогда как антитела, которые связываются как с мономерами, так и с агрегатами, демонстрировали более высокую аффинность примерно 1×10^{-10} М, чем эти антитела. Антитело по настоящему изобретению предпочтительно связывалось с агрегатами альфа-синуклеина с высокой аффинностью, но аффинность к мономеру нельзя было определить, поскольку оно связывалось с мономером с более низкой аффинностью, чем с агрегатом, или не связывалось с мономером. Эти результаты указывают, что антитело может эффективно устранять или ингибировать действие агента, вызывающего нейродегенеративные заболевания, этиология которых связана с альфа-синуклеином, такие как болезнь Паркинсона.

2-3. ВІАcore анализ с использованием антитела к альфа-синуклеину

Количественный анализ связывания антитела к альфа-синуклеину, полученного в Примере 1, с антигеном в форме мономера и агрегата проводили, используя ВІАcore анализ.

Использовали инструмент Т200 (GE Healthcare, S / N: 1565888). Белок А использовали в качестве чипа (GE Healthcare, кат. номер 29-1275-56). 10 мМ глицин-НСІ, рН 1,5 (GE Healthcare, кат. номер BR-1003-54) использовали в качестве буфера для регенерации. В качестве проточного буфера, буфера для разведения аналитов и буфера для разведения образцов использовали HBS-EP. Антитела к α -синуклеину (3A9, 9B11 и 11F11), полученные в Примере 1, разбавляли $1 \times$ HBS-EP (GE Healthcare, кат. номер BR-1006-69), и мономер альфа-синуклеина (1 мг/мл) и фибриллярный белок (3 мг/мл) последовательно разводили в двух повторах и анализировали в 6 концентрациях (0, 0,39, 1,56, 6,25, 25, 100 нМ), включая 0 нМ. Для захвата мономер был на уровне 800 RU (теоретический) и фибриллярный белок на уровне 100 RU (теоретический). Фазу захвата осуществляли при времени контакта 60 секунд, скорости потока 30 мкл/мин и периоде стабилизации 180 секунд. Фазу ассоциации проводили при скорости потока 30 мкл/мин и времени ассоциации 120 секунд. Фазу диссоциации проводили при скорости потока 30 мкл/мин и времени диссоциации 360 секунд. Фазу регенерации проводили двукратно при скорости потока 30 мкл/мин в течение 240 секунд (первичная) и 60 секунд (вторичная). Аппроксимацию проводили, используя модель связывания 1: 1 и программа для оценки представляла собой ВІАCore Т200 Evaluation (GE healthcare). Результаты показаны на Фиг. 3а и 3б.

На Фиг. 3а показан результат ВІАсоге анализа специфичности и аффинности предпочтительного связывания моноклонального антитела, полученного в одном примере настоящего изобретения, с агрегатами альфа-синуклеина. Показано, что антитело по настоящему изобретению связывается с агрегатом с высокой аффинностью. Эти результаты указывают на то, что антитело может эффективно устранять или ингибировать действие агента, вызывающего нейродегенеративные заболевания, этиология которых связана с альфа-синуклеином, такие как болезнь Паркинсона. На Фиг. 3б приведена таблица, показывающая результаты, представленные на Фиг. 3а.

Как показано на Фиг. 3а и 3б, антитела 3А9, 9В11 и 11F11, для которых предпочтительное связывание с агрегатами, среди четырех проанализированных антител к альфа-синуклеину, было подтверждено другими методами, описанными выше, связывались только с агрегатами в ВІАсоге анализе с высокой аффинностью примерно от 1×10^{-9} М до 3×10^{-9} М.

2-4. Octet анализ с использованием антитела к альфа-синуклеину

Проводили количественный анализ связывания антител к альфа-синуклеину (3А9, 9В11, 11F11), полученных в Примере 1, с антигенами в форме мономера и агрегата с использованием Octet.

В частности, проточным буфером служил $1 \times$ KB буфер (кат. номер 18-1092) или $1 \times$ PBS буфер при 1000 об/мин, а буфером для иммобилизации служил ацетат натрия, рН 5 (10 мМ, кат. номер 18-1068). Для тестирования антител в качестве иммобилизованного антигена использовали мономеры или фибриллы α -синуклеина. Целевые концентрации составляли 20 мкг/мл для мономера и 0,4 мкг/мл для фибрилл. Для исследования кинетики готовили последовательные двукратные разведения, начиная с концентрации 50 нМ для мономеров и 100 нМ для фибрилл соответственно, чтобы получить всего 7 точек. Время ассоциации/диссоциации составляло 5 мин/20 мин для мономера и 5 мин/25 мин для фибрилл. В качестве биосенсора использовали ARG2, для аппроксимации применяли модель 1: 1. Результаты показаны на Фиг. 4. На Фиг. 4а показаны результаты Octet анализа специфичности связывания антитела к альфа-синуклеину, полученного в воплощении настоящего изобретения, предпочтительно связывающегося с агрегатом α -синуклеина.

Как показано на Фиг. 4а, 3А9, 9В11 и 11F11 плохо связывались с мономерами (обведенная красным пунктиром часть графика), однако хорошо связывались с агрегатами (восходящая кривая в обведенной красным пунктиром части графика). Представленные результаты аналогичны или согласуются с результатами, полученными в дот-блот, ELISA

и Octet анализах, и демонстрируют, что 3A9, 9B11 и 11F11, для которых, среди четырех протестированных антител к α -синуклеину антитела, предпочтительное связывание с агрегатами подтверждено другими методами, описанными выше, в Octet анализе связываются только с агрегатами. На Фиг. 4б представлена таблица, показывающая результаты, приведенные на Фиг. 4а. Результаты на Фиг. 4а и Фиг. 4б демонстрируют предпочтительное связывание с агрегатами альфа-синуклеина и согласуются с результатами, представленными на Фиг. 1. Антитело # 274, использованное в качестве контроля, хорошо связывалось как с мономерами, так и с агрегатами.

Пример 3. Анализ ингибиторного влияния антитела к альфа-синуклеину на межклеточный перенос агрегата альфа-синуклеина

Поскольку межклеточный перенос агрегатов альфа-синуклеина представляет собой патогенетический фактор, лежащий в основе заболеваний, ассоциированных с агрегатами альфа-синуклеина, антитела, способные его ингибировать, могут быть полезными в качестве терапевтических агентов. С этой целью выполняли анализ бимолекулярной комплементации флуоресценции (BiFC). Принцип BiFC схематически показан в верхней части Фиг. 5.

На Фиг. 5 показан принцип анализа (верхняя часть), где моноклональное антитело, полученное в одном воплощении настоящего изобретения, ингибирует межклеточный перенос, а также результат эксперимента. На изображении синий цвет соответствует ядрам, а зеленый цвет соответствует сигналу, испускаемому, когда альфа-синуклеин, высвободившийся из одной клетки, проникает в другие клетки и, встречаясь с другими молекулами альфа-синуклеина, образует агрегаты.

Культура клеток для анализа BiFC

Клетки линии SH-SY5Y нейробластомы человека, экспрессирующие альфа-синуклеин и половину флуоресцентного белка Venus (Venus 1- α Syn (V1S) и α Syn-Venus2 (SV2)) соответственно, культивировали, как описано ранее (Lee HJ et al., *J. Neurosci.* 2004; 24: 1888-1896). Перед экспериментом 180 000 клеток, экспрессирующих V1S и SV2, смешивали на покровном стекле и культивировали в течение 3 суток. Осуществляли пассажи совместной культуры каждые 48 часов для подтверждения непрерывной межклеточной миграции альфа-синуклеина. Поскольку интенсивность перемещения была максимальной в пассаже номер 6 в отдельном эксперименте (данные не приведены), ингибиторный эффект антитела на межклеточное перемещение анализировали с использованием совместной культуры шести пассажей.

Эксперимент ViFC /антительная обработка

За день до визуализации в совместную культуру добавляли 50 мкг/мл IgG или исследуемого антитела (3A9, 9B11, 11F11). Сигнал в Venus канале в каждой совместной культуре соответствует агрегатам, образованным в результате агрегации альфа-синуклеина, который считали агрегатом, образовавшимся в результате миграции α -синуклеина из одной клетки в другую клетку. Эти сигналы автоматически анализировали на анализаторе IN Cell Analyzer (установки прибора: размер точки: 0,1-0,4 мкм, интенсивность: 4000-7000). Результаты показаны на Фиг. 5.

В частности, синий цвет соответствует ядрам, а зеленый цвет означает, что альфа-синуклеин, высвободившийся из одной клетки, проникает внутрь другой клетки и встречается с другим альфа-синуклеином с образованием агрегатов. На графике в правой части показана интенсивность сигнала. В группах обработки 9B11, 11F11 и 3A9 количество клеток, в которых регистрировался зеленый сигнал, было уменьшенным по сравнению с IgG, служившим отрицательным контролем. Результаты показывают, что антитела по настоящему изобретению могут эффективно ингибировать межклеточный перенос альфа-синуклеина.

Пример 4. Анализ эффекта удаления агрегатов альфа-синуклеина *in vivo* с помощью антитела к альфа-синуклеину

Для анализа *in vivo* эффекта антитела к альфа-синуклеину, полученного в данном изобретении, 10 мг/кг антитела к альфа-синуклеину человека или IgG вводили внутривенно каждую неделю в течение 3 месяцев трансгенным мышам, сверхэкспрессирующим человеческий альфа-синуклеин (mThy-1 человеческий α -синуклеин, UC San Diego). Использовали шесть мышей на группу, и в качестве контрольной группы использовали нетрансгенных сородичей. Перфузию осуществляли, как описано ниже.

Для патологического анализа головного мозга, по окончании последнего введения, животным выполняли анестезию хлоралгидратом в соответствии с гуманитарными принципами, а затем выполняли перфузию сердца 0,9% солевым раствором. Половину (сагиттальные срезы) перфузированного головного мозга хранили в 4% параформальдегиде в фосфатном буфере (pH 7,4, 4°C) до последующего анализа, а другую половину немедленно замораживали и хранили в замороженном виде (70°C).

Патологический анализ выполняли следующим образом. Из половины головного мозга, зафиксированной в параформальдегиде, делали серию срезов толщиной 40 мкм

свободноплавающим методом, используя вибратор. Для определения уровня экспрессии альфа-синуклеина в головном мозге в группе введения, срезы, включающие кору, полосатое тело и гиппокамп, инкубировали с антителами к альфа-синуклеину (антитело к α -синуклеину p129 в качестве маркера агрегатов, abcam, ab59264, или антителом ко всему альфа-синуклеину, Cell Signaling Technology, #2642) в течение ночи при 4°C. Для исследования активности астроцитов или активности микроглии, срезы обрабатывали антителом к GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок) (AB5804, millipore) или антителом к Iba1 (019-19741, Wako) (019-19741, Wako) соответственно. Для определения степени нейровоспаления, срезы обрабатывали антителом к IL-6 (NB600-1131, Novus Biologicals) или антителом к IL-1 β (ab9722, abcam) соответственно. После инкубации с первичными антителами обрабатывали козым антителом к IgG кролика, конъюгированным с биотином (1:100, Vector Laboratories), и конъюгатом авидин D - пероксидаза хрена (1:200, ABC Elite, Vector Laboratories) и проводили детекцию с применением диаминобензидина (DAB). Каждый иммуноокрашенный срез исследовали при помощи светлопольной микроскопии для измерения оптической плотности. Результаты показаны на Фиг. 6а и 6б. На Фиг. 6а представлен результат окрашивания и измерения в ткани головного мозга мыши с использованием антитела к α -синуклеину p-129 после введения антитела мышам для анализа способности моноклонального антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, удалять агрегаты альфа-синуклеина в мышинной модели (TG), сверхэкспрессирующей человеческий альфа-синуклеин. HP означает гиппокамп, p-129 α -syn означает форму, имеющую фосфорилированный 129-й остаток и маркер агрегата, а стрелка указывает на фосфорилированный альфа-синуклеин.

На Фиг. 6а представлен результат анализа с использованием антитела к α -синуклеину p-129 в качестве маркера для обнаружения агрегата альфа-синуклеина и показано существенное снижение уровня агрегатов в CA1 и CA3 коры и гиппокампа мыши TG (TransGenic), которой вводили антитело, полученное в одном воплощении настоящего изобретения, по сравнению с контрольной мышью, которой вводили только IgG (соответствующая зона показана стрелками в IgG образце). Эти результаты свидетельствуют, что антитело по настоящему изобретению может в значительной степени удалять альфа-синуклеин. WT и IgG представляют собой отрицательные контроли, а антитело 274, связывающееся как с мономерами, так и с агрегатами, представляет собой группу сравнения. Результаты свидетельствуют, что антитело по

настоящему изобретению может эффективно ингибировать накопление агрегатов альфа-синуклеина и поэтому его можно эффективно применять для предупреждения и/или лечения заболеваний, этиология которых связана с альфа-синуклеином.

На Фиг. 6б представлен результат по существу такого же эксперимента, как и на Фиг. 6а, но полученный путем окрашивания антителом ко всему альфа-синуклеину в качестве маркера. Стрелка указывает человеческий альфа-синуклеин. Повышение человеческого альфа-синуклеина у мышей TG эффективно устранялось путем введения антител. *Результаты свидетельствуют, что антитело по настоящему изобретению эффективно уменьшает агрегаты альфа-синуклеина и его можно эффективно использовать для лечения α -синуклеинопатии, такой как болезнь Паркинсона.* Антитела 9B11, 11F4 и 11F11 эффективно ингибировали накопление всех альфа-синуклеинов. Обнаружение всего альфа-синуклеина указывает на то, что антитело по настоящему изобретению способно элиминировать как сам синуклеин (элиминация), так и ингибировать его межклеточный перенос (передача от клетки в клетку). С другой стороны, результаты также можно интерпретировать как ингибирование образования агрегатов из мономеров или удаление всех мономеров.

Пример 5. Анализ уменьшения микроглиоза и астроглиоза и уменьшение высвобождения воспалительных цитокинов с помощью антитела к альфа-синуклеину

Глиоз представляет собой неспецифическую реакцию глиальных клеток в ответ на повреждение центральной нервной системы, инициированное повреждением BBB, TGF-бета или интерлейкином. Репрезентативные примеры включают микроглиоз и астроглиоз, маркерами которых являются белки Iba-1 и GFAP соответственно. Как описано в Примере 4, эффект антитела по настоящему изобретению на уменьшение микроглиоза и астроглиоза и уменьшение высвобождения воспалительных цитокинов, инициирующее их, анализировали путем введения антитела мыши. Результаты показаны на Фиг. 7а, 7б, 7в и 7г.

На Фиг. 7а показан результат окрашивания и измерения в ткани головного мозга мышей с использованием антитела к Iba-1 (микроглиоз) в качестве маркера после введения антитела мыши для исследования способности моноклонального антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, уменьшать микроглиоз *in vivo*, и стрелка показывает активированную микроглию. Было подтверждено, что активация микроглии существенно снижалась у мышей, которым вводили антитела 3A9, 9B11 и

11F11.

