



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.04

(21) Номер заявки
201790433

(22) Дата подачи заявки
2015.09.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) ПРОИСХОДЯЩЕЕ ОТ ЧЕЛОВЕКА АНТИТЕЛО К ДИПЕПТИДНЫМ ПОВТОРАМ (DPR)

(31) 14187180.6; 15180310.3

(32) 2014.09.30; 2015.08.07

(33) EP

(43) 2017.09.29

(86) PCT/EP2015/072516

(87) WO 2016/050822 2016.04.07

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

(72) Изобретатель:
Монтрасио Фабио, Гримм Ян (CH)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) DAVID MA MANN ET AL.: "Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9ORF72", ACTA NEUROPATHOLOGICA COMMUNICATIONS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 1, no. 1, 14 October 2013 (2013-10-14), page 68, XP021165579, ISSN: 2051-5960, DOI: 10.1186/2051-5960-1-68 page 2, right-hand column, paragraph 4 page 7; table 2 page 9; figure 4

T. ZU ET AL.: "RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 110, no. 51, 17 December 2013 (2013-12-17), pages E4968-E4977, XP055236442, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1315438110 page E4970, right-hand column, paragraph 1 page E4970, right-hand column, paragraph 3

US-A1-2014206102

WO-A1-2014114303

K. MORI ET AL.: "The C9ORF72 GGGGCC Repeat Is Translated into Aggregating Dipeptide-Repeat Proteins in FTLD/ALS", SCIENCE, vol. 339, no. 6125, 7 February 2013 (2013-02-07), pages 1335-1338, XP055173733, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1232927 abstract figures 2,3

K. MORI ET AL.: "The C9ORF72 GGGGCC Repeat Is Translated into Aggregating Dipeptide-Repeat Proteins in FTLD/ALS-Supplementary materials", Science, 7 February 2013 (2013-02-07), pages 1-13, XP055174279, DOI: 10.1126/science.1232927 Retrieved from the Internet: URL: <http://www.sciencemag.org/content/suppl/2013/02/06/science.1232927.DC1/Mori.SM.pdf> [retrieved on 2015-03-05] page 2, paragraph 1

IAN R. MACKENZIE ET AL.: "Dipeptide repeat protein pathology in C9ORF72 mutation cases: clinico-pathological correlations", ACTA NEUROPATHOLOGICA, vol. 126, no. 6, 1 December 2013 (2013-12-01), pages 859-879, XP055174280, ISSN: 0001-6322, DOI: 10.1007/s00401-013-1181-y page 862, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column, paragraph 2 page 875, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 page 877, right-hand column, paragraph 2

STEINITZ MICHAEL: "Three decades of human monoclonal antibodies: past, present and future developments", HUMAN ANTIBODIES, IOS PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 18, no. 1-2, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 1-10, XP002639799, ISSN: 1093-2607, DOI: 10.3233/HAB-2009-0196 [retrieved on 2009-05-28] the whole document

S. MIZIELINSKA ET AL.: "C9ORF72 repeat expansions cause neurodegeneration in Drosophila through arginine-rich proteins", SCIENCE, vol. 345, no. 6201, 7 August 2014 (2014-08-07), pages 1192-1194, XP055173788, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1256800 the whole document

(57) В изобретении предложены новые антитела человека и антигенсвязывающие фрагменты указанных антител, которые связываются с белком, содержащим дипептидный повтор (DPR-белок) поли-глицин-аланин (GA)₁₅, транслируемый с открытой рамки считывания 72 (C9ORF72) хромосомы 9, а также полинуклеотиды, экспрессионные векторы и клетки хозяева для получения антител и антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению. Кроме того, предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению, предназначенные для иммунотерапевтического лечения, профилактики или диагностики заболеваний или расстройств, связанных с DPR-белками и/или агрегатами C9ORF72, а также соответствующие способы. В область изобретения также включены способы получения антител и антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению

и количественные способы детекции *in vivo* белка, содержащие дипептидный повтор (DPR) поли-глицин-аланин (GA) у субъекта, такой как C9ORF72.