На Фиг. 7б показан результат окрашивания и измерения в ткани головного мозга мышей с использованием антитела к GFAP (астроглиоз) в качестве маркера после введения антитела мыши для исследования способности моноклонального антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, уменьшать астроглиоз *in vivo*, и стрелка показывает активированный астроцит. Было подтверждено, что антитела 3A9, 9B11 и 11F11 эффективно ингибировали астроглиоз на значительном уровне.

На Фиг. 7в показан результат окрашивания и измерения в ткани головного мозга мыши с использованием в качестве маркера антитела к IL-1 бета (IL-1 β) после введения антитела мыши для исследования способности моноклонального антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, снижать воспалительные цитокины *in vivo*, и стрелка показывает клетки, экспрессирующие IL-1 бета. IL-1 бета вызывает воспаление и, таким образом, индуцирует гибель и воспалительный ответ различных нервных клеток. IL-1 бета был существенно понижен в ткани головного мозга мыши, которой вводили антитело по настоящему изобретению.

На Фиг. 7г показан результат окрашивания и измерения в ткани головного мозга мышей с использованием в качестве маркера антитела к IL-6 после введения антитела мыши для исследования способности моноклонального антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, уменьшать воспалительные цитокины *in vivo*, и стрелка показывает клетки, экспрессирующие IL-6. IL-6 был снижен в ткани головного мозга мыши, которой вводили антитело по настоящему изобретению.

Как показано в графических материалах, было обнаружено, что антитела по настоящему изобретению уменьшали микроглиоз и астроглиоз и снижали высвобождение воспалительных цитокинов IL-1бета и IL-6, инициирующих микроглиоз и астроглиоз, по сравнению с контрольной группой.

Пример 6. Обнаружение телец Леви в ткани головного мозга человека с помощью антитела к альфа-синуклеину

Тельца Леви и нейриты Леви в заключенных в парафин срезах головного мозга толщиной десять микрон, полученных у пациентов, скончавшихся от болезни Паркинсона (Dr. Halliday, университет Сиднея) окрашивали с использованием антитела, полученного в Примере 5, как описано ниже. Для демаскировки антигена срезы ткани обрабатывали 90% муравьиной кислотой в течение 3 минут и затем ингибировали пероксидазную активность самой ткани при помощи 1% H₂O₂ (50% этанольная основа). Затем проводили обработку

10% нормальной лошадиной сывороткой для предупреждения неспецифического связывания в тканях. Затем, после промывания фосфатным буфером соседние срезы обрабатывали антителами по настоящему изобретению 3A9, 11F11 и 11F11 при 4°C в течение ночи. После промывания фосфатным буфером обрабатывали антителом к IgG человека, конъюгированным с биотином, при 37°C в течение 30 минут, и комплекс авидин-биотин взаимодействовал при комнатной температуре в течение 30 минут (набор Vectastatin Elite; Vector Laboratories). Затем, после добавления DAB, содержащего 0,005% H₂O₂, развивалось окрашивание и срезы контрастно окрашивали 0,5% кризильвиолетом для различения каждой клетки. Результаты показаны на Фиг. 8а и 8б.

На Фиг. 8а и 8б показан результат измерения способности моноклональных антител к альфа-синуклеину 3A9 и 11F11 согласно воплощению настоящего изобретения специфически распознавать тельца Леви и нейриты Леви соответственно, в ткани головного мозга человека. Они показывают, что антитела по настоящему изобретению связываются с тельцами Леви (стрелка) и нейритами Леви (нитевидная структура в нижней левой части).

Как показано на Фиг. 8а и 8б, антитело по настоящему изобретению эффективно связывалось с тельцами Леви и нейритами Леви (показано стрелкой). Эти результаты позволяют предположить, что оно способно эффективно связываться с агрегатом альфа-синуклеина, компонентом телец Леви в ткани головного мозга человека. Показано, что антитела, доставленные в человеческий головной мозг, могут эффективно и специфически связываться с агрегатом альфа-синуклеина. Эти результаты свидетельствуют, что антитела по настоящему изобретению действительно могут специфически связываться с агрегатами альфа-синуклеина в ткани головного мозга человека и могут эффективно применяться для предупреждения и/или лечения заболеваний, этиология которых связана с альфа-синуклеином.

Пример 7. Анализ эпитопов антитела к альфа-синуклеину

Картирование эпитопов антител 3A9 и 11F11 по настоящему изобретению проводили путем поручения PEPSKAN (The Netherlands) выполнить пептидный аллельный анализ. Результаты показаны на Фиг. 9. Фиг. 9 является схематическим представлением результатов эпитопного картирования для антител согласно одному воплощению настоящего изобретения.

Как показано на Фиг. 9, большинство антител по настоящему изобретению связывалось с С-концевой областью. Антитела к альфа-синуклеину, распознающие N-

конец, не могли распознавать агрегаты при других заболеваниях, таких как множественная системная атрофия, относящаяся к синуклеинопатиям, которые совместно называют заболеваниями, связанными с альфа-синуклеином. Напротив, антитела к альфа-синуклеину, распознающие С-концевую область, обладают преимуществом в распознавании агрегатов при других различных синуклеинопатиях, а также при болезни Паркинсона. В частности, как описано выше, было показано, что антитела, распознающие область между остатками 110 и 122, предпочтительно связывались с агрегатами.

Пример 8. Получение (химерных) антител к альфа-синуклеину

Клонирование

Используя нуклеотидные последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антитела, полученного после гуманизации, синтезировали gblock (m.biotech) короткого нуклеотидного фрагмента и клонировали его в вектор для культуры клеток животных (pcDNA3.4). Синтез gblock осуществляли путем включения перекрывающихся последовательностей из примерно 20 п.н. до и после вариабельной области, и часть вектора pcDNA3.4, за исключением вариабельной области, амплифицировали при помощи ПЦР и клонировали при помощи метода сборки по Gibson.

Трансфекция и экспрессия

Полученный вектор использовали для maxi-prep (Qiagen) для получения больших количеств плазмидной ДНК и затем вводили в клетки следующим образом. За день до трансфекции концентрацию клеток ExpiCHO™ (Gibco, кат. номер A29127) доводили до 3×10^6 - 4×10^6 жизнеспособных клеток на мл в среде для экспрессии ExpiCHO™ (Gibco, кат. номер A29100-01) и культивировали при 8% CO₂, 37°C и 120 об/мин в течение 1 суток. В день трансфекции ДНК, клетки выращенные до концентрации от 7×10^6 до 10×10^6 жизнеспособных клеток на мл и имевшие жизнеспособность 95% или более, готовили путем разбавления свежей средой до концентрации 6×10^6 жизнеспособных клеток на мл.

Для трансфекции родительских клеток готовили комплекс ExpiFectamine™ CHO & плазмидная ДНК, используя набор для трансфекции ExpiFectamine™ CHO (Gibco, кат. номер A29129). ДНК и реагенты ExpiFectamine™ CHO готовили в надлежащих концентрациях путем распределения в холодной среде OptiPRO™ SFM® (Gibco, кат. номер 12309019), соответственно инокулировали, смешивали и оставляли при комнатной температуре на 5 минут. Продукт инокулировали в родительские клетки и осуществляли культивирование после трансфекции. На следующий день после трансфекции в

трансфицированные клетки инокулировали усилитель и питательную добавку, входящие в набор для трансфекции CHO ExpiFectamine™, и через 5 суток дополнительно вносили питательную добавку, после чего инкубировали в течение 10 суток при 8% CO₂, 37°C и 120 об/мин для получения трансфицированных клеток.

Для получения культурального раствора, культуральную среду переносили во флакон для центрифугирования и центрифугировали при 4°C при 6500 об/мин в течение 30 мин, после чего фильтровали через фильтр с порами 0,2 мкм с получением культуральной среды с удаленными суспендированными твердыми частицами, и затем культуральную среду использовали для дальнейшей очистки.

Выделение антитела

Культуру очищали, используя HiTrap MabSelectSure (GE Healthcare, 11-0034-94). После уравнивания уравнивающим буфером (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 100 mM NaCl) на колонку загружали извлеченную культуру. После окончания загрузки колонку промывали 50 mM раствором цитрата натрия (pH 5,0), а затем элюировали 50 mM цитратом натрия (pH 3,4). Для нейтрализации до pH 6,0, к элюату добавляли 1M Tris-HCl с pH 9,0. Затем осуществляли замену буфера в элюате и концентрировали с PBS (фосфатно-солевой буфер, pH 7,4) и хранили при 4°C до последующего использования. При необходимости дополнительной очистки осуществляли вторую очистку, в зависимости от размера элюированного образца, пропуская первый очищенный продукт через 1X PBS буфер на колонке HiLoad 26/600 superdex 200. Аминокислотную последовательность очищенного антитела анализировали при помощи масс-спектрометрии и подтверждали ее соответствие вариабельной области моноклонального антитела мышинового происхождения.

Для получения химерного человеческого IgG1 антитела часть вариабельных областей в остове человеческого IgG1 замещали вариабельными областями антител 3A9, 9B11 и 11F11, идентифицированных вышеуказанным способом. Среди полученных химерных антител, в частности антитело Ch11F11 представляет собой антитело в форме IgG, содержащее комбинацию вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 90 (ch11F11-VH) и вариабельной области легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 109 (ch11F11-VL), и антитело Ch3A9 представляет собой антитело в форме IgG, содержащее комбинацию вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 102 (ch11F11-VH) и вариабельной области легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 116 (ch11F11-VL).

Пример 9. Получение гуманизированного антитела

Получение фаговой библиотеки

Конструировали мини-библиотеку, в которой последовательности мышиноного или человеческого происхождения вводили в каждый остаток CDR и связывая каркас человеческого происхождения с остатками CDR1, CDR2 и CDR3 химерного антитела.

Компетентные клетки полученной мини-библиотеки инокулировали в среду 2X YT [17 г триптона (CONDA, 1612.00), 10 г дрожжевого экстракта (CONDA, 1702.00) и 5 г NaCl (Sigma, S7653)], содержащую 34 мкг/мл хлорамфеникола (Sigma, C0857), 2% глюкозы (Sigma, G5400) и 5 mM MgCl₂ (Sigma, C0857) и при 30°C в течение 3 часов до оптической плотности OD₆₀₀ 0,5 - 0,7. Затем клетки инфицировали фагом-хелпером и культивировали в среде 2X YT, содержащей 34 мкг/мл хлорамфеникола, 5 mM MgCl₂, 70 мкг/мл канамицина (Sigma, K1876) и 1 mM IPTG (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид) (ELPISBIO, IPTG025) при 30°C в течение 6 часов для индукции фаговой упаковки. Культуральный раствор центрифугировали при 4500 об/мин при 4°C в течение 15 минут. К супернатанту добавляли 4% PEG 6000 (Fluka, 81253) и 3% NaCl (Sigma, S7653) и инкубировали в течение 1 ч на льду. Продукт центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20 минут при 4°C, и затем осадок суспендировали в PBS и снова центрифугировали при 4°C и 12000 об/мин в течение 10 минут с получением супернатанта, содержащего фаговую библиотеку. Полученный супернатант хранили при 4°C до последующего применения.

Пэннинг фагового дисплея

Для отбора антител, которые предпочтительно связываются с агрегатами альфа-синуклеина, а не с мономерами, выполняли пэннинг с использованием полноразмерных агрегатов альфа-синуклеина, полученных в Примере 1, и всего выполняли три цикла пэннинга, как описано ниже.

Бычий сывороточный альбумин (BSA) добавляли к клеткам в концентрации 3% в пробирке для анализа при 4°C в течение ночи, добавляя 10 мкг/мл рекомбинантных агрегатов или мономеров альфа-синуклеина к PBS в пробирке для иммуноанализа (maxisorp 444202), раствор добавляли к пробирку для анализа и поверхность, на которую агрегаты или мономеры альфа-синуклеина не адсорбировались, защищали. После опорожнения пробирки для анализа, в пробирку для иммуноанализа с адсорбированными агрегатами и мономерами альфа-синуклеина помещали фаговую библиотеку антител из 10¹² CFU (колониеобразующая единица), диспергированную в 3% растворе BSA, и проводили взаимодействие в течение 1 часа (отрицательная селекция). Затем собирали

фаги, не связавшиеся с агрегатами и мономерами альфа-синуклеина, и оставляли реагировать в течение 2 часов при комнатной температуре с абсорбированным агрегатами и мономерами α -синуклеина. Фосфатно-солевой буферный раствор (0,05% Tween 20) (PBS-T), использовали для извлечения 100 мкМ раствора триэтиламина, который был извлечен с использованием раствора PBS-T. Выдерживали *E. coli* при 37°C в течение 1 часа, и инфицированные *E. coli* наносили мазками на агаризованную среду 2X YTi культивировали при 37°C в течение ночи (pH 7,4), они были инфицированы ER2537. На следующий день культуру *E. coli* суспендировали в 4 мл культуральной среды 2X YТ, содержащей карбенициллин, добавляли 15% глицерин, и часть хранили при -80°C, а остальное использовали для подготовки фагов для следующих экспериментов. Пул фагов, специфичных в отношении антигена альфа-синуклеина был амплифицирован и сконцентрирован путем повтора данной процедуры в течение суммарно 3 циклов,. С каждым раундом пэннинга количество промывок с использованием PBS-T увеличивали для амплификации и концентрирования антиген-специфических фагов.

Скрининг одиночных клонов

Для отбора моноклональных антител, специфически связывающихся с агрегатом синуклеина, из пула фагов, полученных в результате пэннинга, проводили следующий эксперимент.

Для выделения одиночных клонов из концентрированного пула после нанесения мазками пула фагов на агаризованную среду LB, содержащую тетрациклин/карбенициллин, и культивирования выделяли одиночную колонию. Затем, после инокуляции одиночных клонов в 96-луночные глубоководные планшеты, в которых находилось по 400 мкл среды 2X YТ-тетрациклин/карбенициллин на лунку, и культивирования в течение ночи, 10 мкл культурального раствора помещали в новый 96-луночный глубоководный планшет, в лунки которого вносили 390 мкл среды 2X YТ-тетрациклин/карбенициллин, и культивировали при 37°C в течение 4 часов. В культуральный раствор вносили 1 мМ IPTG и культивировали при 30°C в течение ночи. После культивирования в течение ночи культуральный раствор центрифугировали для отделения супернатанта.

Затем выбирали одиночные клоны, экспрессирующие растворимый scFv, связывающийся с агрегатом синуклеина, при помощи метода ELISA следующим образом (Steinberger. Rader and Barbas III. 2000. Phage display vectors. In: Phage Display Laboratory Manual. 1st ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY. USA. pp.11.9-11.12). В частности,

отобранное в Примере 1-1 антитело 7B7 вносили в 96-луночный планшет (*Nunc-Immuno Plates, NUNC, USA*) и оставляли для иммобилизации при 4°C в течение ночи. В каждую лунку добавляли 3% BSA в количестве 200 мкл и затем проводили блокирование при 37°C в течение 2 часов. Затем вносили агрегаты и мономеры альфа-синуклеина в концентрации 100 нг/лунку, осуществляли взаимодействие при 37°C в течение 2 часов и промывали пять раз 300 мкл PBS-Т. Супернатант, полученный от одиночных клонов, смешивали с 3% BSA в объемном соотношении 1:1 (об.:об.) и загружали 100 мкл раствора на планшет со связанными агрегатами и мономерами и оставлял взаимодействовать в течение 2 часов при 37°C. Лунки промывали пять раз 300 мкл PBS-Т и инкубировали при 37°C в течение 1 часа с антителом к гемагглютиниону, конъюгированному с HRP, после чего промывали пять раз PBS-Т. После добавления 100 мкл ТМВ (тетраметилбензидин, Sigma, T0440) взаимодействие останавливали добавлением 50 мкл 1 н. H₂SO₄ для измерения поглощения при 450 нм. Клоны с абсорбцией 0,5 и выше считали положительными в отношении связывания, а клоны, неспецифически связывающиеся с BSA, удаляли.

Параллельно анализировали *in silico* остатки CDR клонов, найденных в библиотеке, и отбирали клоны, имевшие серьезные проблемы со связыванием с каркасом, или клоны, не имевшие Т-клеточного эпитопа, В-клеточного эпитопа и эпитопа МНСII в каркасных участках, не являющихся CDR.

Затем для пяти антител, полученных в результате следующих комбинаций переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, производили замену переменной области гуманизированного антитела с изотипом человеческого IgG1 частью остова переменной области с получением пяти гуманизированных антител с остовом IgG1. В частности, Hu11F11_ (ABL2-4) представляет собой антитело типа IgG и включает комбинацию переменной области тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 92 (Hu11F11-VH2) и переменной области легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 113 (Hu11F11-VL4). Hu11F11_ (ver.1) представляет собой антитело типа IgG и включает комбинацию переменной области тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 98 (Hu11F11-VH-v1) и переменной области легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 115 (Hu11F11) -VLv3 4c). Hu11F11_ (ver.2) представляет собой антитело типа IgG и включает комбинацию переменной области тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 99 (Hu11F11-VH-v2) и переменной области легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 115 (Hu11F11-VLv3 4c). Hu11F11_ (ver.3) представляет собой антитело типа IgG и включает переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:

100 (Hu11F11-VH-v3) и переменную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 115 (Hu11F11-VLv3 4c).

Hu11F11 (ver.4) представляет собой комбинацию переменной области тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 101 (Hu11F11-VH-v4) и переменной области легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 115 (Hu11F11-VLv3 4c).

Пример 10. Анализ способствующей фагоцитозу активности гуманизованного антитела

Для исследования эффективности, с которой химерное антитело, полученное в Примере 8, и гуманизованные антитела, полученные в Примере 9, hu11F11 (ver.1), hu11F11 (ver.2), hu11F11 (ver.3), hu11F11 (ver.4) и ABL2-4, способствуют фагоцитозу внеклеточных агрегатов альфа-синуклеина клетками микроглии, способствующую фагоцитозу активность анализировали следующим образом.

В частности, клетки микроглии мышей линии BV-2 культивировали в среде RPMI1640 с добавлением 10% FBS в концентрации 2×10^6 клеток/мл и затем распределяли по 100 мкл в круглодонные 96-луночные планшеты. Агрегаты альфа-синуклеина и химерное антитело 11F11, или антитела Hu11F11_11F11 (ver.1), или Hu11F11_11F11 (ver.2), или Hu11F11_11F11 (ver.3), или Hu11F11_11F11 (ver.4) или Hu11F11_ABL2-4, полученные в Примерах 8 и 9, инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут, и их смесь добавляли в 96-луночный планшет к клеточным линиям BV-2 и оставляли взаимодействовать в течение 15 минут. После удаления несвязанных агрегатов альфа-синуклеина и антител с помощью центрифуги при 1200 об/мин в течение 5 минут, клетки фиксировали 4% формальдегидом, трехкратно промывали и пермеабелизировали при помощи 0,5% тритон X-100. Антитело, распознающее синуклеин (Santa Cruz), инкубировали в течение 1 часа, трехкратно промывали PBS, содержащим 0,1% Tween 20, и затем инкубировали в течение 1 часа с антителом к иммуноглобулину кролика, конъюгированным с Alexa-488. Затем осуществляли промывку и анализировали при помощи FACS caliber. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 12а и Фиг. 12б, где представлены результаты анализа способности химерных и гуманизованных антител стимулировать фагоцитоз агрегатов альфа-синуклеина клетками микроглии. Фиг. 10а относится к гуманизованному антителу 11F11, а Фиг. 10б относится к гуманизованному 3A9.

Как показано на Фиг. 10а и Фиг. 10б, химерное антитело, описанное в данном изобретении, увеличивало захват агрегатов альфа-синуклеина примерно в 2 раза по

сравнению с контрольной группой IgG, и гуманизированные антитела увеличивали до 4 раз. Среди них, варианты гуманизированного антитела 11F11, а именно Hu11F11_ABL2-4 (комбинация Hu11F11-VH2 и Hu11F11-VL4), Hu11F11_(ver.1) (комбинация Hu11F11-VH-v1 и Hu11F11-VLv3 4c) и Hu11F11_(ver.2) (комбинация Hu11F11-VH-v2 и Hu11F11-VLv3 4c) обладали превосходной активностью стимулирования фагоцитоза BV-2 по сравнению с химерным антителом 11F11. Hu11F11_(ver.3) (комбинация Hu11F11-VH-v3 и Hu11F11-VLv3 4c) и hu11F11_(ver.4) (комбинация Hu11F11-VH-v4 и Hu11F11-VLv3 4c) демонстрировали активность стимулирования фагоцитоза, которая была аналогична активности химерного антитела 11F11.

Пример 11. Анализ связывания с фибриллами

Анализ связывания с фибриллами проводили для анализа эффективности антитела в ингибировании связывания агрегатов альфа-синуклеина с нервными клетками, а именно центральной стадии явления, когда агрегаты альфа-синуклеина переносятся в соседние нервные клетки посредством межклеточного переноса.

В частности, клетки SH-SY5Y, представляющие собой линию нервных клеток, обрабатывали в течение 10 минут 1 мкМ агрегатов альфа-синуклеина и 20 нМ каждого из химерного антитела 11F11 и гуманизированных вариантов 11F11, а именно Hu11F11_ver1, Hu11F11_ver2, Hu11F11_ver3, Hu11F11_ver4 и Hu11F11_ABL2-4. Затем клетки фиксировали 4% формальдегидом. После промывки обрабатывали антителом к альфа-синуклеину (BD), распознающим все формы альфа-синуклеина, в условиях без пермеабиллизации в разведении 1:250, промывали и исследовали при помощи конфокального микроскопа. Ядра клеток были показаны посредством обработки DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола) непосредственно перед визуализацией.

В результате антитела по настоящему изобретению эффективно снижали степень связывания агрегатов альфа-синуклеина с клеточными мембранами по сравнению с контрольной группой IgG и, в частности, гуманизированные антитела 11F11 снижали степень связывания аналогично или более эффективно, чем химерное антитело 11F11. На Фиг. 11 показан результат анализа способности химерного антитела и гуманизированных антител по настоящему изобретению ингибировать связывание агрегатов альфа-синуклеина с поверхностью нервных клеток.

Как показано на Фиг. 11, антитела по настоящему изобретению снижали степень связывания агрегатов альфа-синуклеина с клеточными мембранами в 23 раза эффективнее по сравнению с контрольной группой IgG, и, в частности, гуманизированные антитела

11F11 снижали степень связывания аналогично или более эффективно чем химерное антитело 11F11. Nhu11F11 (ver.1) (комбинация Hu11F11-VH-v1 и Hu11F11-VLv3 4c), hu11F11 (ver.3) (комбинация Hu11F11-VH-v3 и Hu11F11-VLv3 4c) и hu11F11 (ver.4) (комбинация Hu11F11-VH-v4 и Hu11F11-VLv3 4c) демонстрировали высокую эффективность по сравнению с химерным антителом 11F11. ABL2-4 (комбинация Hu11F11-VH2 и Hu11F11-VL4) и hu11F11 (ver.2) (Hu11F11-VH- v2 и Hu11F11-VLv3 4c) продемонстрировали снижающую способность, аналогичную химерному антителу 11F11.

Пример 12. Двухкамерный анализ

Двухкамерный анализ выполняли, чтобы непосредственно проанализировать эффективность гуманизированных антител по настоящему изобретению в ингибировании межклеточного распространения агрегатов альфа-синуклеина. После посева клеток SH-SY5Y (донорные клетки), сверхэкспрессирующих альфа-синуклеин, на вставки, снабженные проницаемой мембраной, и нормальных клеток SH-SY5Y (реципиентные клетки) на покровное стекло в 12-луночной планшете соответственно, вставку с культивируемыми клеточными линиями, сверхэкспрессирующими альфа-синуклеин, размещали сверху и инкубировали в течение ночи. В это же время реципиентные клетки обрабатывали 20 нМ антитела по настоящему изобретению. Затем реципиентные клетки фиксировали 4% формальдегидом, промывали и затем обрабатывали 0,5% Тритон X-100 для создания условия проницаемости. После промывания обрабатывали тем же детектирующим антителом и DAPI, которые использовались в Примере 14, и получали изображения при помощи конфокального микроскопа. Проанализированное изображение представлено на Фиг. 12.

В результате, гуманизированные антитела по настоящему изобретению эффективно снижали степень распространения агрегатов альфа-синуклеина к реципиентным клеткам по сравнению с контрольной группой IgG и, в частности, гуманизированные антитела 11F11 снижали распространение агрегатов альфа-синуклеина к реципиентным клеткам аналогично или более эффективно чем химерное антитело 11F11.

На Фиг. 12 представлен результат анализа эффективности химерных антител и гуманизированных антител по настоящему изобретению в ингибировании межклеточного переноса, при котором агрегаты альфа-синуклеина секретируются нервными клетками, сверхэкспрессирующими альфа-синуклеин, и переносятся в нормальные нервные клетки. Нервные клетки линии SH-SY5Y, сверхэкспрессирующие альфа-синуклеин, посеянные в верхнюю камеру, секретировали альфа-синуклеин вне клетки, и секретированные альфа-

синуклеины переносились к нормальной клеточной линии SH-SY5Y, посеянной на дно 12-луночного планшета. Антитела по настоящему изобретению существенно снижали количество альфа-синуклеина, поступившего в нормальную клеточную линию SH-SY5Y на дне планшета. В частности, гуманизированные антитела клона 11F11, среди гуманизированных антител по настоящему изобретению, показали большее увеличение степени снижения альфа-синуклеина, поступавшего в реципиентные клетки в нижней камере, по сравнению с химерными антителами. Более конкретно, hu11F11 (ver.2) (комбинация Hu11F11-VH-v2 и Hu11F11-VLv3 4c) и hu11F11 (ver.4) (комбинация Hu11F11-VH-v4 и Hu11F11-VLv3 4c) обладали большей ингибиторной активностью по сравнению с химерным антителом и Hu11F11 (ver.1) (комбинация Hu11F11-VH-v1 и Hu11F11-VLv3 4c) и hu11F11 (ver.3) (комбинация Hu11F11-VH-v3 и Hu11F11-VLv3 4c) демонстрировали ингибиторную способность, аналогичную химерному антителу.

Гуманизированные антитела клона 11F11 по настоящему изобретению снижали степень распространения агрегатов альфа-синуклеина, примерно до 22 раз эффективнее по сравнению с контрольной группой IgG. В частности, гуманизированные антитела 11F11 уменьшали распространение агрегатов альфа-синуклеина к реципиентным клеткам аналогично или более эффективно, чем химерные антитела 11F11.

Пример 13. ELISA анализ гуманизированного антитела

Для количественного анализа аффинности связывания химерного антитела (Ch11F11), полученного в Примере 8, и гуманизированных антител (Hu11F11), полученных в Примере 9, проводили сэндвич-ELISA по существу тем же способом, что и в Примере 2-2.

В частности, каждое антитело разбавляли 1/10 в диапазоне концентраций от 0,04 до 400 нМ и наносили на поверхность 96-луночного планшета, а затем каждую лунку обрабатывали фибриллярными агрегатами синуклеина в концентрации 2000 нг/мл. После промывания 1XPBS обрабатывали стрептавидином, конъюгированным с HRP, и вторичным антителом, конъюгированным с биотином, и затем проводили взаимодействие с ТМВ в качестве субстрата. Измеряли поглощение. Результаты показаны на Фиг. 13.

Как показано на Фиг. 13, было подтверждено, что гуманизированные антитела по настоящему изобретению, в частности гуманизированные антитела, производные от химерного 11F11 (гуманизированные антитела 11F11), демонстрировали аффинность связывания, эквивалентную химере от клона 11F11, такие как hu11F11 (ver.1), включающий комбинацию Hu11F11-VH-v1 и Hu11F11-VLv3 4c, hu11F11 (ver.2),

включающий комбинацию Hu11F11-VH-v2 и Hu11F11-VLv3 4с, hu11F11 (ver.3), включающий комбинацию Hu11F11-VH-v3 и Hu11F11-VLv3 4с, hu11F11 (ver.4), включающий комбинацию Hu11F11-VH-v4 и Hu11F11-VLv3 4с, демонстрировали аффинность связывания, эквивалентную химерному клону 11F11, и их значения EC_{50} составляли от 11,5 до 15,1 нМ, что было сопоставимо со значением EC_{50} 12,5 нМ химерного антитела 11F11.

Пример 14. ВІАscore анализ с использованием антитела к альфа-синуклеину

Для количественного анализа аффинности связывания химерных антител (Ch11F11), полученных в Примере 8, и гуманизированных антител (Hu11F11), полученных в Примере 9, проводили ВІАscore анализ по существу согласно методу, описанному в Примере 2-3. Результаты анализа показаны на Фиг. 14 и в Таблице, приведенной ниже.

Таблица 10

Наименование клона	KD (нМ)
Ch11F11	0,02472
Hu11F11_v2	0,0596
Hu11F11_v3	0,0316
Hu11F11_v4	0,0204

В результате, гуманизированные антитела по настоящему изобретению, в частности варианты клона 11F11, то есть hu11F11(ver.2) (комбинация Hu11F11-VH-v2 и Hu11F11-VLv3 4с), hu11F11(ver.3) (комбинация Hu11F11-VH-v3 и Hu11F11-VLv3 4с) и hu11F11(ver.4) (комбинация Hu11F11-VH-v4 и Hu11F11-VLv3 4с), демонстрировали значения KD, аналогичные значениям химерного клона 11F11. Что касается аффинности связывания, гуманизированные клоны демонстрировали значения KD всего лишь $0,02\sim 0,06 \times 10^{-9}$ М, а химерный клон 11F11 демонстрировал значение KD всего лишь $0,02 \times 10^{-9}$ М, что указывало на то, что они обладают высокой аффинностью связывания с агрегатами.

Пример 15. Оценка продуктивности гуманизированного антитела

Химерное антитело 11F11 и четыре (4) гуманизированных варианта 11F11 (Hu11F11(ver.1), Hu11F11(ver.2), Hu11F11(ver.3), Hu11F11(ver.4)) были получены путем трансфекции и культивирования, первичной и вторичной очистки в соответствии с по существу таким же способом, как описано в Примере 8, и анализировали количество и

чистоту антитела в полученных образцах после конечной очистки.