038285 B1

038285 B1

Область техники

В настоящем изобретении в целом предложены способы лечения и диагностики на основе антител. В частности, настоящее изобретение относится к новым молекулам, специфично связывающимся с нетрадиционными продуктами ATG-независимой трансляции, в частности гексануклеотидных повторов, образующих дипептидные повторы (DPR), и с антигенами, содержащими указанные DPR, причем указанные молекулы можно применять при диагностике заболеваний и состояний, индуцированных агрегированными DPR и DPR-содержащими белками соответственно. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены происходящие от человека антитела, а также их фрагменты, производные и биотехнологические варианты, которые распознают DPR, обнаруженные в открытой рамке считывания 72 хромосомы 9 (C9ORF72), такие как повторы полиглицин-аланин, повторы полиглицин-пролин, повторы полиглицин-аргинин, повторы полипролин-аланин или повторы полипролин-аргинин, и которые можно применять при лечении и диагностике заболеваний и состояний, вызванных агрегированными C9ORF72-DPR. Помимо этого настоящее изобретение относится к фармацевтическим и диагностическим композициям, содержащим указанные связывающие молекулы, антитела и имитирующие их молекулы, которые можно применять в качестве диагностического инструмента для выявления заболеваний, связанных с DPR или их агрегатами, а также в качестве стратегии пассивной вакцинации для лечения указанных заболеваний, например лобно-височной долевого дегенерации (FTLD), латерального амиотрофического склероза (ALS), FTLD-ALS и спиноцереbellарной атаксии типа 36.

Лобно-височная доля дегенерация (FTLD) относится к группе клинически, патофизиологически и генетически гетерогенных заболеваний, связанных с атрофией в лобной доле и височной доле головного мозга. Указанное заболевание является второй по частоте причиной раннего начала деменции. Когнитивные симптомы могут быть различными и включают деменцию, изменения поведения, а также расстройства личности, нарушения речи и/или психоз, которые обусловлены дегенерацией коры лобной и височной долей головного мозга. На основании симптомов FTLD можно разделить на три группы: (i) поведенческо-вариантная лобно-височная деменция (bvFTLD), (ii) семантическая деменция (SD) или (iii) прогрессирующая нефункциональная афазия (PNFA). Пациенты с FTLD умирают через 5-10 лет после возникновения симптомов из-за отсутствия надлежащего способа лечения. Однако было показано, что 50% пациентов с FTLD имеют положительную семейную историю и по сравнению с пациентами, страдающими латеральным амиотрофическим склерозом (ALS), по-видимому, представляют собой континуум заболевания с общим патогенезом. Несмотря на то, что оба аутосомно-доминантных расстройства, как было показано, являются генетически и патологически гетерогенными, см., например, Vance et al., *Brain* 129 (2006), 868-876, генетический анализ позволил выявить гетерозиготный удлинённый гексануклеотидный повтор (GGGGCC), расположенный между некодирующими экзонами 1a и 1b гена C9ORF72, в качестве наиболее распространенной генетической причины FTLD и ALS; см., например, DeJesus-Hernandez et al., *Neuron* 72 (2011), 245-256 и Renton et al., *Neuron* 72 (2011), 257-268. В частности, было показано, что нетрадиционная ATG-независимая трансляция смыслового транскрипта в трех альтернативных рамках считывания, т.е. удлинённых гексануклеотидных повторов, приводит к синтезу, выработке и агрегации трех различных полипептидов, каждый из которых состоит из повторяющихся блоков, содержащих две аминокислоты (дипептидные повторы, DPR), т.е. поли(Cly-Ala; GA), поли(Gly-Pro, GP) и поли(Gly-Arg, GR). Помимо этого трансляция соответствующих антисмысловых транскриптов приводит к получению поли(Pro-Arg, PR), поли(Pro-Ala; PA) и поли(Gly-Pro, GP). Было показано, что указанные удлинения C9ORF72-дипептидный повтор (DPR), присутствуют почти у 30% пациентов с FTLD, 50% пациентов с ALS и 80% пациентов с FTLD-ALS, при этом самая высокая частота мутаций наблюдается в популяциях европеоидных пациентов в США и ЕС. Помимо этого пациенты, несущие удлинение C9ORF72-DPR с более чем 19 повторами, характеризовались более ранним возрастом начала заболевания, повышенной частотой неврологических расстройств и склонностью к психозу или галлюцинациям по сравнению с пациентами с другими формами FTLD и/или ALS; см., например, Harms et al., *Neurobiol. Aging* 34 (2013), e13-e19.