Количество антитела анализировали с помощью спектрофотометра Thermo Scientific™ NanoDrop™. В частности, после установки нуля путем загрузки 1XPBS, вносили определенное количество образца очищенного антитела и измеряли в УФ-области при длине волны 280 нм. Общий выход получали, умножая концентрацию образца, измеренную при помощи NanoDrop™, на общий объем образца и затем получали продуктивность (выход (г/л)) путем деления общего выхода на общий объем. Чистоту окончательно очищенного продукта анализировали при помощи ВЭЖХ на HLC-001 (Agilent серии 1200). В частности, чистоту получали, количественно анализируя отношение основного пика, с использованием 1X PBS и 200 мМ аргинин-НСl (рН 6,8) в качестве подвижной фазы на TSK-GEL G3000SWXL. Результаты анализа продуктивности приведены в Таблице.

Таблица 11.

Образец антитела	Концентрация (мг/мл)	Чистота (% к введенной массе)	Выход (г/л)
Ch11F11(-RD)	5,2	99,5	0,282
Hu11F11_v1	5	100	0,155
Hu11F11_v2	15	98,96	0,423
Hu11F11_v3	5	100	0,100
Hu11F11_v4	5	99,87	0,068

В результате, химерное антитело 11F11 и гуманизированные варианты антитела 11F11, такие как hu11F11(ver.1) (комбинация Hu11F11-VH-v1 и Hu11F11-VLv3 4с), hu11F11(ver.2) (комбинация Hu11F11-VH-v2 и Hu11F11-VLv3 4с), hu11F11(ver.3) (комбинация Hu11F11-VH-v3 и Hu11F11-VLv3 4с) или hu11F11(ver.4) (комбинация Hu11F11-VH-v4 и Hu11F11-VLv3 4с) характеризовались продуктивностью 0,068 ~ 0,423 г/л, что превышало выход антитела, обычно получаемого посредством транзиторной трансфекции. В частности, hu11F11(ver.2) (комбинация Hu11F11-VH-v2 и Hu11F11-VLv3 4с) демонстрировало продуктивность 0,423 г/л, превосходящую значение 0,282 г/л, полученное для химерного антитела 11F11.

Пример 16. Оценка специфического связывания альфа-синуклеина химерным антителом

После получения трех химерных антител 3A9, 9B11 и 11F11 согласно Примеру 8, специфичности связывания антител с альфа-синуклеином сравнивали с результатами ELISA для бета-синуклеина и гамма-синуклеина, которые были гомологами альфа-синуклеина.

Для оценки, каждый из белков человеческого бета-синуклеина (Uniprot: Q16143) (CUSABIO, кат. номер CSB-EP624090HU) и белков человеческого гамма-синуклеина (Uniprot: O76070) (CUSABIO, кат. номер CSB-EP021915HU) наносили на поверхность 96-луночного планшета в концентрации 100 нг/мл, промывали и затем блокировали 5% BSA (бычий сывороточный альбумин) в течение 2 часов. При этом пан-синуклеиновое антитело (santa cruz, кат. номер FL-140, sc-10717, кролик), связывающееся с альфа-синуклеином, бета-синуклеином и гамма-синуклеином, использовали в качестве положительного контроля. После промывки химерные антитела (3A9, 9B11, 11F11), разбавленные до 1/10 от концентрации 400 нМ до 0,04 нМ, обрабатывали в течение 2 ч, промывали PBS и затем обрабатывали козьим антителом к Fc иммуноглобулина человека, конъюгированным с HRP в качестве детектирующих антител. После взаимодействия с TMB в качестве субстрата измеряли поглощение при 450 нм и 650 нм. Для положительного контроля в качестве детектирующего антитела использовали козье антитело к IgG кролика, конъюгированное с HRP.

Результаты эксперимента показаны на Фиг. 15а и Фиг. 15б. На Фиг. 15а и Фиг. 15б представлены результаты ELISA, демонстрирующие, что химерные антитела (3A9, 9B11, 11F11) имели очень низкие аффинности связывания с человеческим бета-синуклеином и человеческим гамма-синуклеином. Напротив, использованное в качестве положительного контроля пан-синуклеиновое антитело демонстрировало высокие аффинности связывания с бета-синуклеином и гамма-синуклеином. Фиг. 15а относится к человеческому бета-синуклеину, а Фиг. 15б относится к человеческому гамма-синуклеину.

Кроме того, три антитела взаимодействовали в дот-блот анализе с агрегатами амилоида бета₁₋₄₂ (Uniprot: P05067; номер CAS: 107761-42-2) и тау-белка (Uniprot: P10636-8) и затем анализировали способность антител специфически связываться с агрегатом альфа-синуклеина. Основание для такого анализа пояснено ниже. Амилоид бета₁₋₄₂ и белок тау образуют агрегаты, которые, как полагают, играют важную роль в этиологии нейродегенеративных заболеваний, особенно болезни Альцгеймера, и известно, что эти агрегаты имеют структуру олигомеров, протофибрилл и фибрилл, как и агрегаты альфа-синуклеина. Таким образом, проводили дот-блот анализ, чтобы установить, что химерные

антитела 3A9, 9B11 и 11F11 распознают специфическую последовательность альфа-синуклеина и не распознают общую структуру агрегатов, образованных альфа-синуклеином, амилоидом бета и белком тау.

Дот-блот метод в данном примере проводили по существу таким же способом, как в Примере 2-3, а рекомбинантный амилоид бета₁₋₄₂, белок тау и их агрегаты были получены профессором Seung-jae Lee из Национального университета Сеула. Антитела Syn-1, 6E10 и Tau5 являются антителами, которые, как известно, связываются с альфа-синуклеином, амилоидом₁₋₄₂ и белком тау соответственно. Результаты анализа показаны на Фиг. 15в.

Результаты эксперимента, показанные на Фиг. 15в, свидетельствуют о том, что химерные антитела 3A9, 9B11 и 11F11 по настоящему изобретению специфически связываются только с агрегатами, происходящими от альфа-синуклеина, но не связываются с агрегатами, происходящими от амилоида бета₁₋₄₂ и белка тау. Напротив, антитела 6E10 и Tau5, которые, как известно, связываются с амилоидом₁₋₄₂ и белком тау соответственно, продемонстрировали связывание с соответствующими агрегатами в дот-блот анализе.

Согласно представленным выше результатам, химерные антитела не связываются с гомологами альфа-синуклеина и агрегатами, происходящими от других белков, но эффективно связываются только с целевым белком и поэтому могут обладать улучшенной эффективностью по сравнению с антителами или лекарственными средствами, которые связываются с гомологами и агрегатами, происходящими от других белков.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее(ий)ся с агрегатами α -синуклеина, содержащий

CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6,

CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2 - 4 и SEQ ID NO: 7 - 8,

CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9,

CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 13,

CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 14, и

CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 15.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащее(ий) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2 - 4, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и

переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащее(ий) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7 - 8, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и

переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1),

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где варибельная область тяжелой цепи содержит

каркасную область 1 варибельной области тяжелой цепи (H-FR1), расположенную на N-конце H-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16 - 17 и SEQ ID NO: 35 - 40,

каркасную область варибельной области тяжелой цепи (H-FR2), расположенную между H-CDR1 и H-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18 - 19 и SEQ ID NO: 41 - 44,

каркасную область варибельной области тяжелой цепи (H-FR3), расположенную между H-CDR2 и H-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20 - 31 и SEQ ID NO: 45 - 50, и

каркасную область варибельной области тяжелой цепи (H-FR4), расположенную на C-конце H-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32 - 34 и SEQ ID NO: 51 - 52.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где варибельная область легкой цепи содержит

каркасную область 1 варибельной области легкой цепи (L-FR1), расположенную на N-конце L-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53 - 58 и SEQ ID NO: 71 - 77,

каркасную область варибельной области легкой цепи (L-FR2), расположенную между L-CDR1 и L-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 59 - 61 и SEQ ID NO: 78 - 81,

каркасную область варибельной области легкой цепи (L-FR3), расположенную между L-CDR2 и L-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 62 - 67 и SEQ ID NO: 82 - 88, и

каркасную область варибельной области легкой цепи (L-FR4), расположенную на C-конце L-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 68 - 70 и SEQ ID NO: 89.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, где варибельная область тяжелой цепи содержит

каркасную область 1 тяжелой цепи (H-FR1), расположенную на N-конце H-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), расположенную между H-CDR1 и H-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18 - 19,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), расположенную между H-CDR2 и H-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20 - 31, и

каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), расположенную на C-конце H-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32 - 34, и

вариабельная область легкой цепи содержит

каркасную область 1 легкой цепи (L-FR1), расположенную на N-конце L-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53 - 58,

каркасную область легкой цепи (L-FR2), расположенную между L-CDR1 и L-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 59 - 61,

каркасную область легкой цепи (L-FR3), расположенную между L-CDR2 и L-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 62 - 67, и

каркасную область легкой цепи (L-FR4), расположенную на C-конце L-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 68 - 70.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где вариабельная область тяжелой цепи содержит

каркасную область 1 тяжелой цепи (H-FR1), расположенную на N-конце H-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 35 - 40,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), расположенную между H-CDR1 и H-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 41 - 44,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), расположенную между H-CDR2 и H-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 45 - 50, и

каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), расположенную на C-конце H-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 51 - 52, и

вариабельная область легкой цепи содержит

каркасную область 1 легкой цепи (L-FR1), расположенную на N-конце L-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 71 - 77,
каркасную область легкой цепи (L-FR2), расположенную между L-CDR1 и L-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 78 - 81,
каркасную область легкой цепи (L-FR3), расположенную между L-CDR2 и L-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 82 - 88, и
каркасную область легкой цепи (L-FR4), расположенную на C-конце L-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 89.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 90 - 101 или SEQ ID NO: 102 - 108; аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% или более аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 90 - 101 или SEQ ID NO: 102 - 108; или аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% или более аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 90 - 101 или SEQ ID NO: 102 - 108.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 109 - 115 или SEQ ID NO: 116 - 123; аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% или более аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 109 - 115 или SEQ ID NO: 116 - 123; или аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% или более аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 109 - 115 или SEQ ID NO: 116 - 123.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащее(ий) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 90 - 101, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 109 - 115.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащее(ий) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 102 - 108, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 116 - 123.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащее(ий) переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 127 и переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 128,

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 129 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 130,

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 131 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 132,

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 133 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 134,

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 135 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 136, или

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 137 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 138.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, которое(ый) является выделенным и связывается с агрегатом альфа-синуклеина, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело, Fab фрагмент, Fab' фрагмент, F(ab') фрагмент, диатело или scFv.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 13, которое(ый) является выделенным и связывается с агрегатом альфа-синуклеина, где моноклональное антитело представляет собой форму IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 14, которое(ый) является выделенным и связывается с агрегатом альфа-синуклеина, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует межклеточную передачу агрегата альфа-синуклеина, разрушает агрегат альфа-синуклеина или ингибирует образование агрегата альфа-синуклеина.

16. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 14.

17. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по п. 16.

18. Клетка, трансфицированная экспрессионным вектором по п. 17.

19. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 14.

20. Композиция по п. 19, где композиция, применяемая для лечения α -синуклеинопатии, дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

21. Композиция по п. 20, где α -синуклеинопатия включает болезнь Паркинсона (PD), болезнь Паркинсона с деменцией (PDD), деменцию с тельцами Леви (DLB), вариант

болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBV), комбинированную болезнь Альцгеймера и Паркинсона или множественную системную атрофию (MSA).

21. Способ определения агрегата альфа-синуклеина в биологическом образце *in vivo* или *in vitro*, включающий обеспечение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1 - 14 и приведение биологического образца, в котором следует определить агрегат альфа-синуклеина, в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

22. Способ лечения α -синуклеинопатии у субъекта или регулирования концентрации агрегатов альфа-синуклеина у субъекта, включающий стадию введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1 – 14 или содержащей их композиции в фармацевтически эффективном количестве субъекту, который нуждается в лечении α -синуклеинопатии и/или в регулировании концентрации агрегатов альфа-синуклеина.

23. Способ по п. 22, где α -синуклеинопатия включает болезнь Паркинсона (PD), болезнь Паркинсона с деменцией (PDD), деменцию с тельцами Леви (DLB), вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBV), комбинированную болезнь Альцгеймера и Паркинсона или множественную системную атрофию (MSA).

24. Способ диагностирования α -синуклеинопатии у субъекта, включающий определение концентрации и/или межклеточной локализации агрегата альфа-синуклеина у субъекта путем использования антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1 - 14 и

сравнение концентрации и/или межклеточной локализации агрегата альфа-синуклеина, определенных у субъекта, с таковыми в контрольном образце, где сходство или различие по сравнению с результатом контрольного образца указывает на наличие у субъекта α -синуклеинопатии.

25. Способ по п. 24, где α -синуклеинопатия включает болезнь Паркинсона (PD), болезнь Паркинсона с деменцией (PDD), деменцию с тельцами Леви (DLB), вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBV), комбинированную болезнь Альцгеймера и Паркинсона или множественную системную атрофию (MSA).

26. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1 - 14 или композиции, содержащей их, для лечения α -синуклеинопатии у субъекта, где антигенсвязывающий фрагмент ингибирует межклеточный перенос агрегата альфа-синуклеина, разрушает агрегат альфа-синуклеина или ингибирует образование агрегата

альфа-синуклеина в головном мозге субъекта.

27. Применение по п. 26, где α -синуклеинопатия включает болезнь Паркинсона (PD), болезнь Паркинсона с деменцией (PDD), деменцию с тельцами Леви (DLB), вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBV), комбинированную болезнь Альцгеймера и Паркинсона или множественную системную атрофию (MSA).

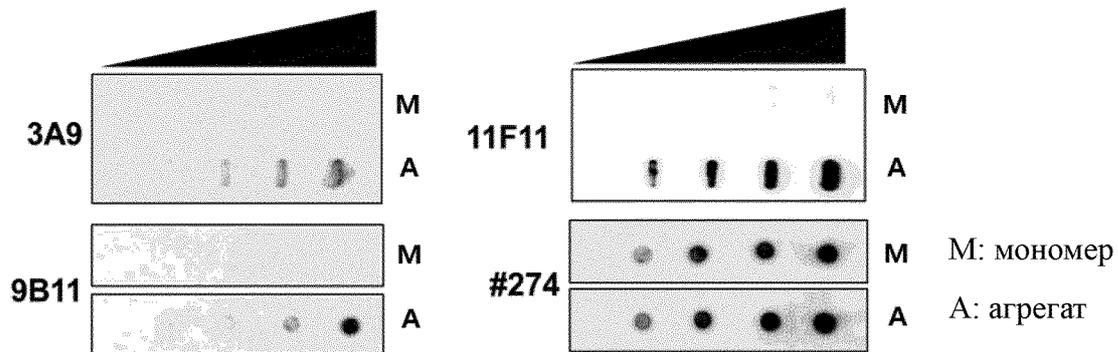
28. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1 - 14 или содержащей их композиции для регулирования концентрации агрегата альфа-синуклеина в клетках головного мозга, где антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или содержащая их композиция ингибирует межклеточный перенос агрегата альфа-синуклеина, разрушает агрегат альфа-синуклеина или ингибирует образование агрегата альфа-синуклеина в головном мозге субъекта.

29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 14 для применения в регулировании концентрации агрегатов альфа-синуклеина в клетках головного мозга путем ингибирования межклеточного переноса агрегата альфа-синуклеина, разрушения агрегата альфа-синуклеина или ингибирования образования агрегата альфа-синуклеина.

30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 14 для применения в лечении α -синуклеинопатии.

31. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 30, где α -синуклеинопатия включает болезнь Паркинсона (PD), болезнь Паркинсона с деменцией (PDD), деменцию с тельцами Леви (DLB), вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBV), комбинированную болезнь Альцгеймера и Паркинсона или множественную системную атрофию (MSA).

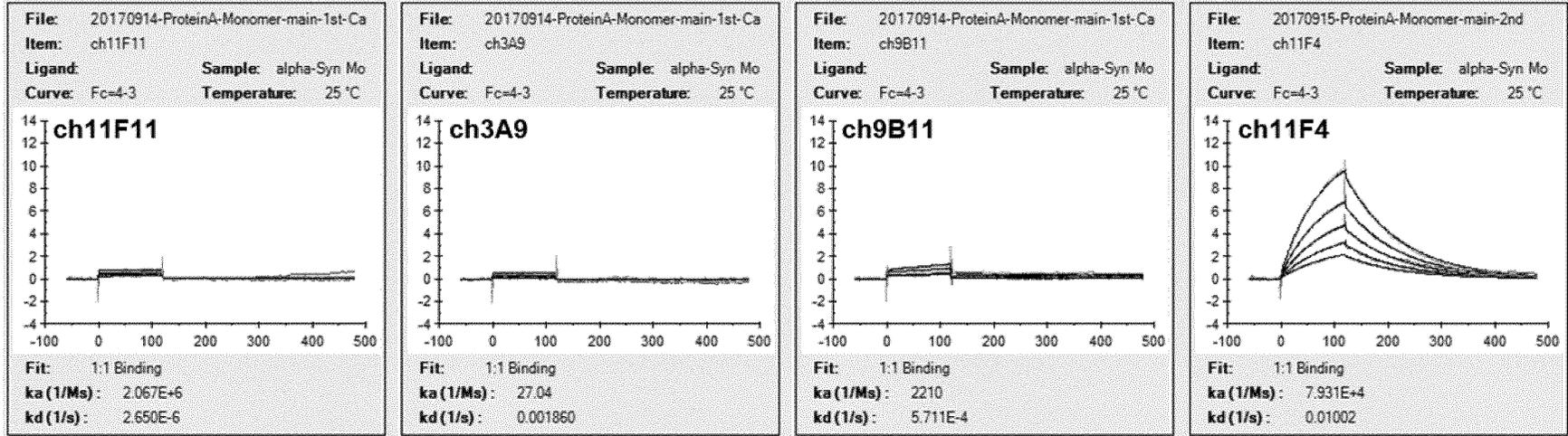
Фиг. 1



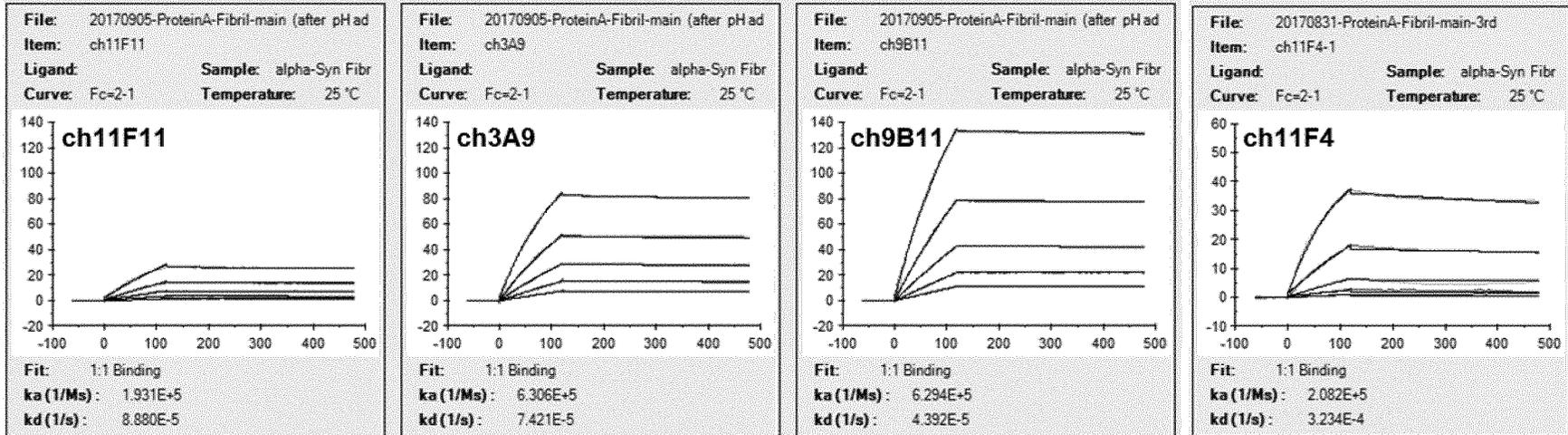
Фиг. 2

Клоны	EC50 (нг/мл)		EC50 (нМ)	
	мономеры	фибриллы	мономеры	фибриллы
3A9	-	319.4	-	2.129
9B11	-	184.9	-	1.233
11F11	-	326.5	-	2.177

Сенсограммы с мономерами



Сенсограммы с фибриллами

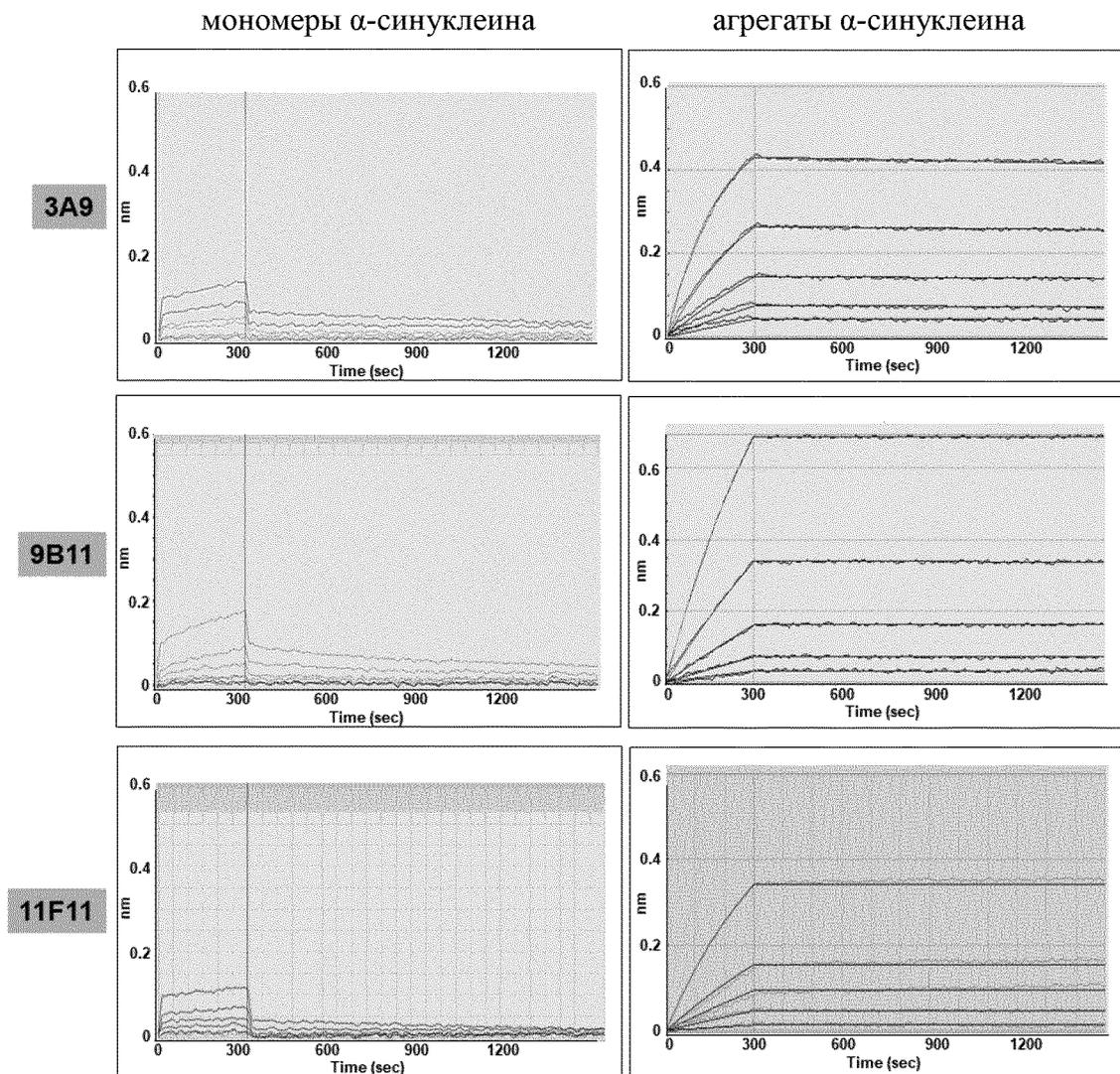


Фиг. 3б

Клоны	KD (M, X 10 ⁻⁹)	
	мономеры	фибриллы
3A9	-	1.320
9B11	-	0.904
11F11	-	2.873

«-» исследовали, но нет данных

Фиг. 4а

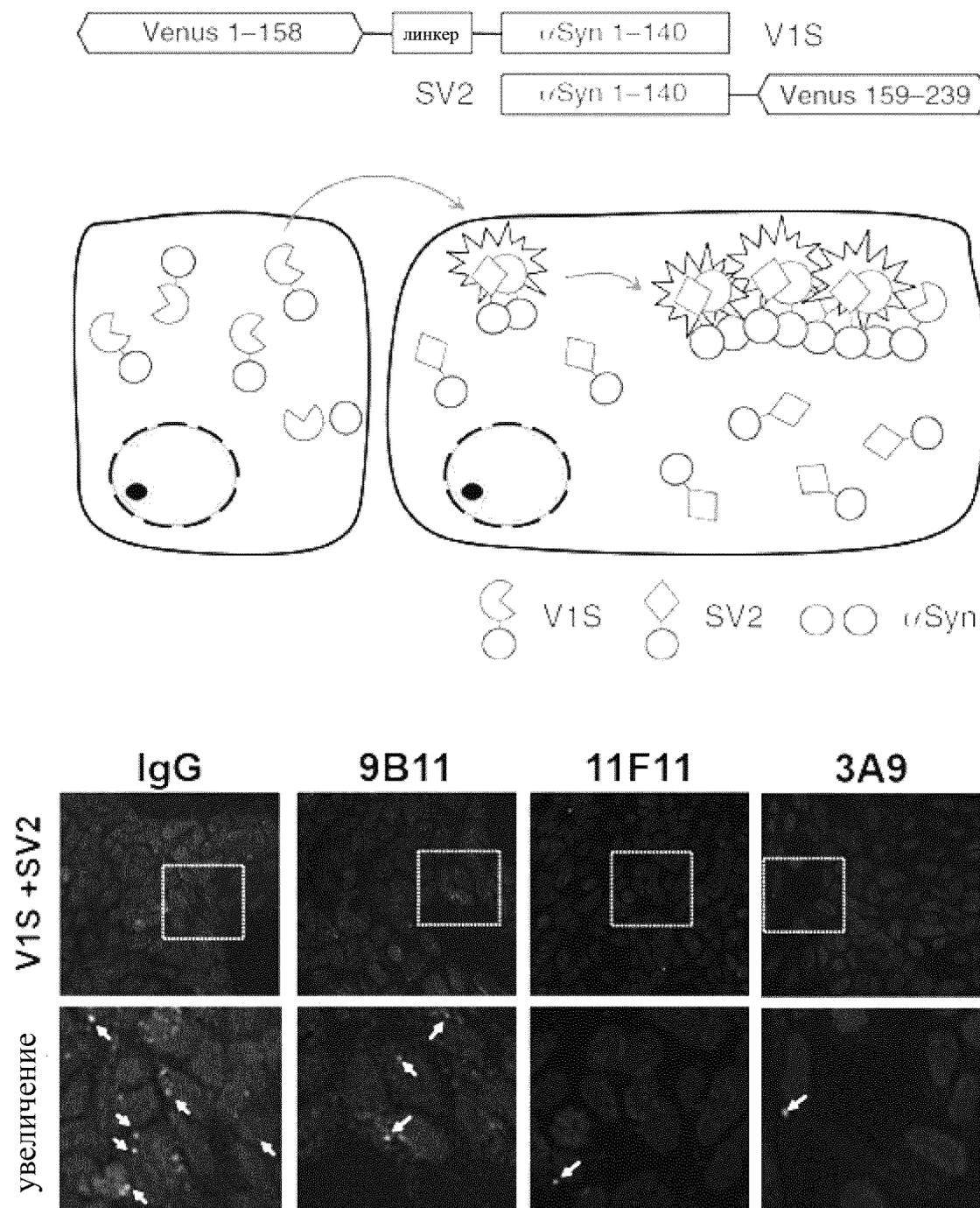


Фиг. 46

Клоны	KD (10^{-9} M)	
	мономеры	фибриллы
3A9	-	0.13
9B11	-	0.018
11F11	-	0.16

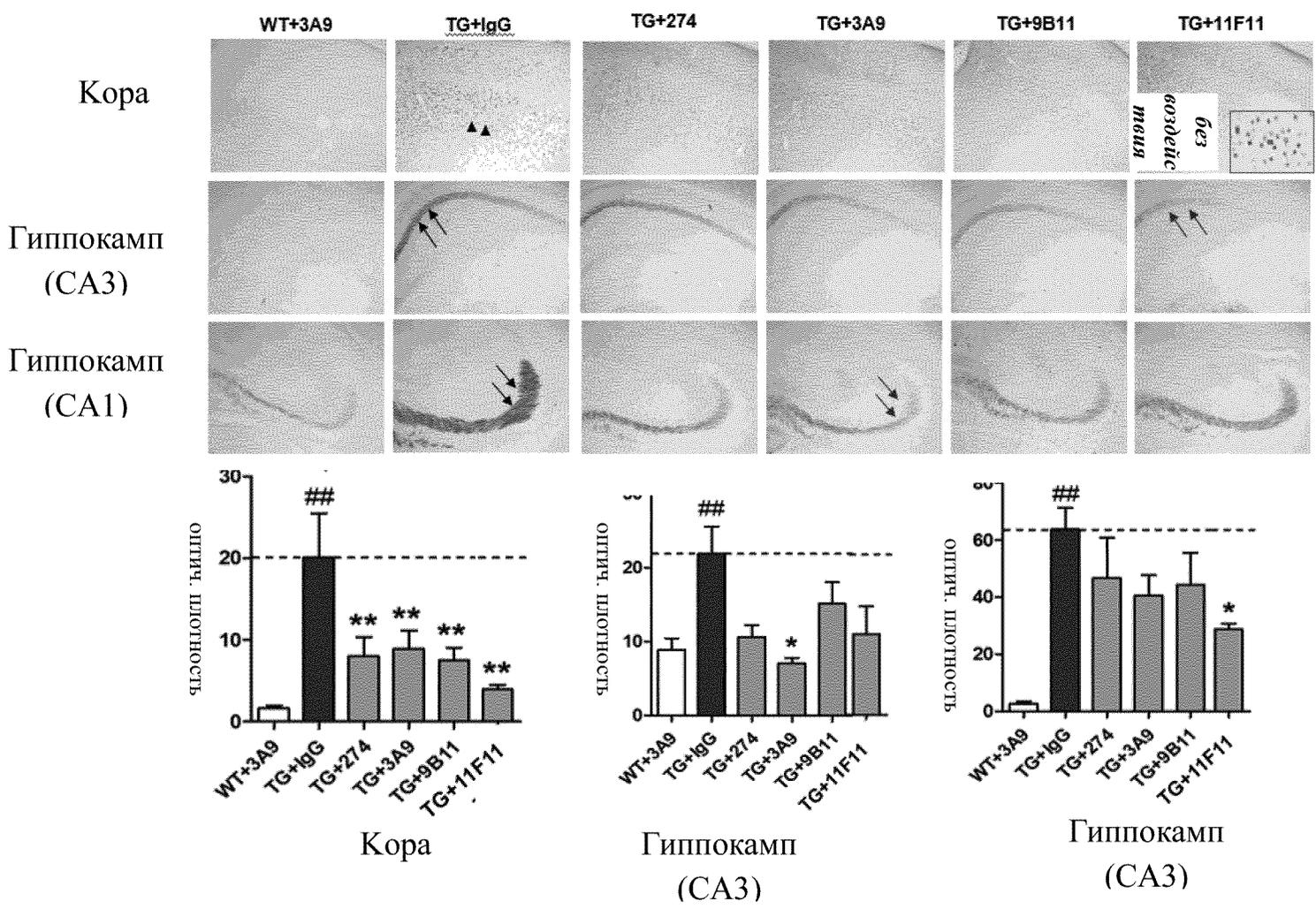
«-» исследовали, но нет данных

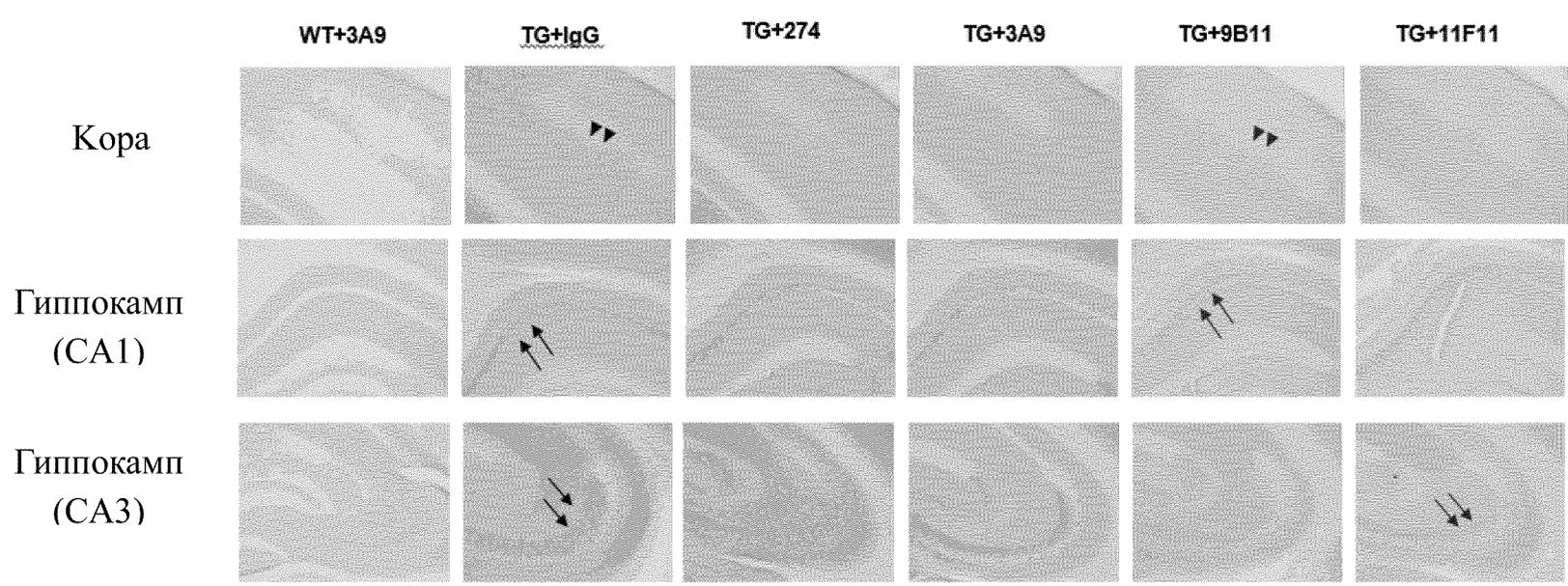
Фиг. 5



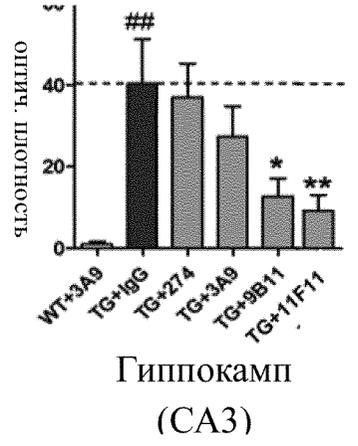
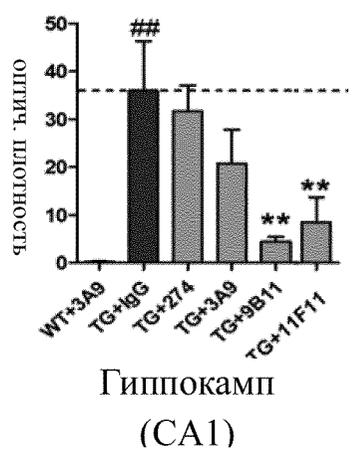
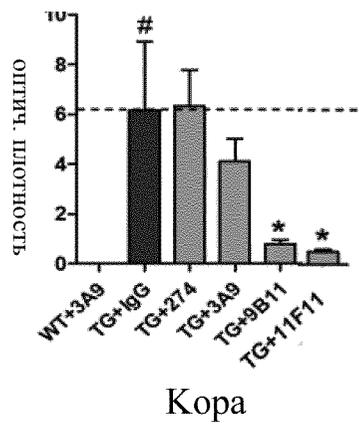
Концентрация антитела: 50 μ кг/мл

Фиг. 6а

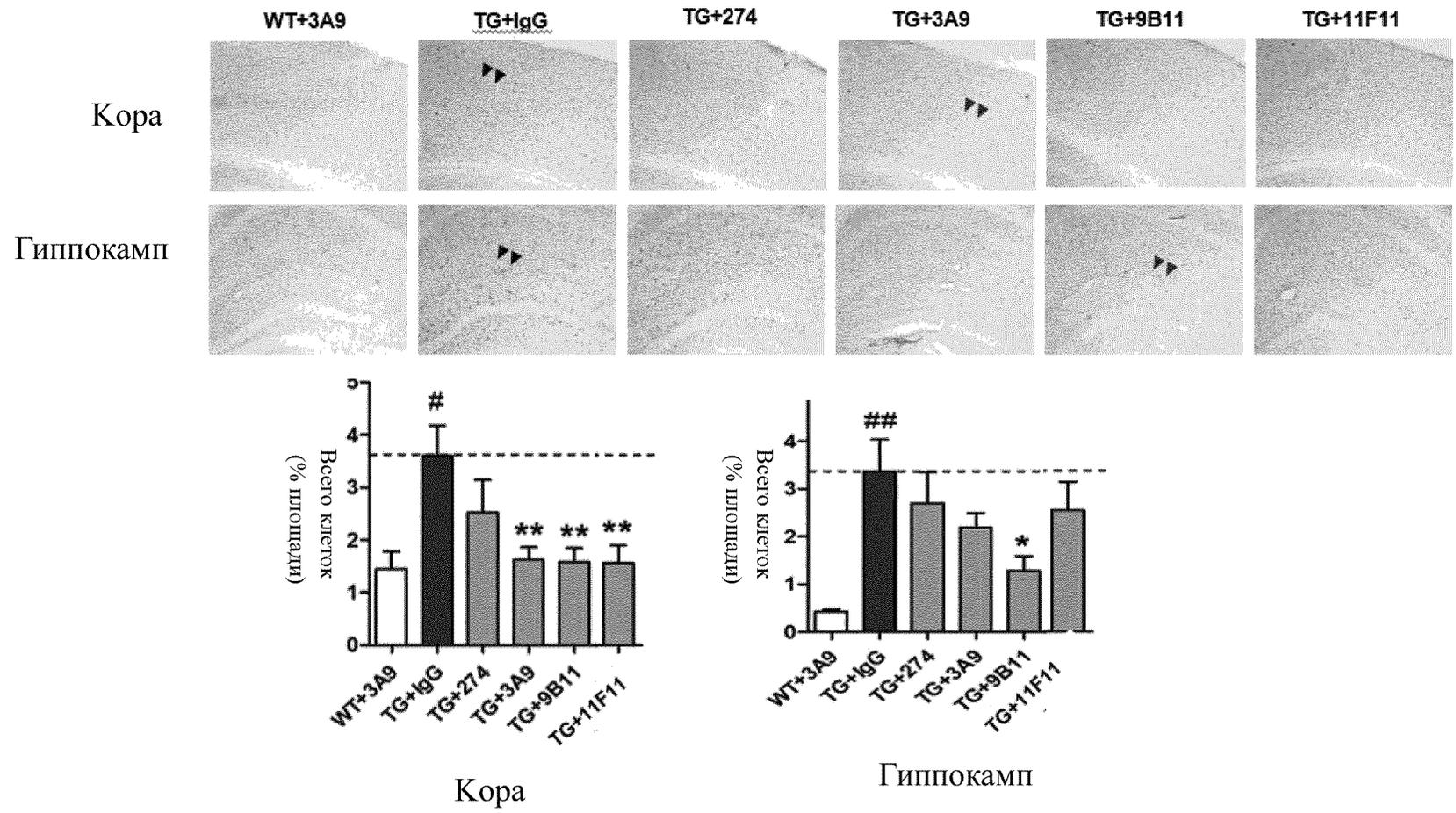




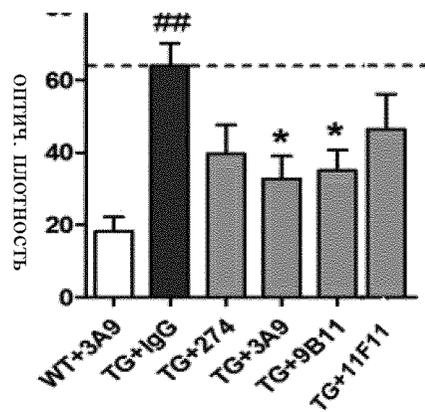
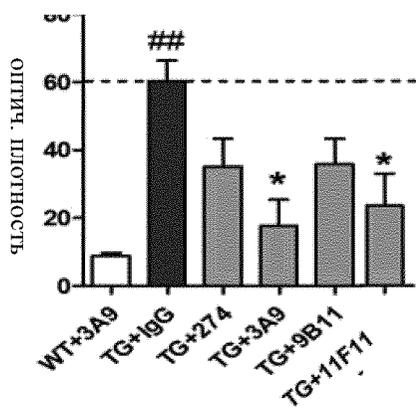
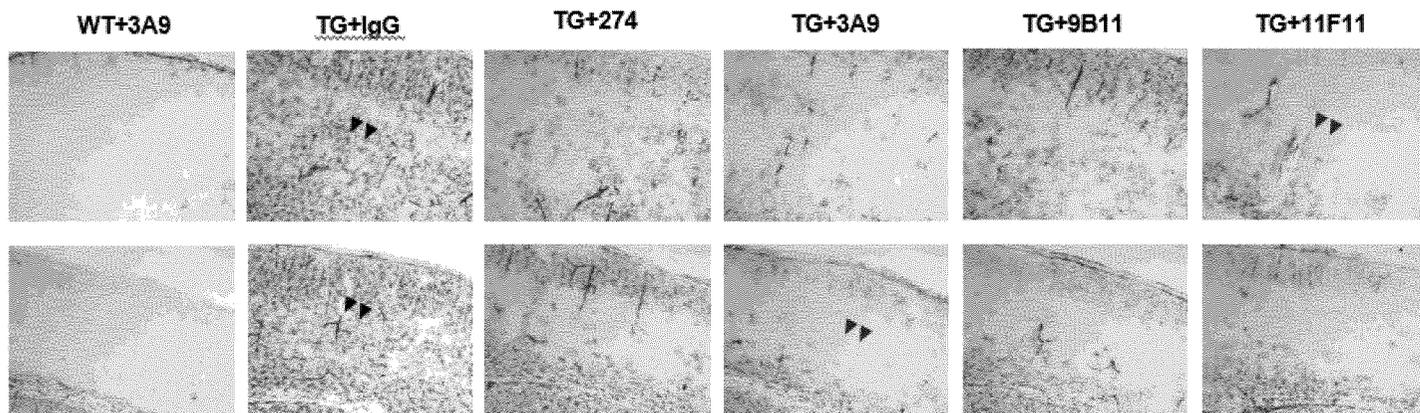
Фиг. 66



Фиг. 7а

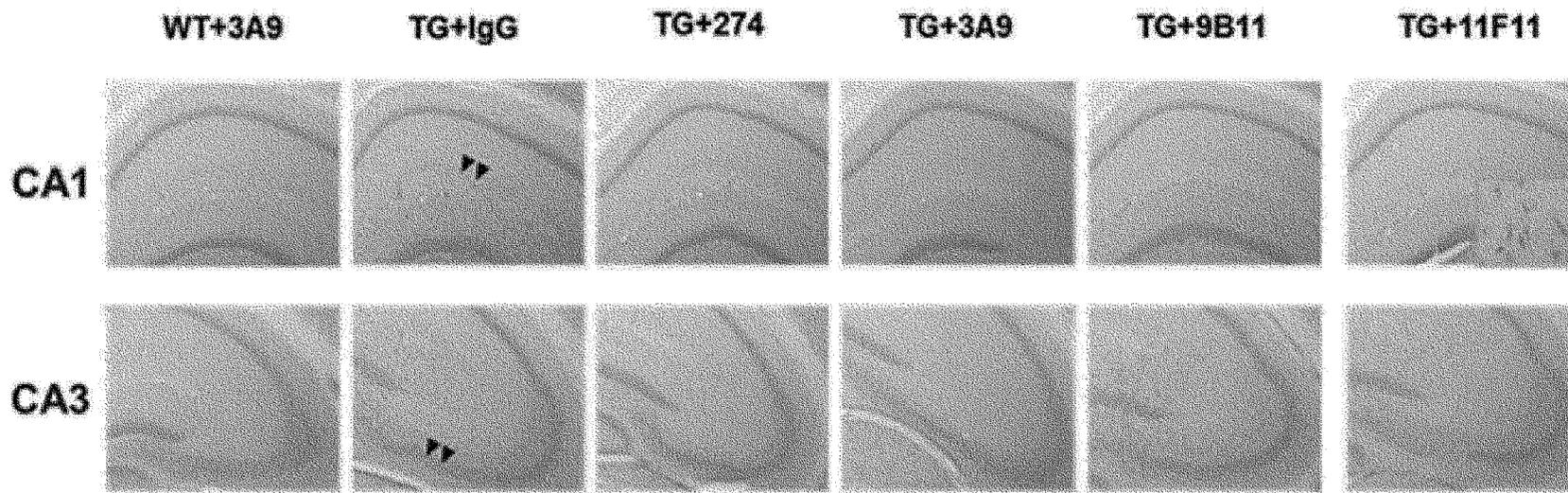


Кора

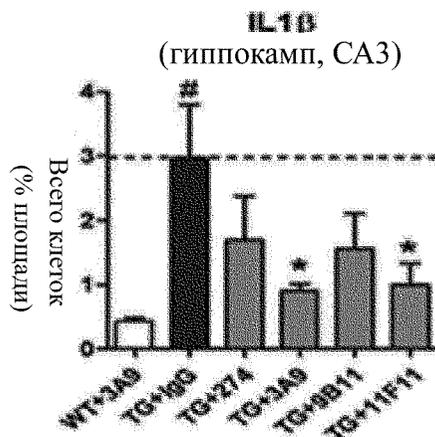
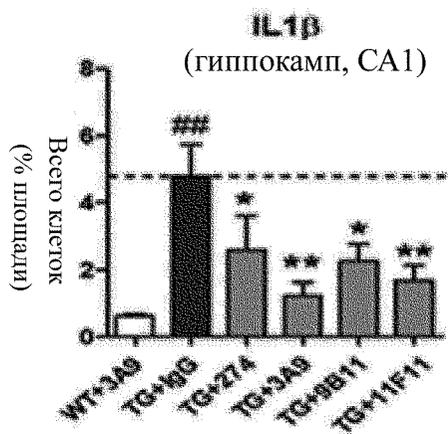


Фиг. 76

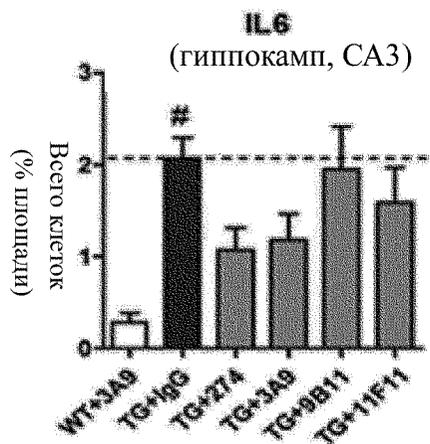
Маркер: IL1 β ; зона: гиппокамп



Фиг. 7в

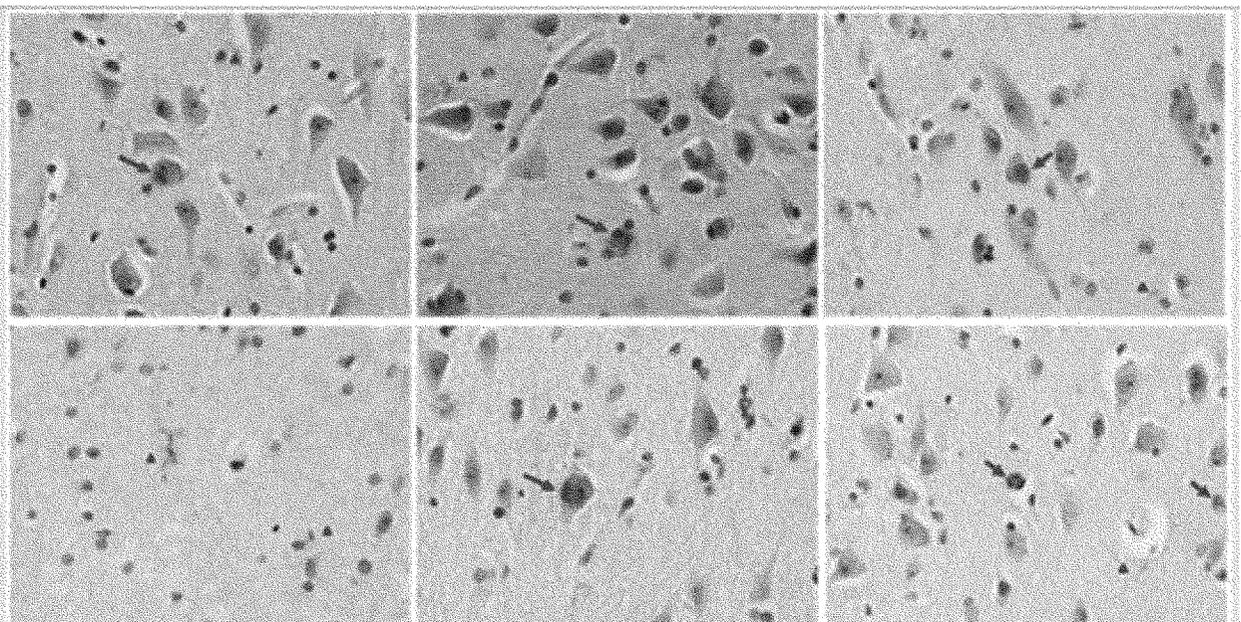


Маркер: IL6; зона: гиппокамп



Фиг. 7г

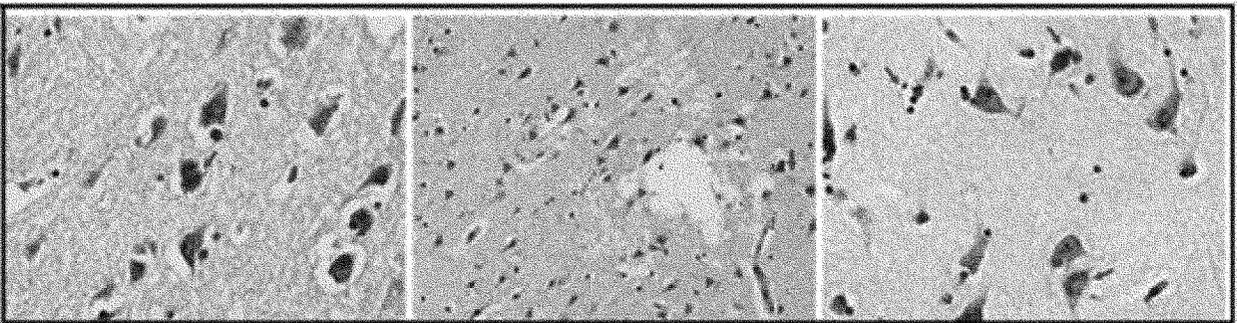
Фиг. 8а



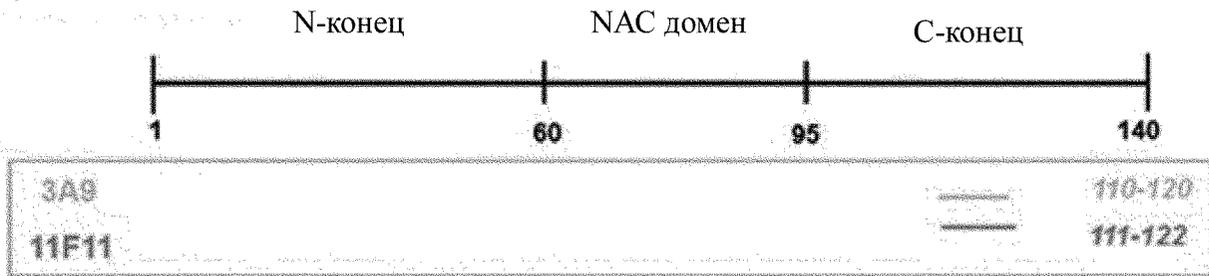
3A9

Фиг. 86

11F11

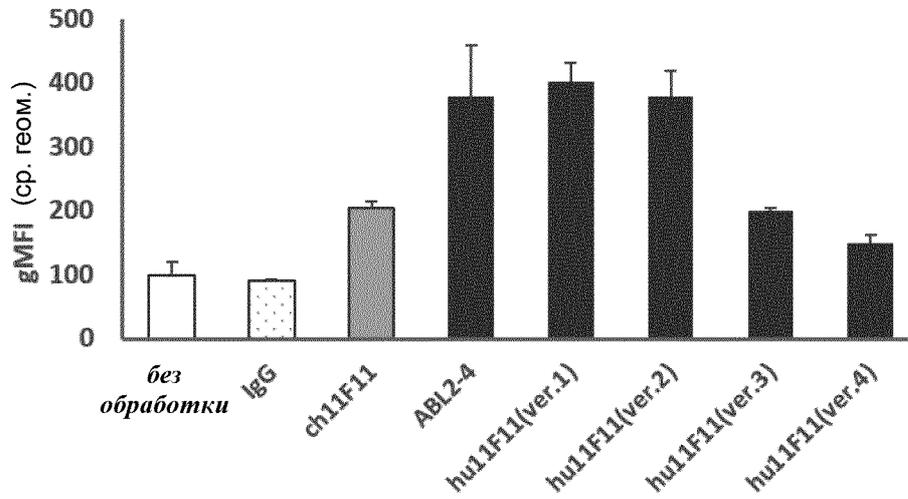


Альфа-синуклеин

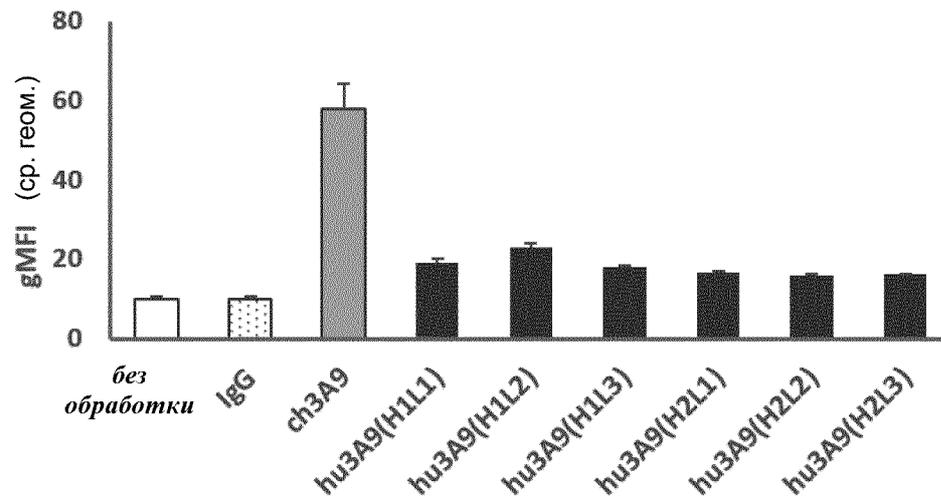


Фиг. 9

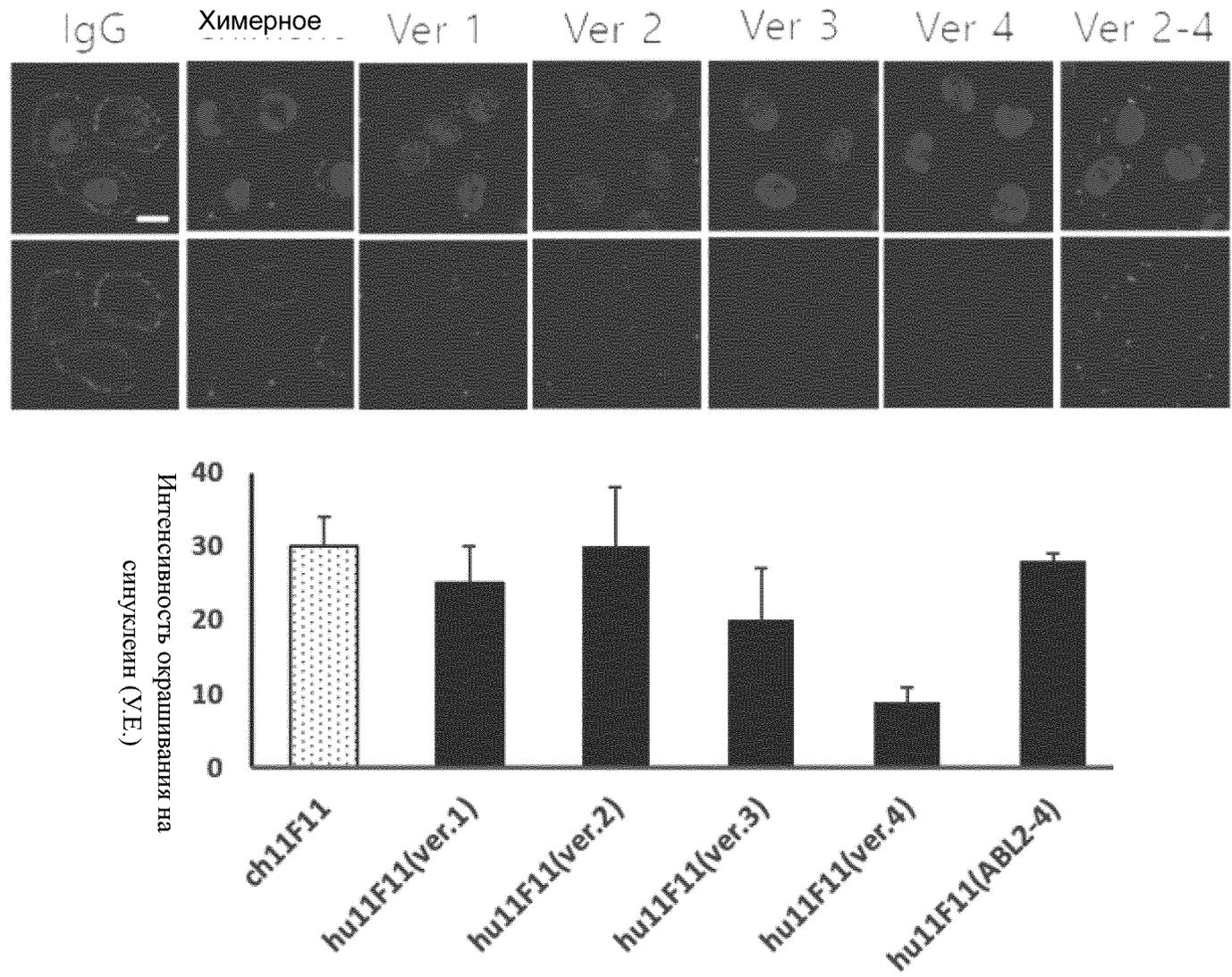
Фиг. 10а



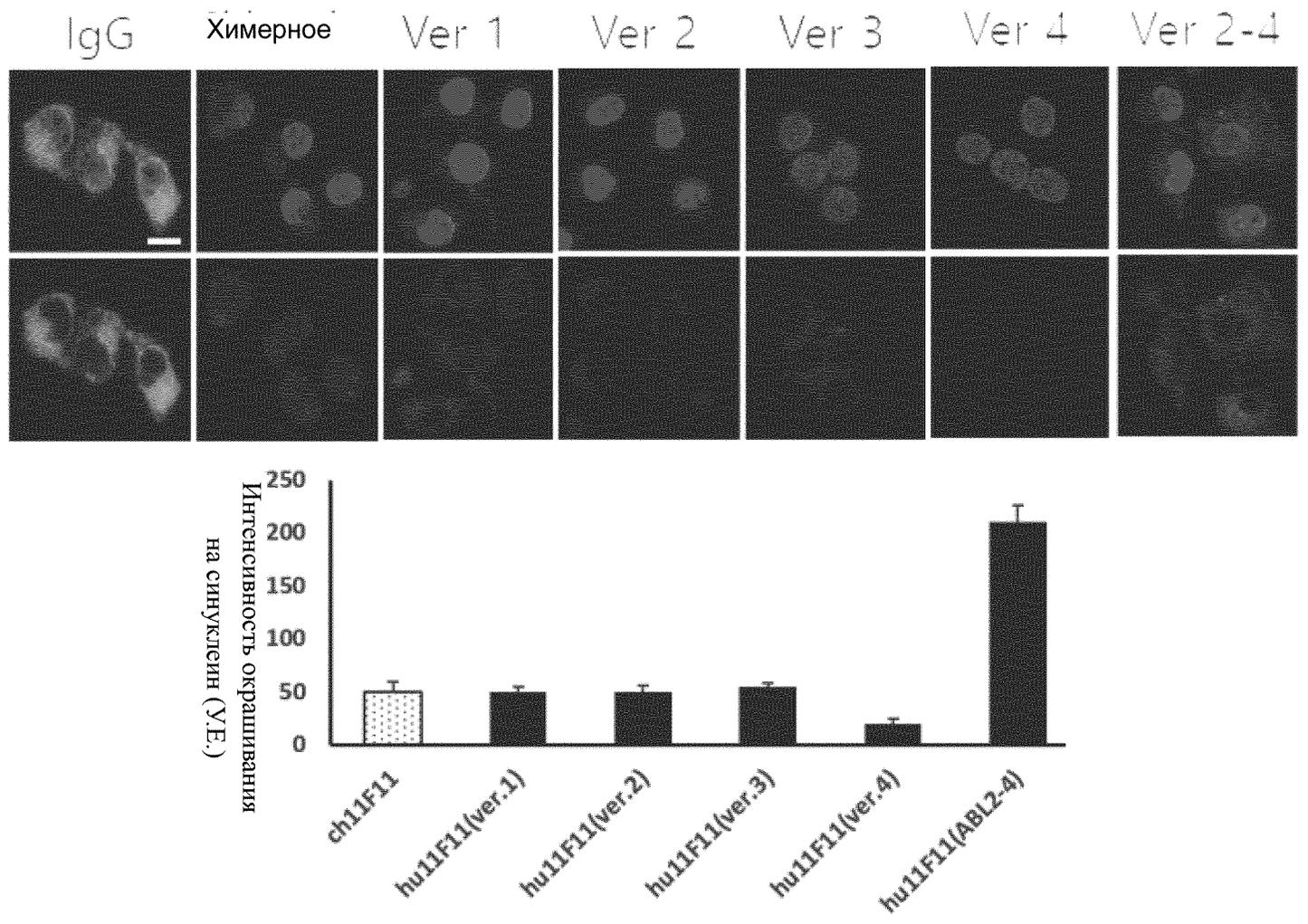
Фиг. 10б



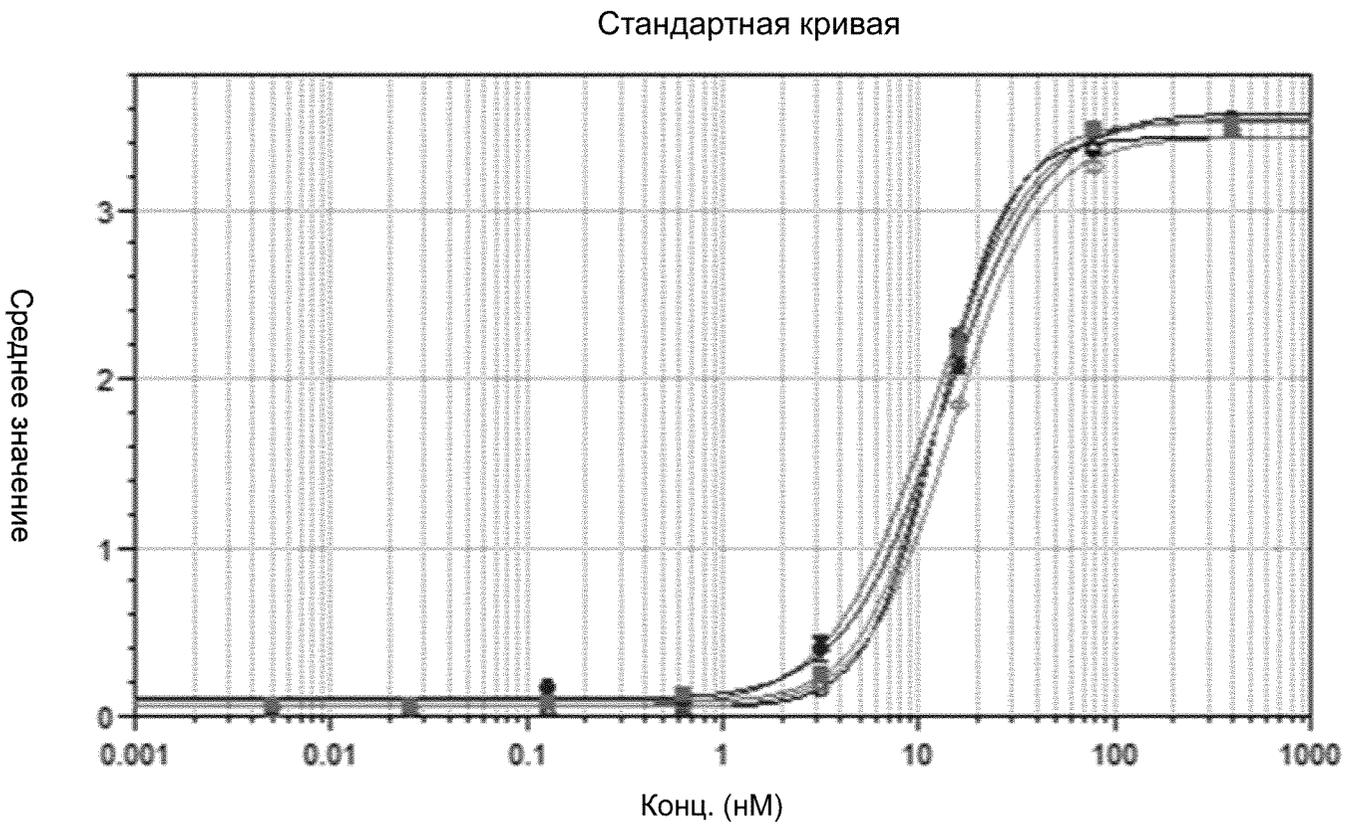
Фиг. 11



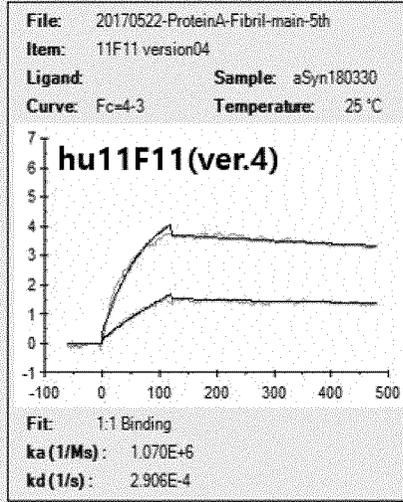
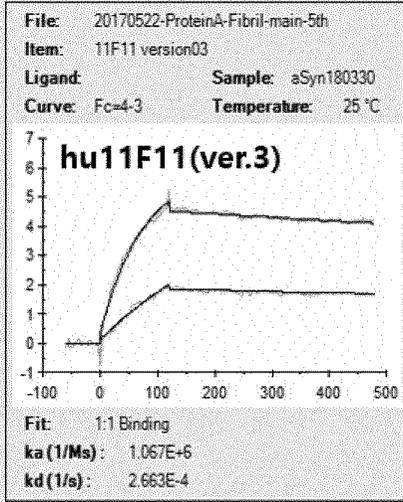
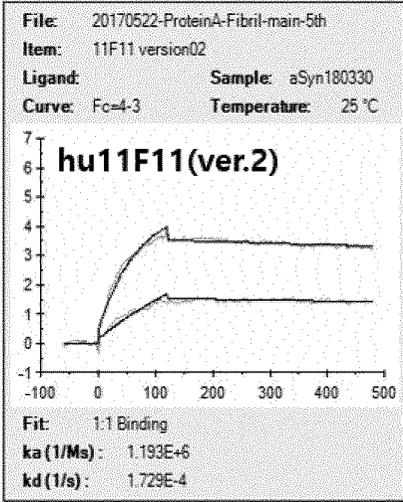
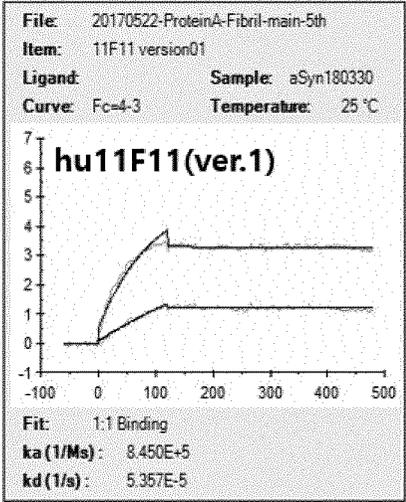
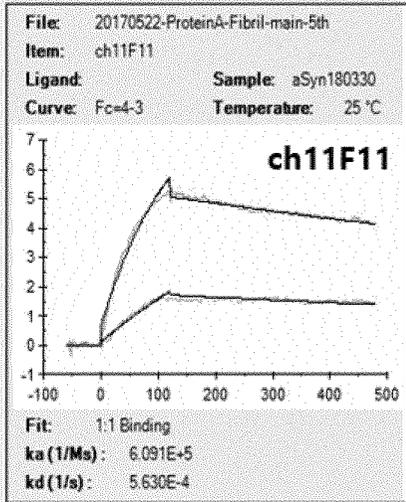
Фиг. 12



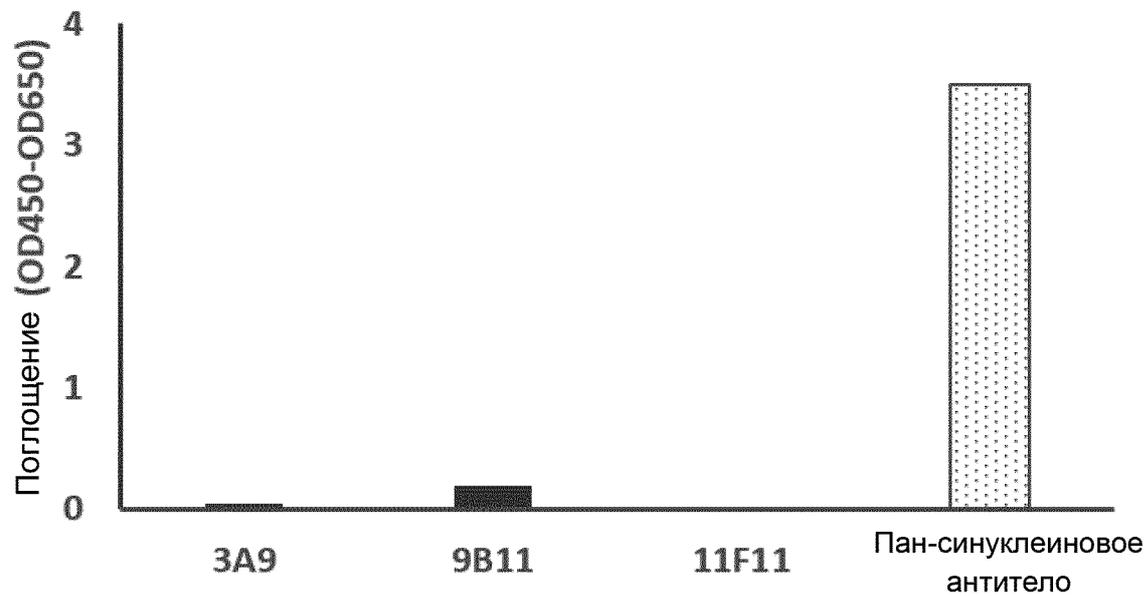
Фиг. 13



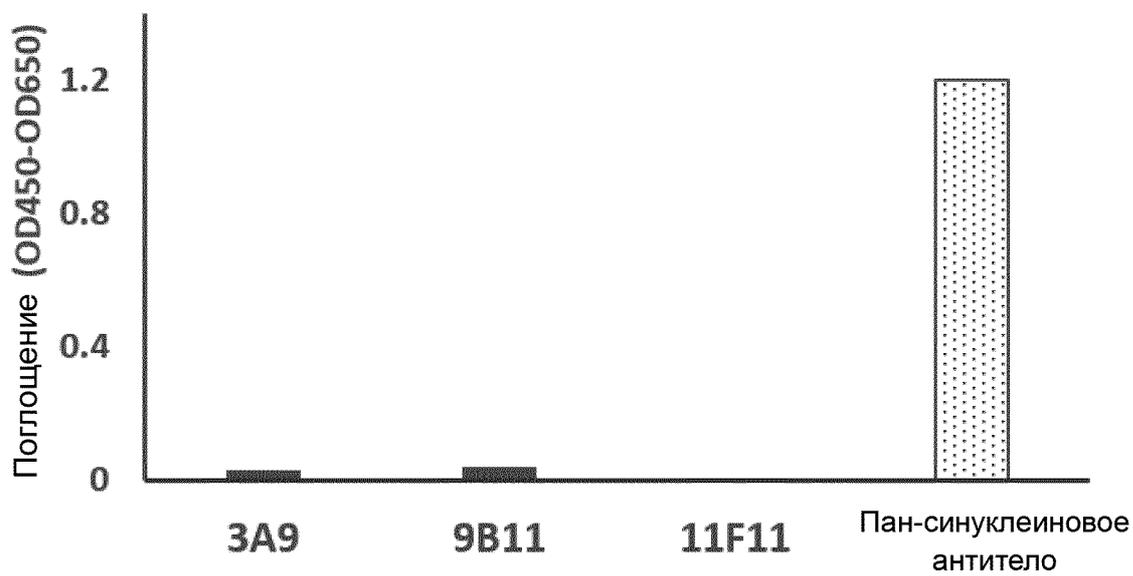
	4-PL Fit: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$:	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
○ Гр№1 (ch11F11(-RD): Конц.против ср.знач.		0.0493	2.44	12.5	3.43	1
△ Гр№3 (hu11F11(ver.1)Конц.против ср.знач.		0.0532	1.69	11.5	3.55	1
◇ Гр№4 (hu11F11(ver.2)Конц.против ср.знач.		0.047	1.96	15.1	3.43	1
● Гр№5 (hu11F11(ver.3): Конц.против ср.знач.		0.0958	1.71	13.4	3.58	0.999
■ Гр№6 (hu11F11(ver.4): Конц.против ср.знач.		0.0791	2.18	12.9	3.52	1



Фиг. 15а



Фиг. 15б



Фиг. 15в