Однако имеются сообщения о том, что другие заболевания и/или расстройства также, по-видимому, связаны с удлинёнными гексануклеотидных повторов, например спиноцереbellарная атаксия типа 36. Действительно, указанные тандемные повторы (в виде микросателлитов или мини-сателлитов) представляют собой подверженную мутациям ДНК как у эукариотов, так и у прокариотических организмов. Например, поверхностные адгезины клеток бактерий часто содержат мини-сателлитные SD-повторы, кодирующие пару аминокислот серин-аспартат с массивом 18-нуклеотидных повторов, элементы которых соответствуют консенсусной последовательности GAYTCNGAYTCNGAYAGY, в которой N представляет собой любое основание, и Y представляет собой T или C, в частности, в штаммах стафилококка. Было обнаружено, что повторы серин-аспартат (SDR) присутствуют в варибельной повторяющейся области указанных адгезинов, такой как R-домен фактора связывания A (CifA); см., например, Hazenbos et al., *PLOS Pathogens* 9(2013), e1003653.

Способы лечения заболеваний и/или расстройств, связанных с удлинением дипептидного повтора (DPR), например лекарственные средства, которые замедляют прогрессирование заболевания, отсутствуют. До настоящего времени основное внимание в медицинской помощи уделялось предоставлению

фармацевтических препаратов для лечения зачастую очень тяжелых сопутствующих симптомов. Однако до настоящего времени не было получено доказательств, свидетельствующих об эффективном лечении.

Данная техническая проблема решена с помощью вариантов реализации, изложенных в формуле изобретения и дополнительно описанных ниже, а также проиллюстрированных в примерах и фигурах.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложены происходящие от человека моноклональные антитела, способные связываться с дипептидными повторами (DPR) и белками, содержащими DPR (DPR-белки), а также эквивалентные молекулы, связывающие DPR-белки, такие как DPR-связывающие фрагменты, синтетические варианты и биотехнологические производные антител, раскрытых в настоящем документе в качестве примера, которые являются особенно подходящими при профилактическом или терапевтическом лечении заболеваний и состояний, связанных с DPR-белками и их агрегированными формами. Более конкретно в настоящем изобретении предложены происходящие от человека антитела и эквивалентные молекулы, связывающие DPR-белки, пригодные для терапевтического применения, которые распознают DPR, состоящие из повторов полиглицин-аланин (Gly-Ala; GA), полиглицин-пролин (Gly-Pro, GP), полиглицин-аргинин (Gly-Arg; GR), полипролин-аргинин (Pro-Arg; PR) или полипролин-аланин (Pro-Ala; PA), и белки, содержащие указанные DPR.

Эксперименты, выполненные в соответствии с настоящим изобретением, были успешными в плане выделения происходящих от человека моноклональных антител, специфичных в отношении DPR, созревших в организме человека и способных специфично распознавать неагрегированные и агрегированные молекулы белка C9ORF72-DPR и их фрагменты. Субъекты-люди, являющиеся источником В-клеток, из которых были выделены происходящие от человека моноклональные антитела к DPR-белку и кДНК, кодирующая их вариабельную область соответственно, не имели симптомов неврологических и нейродегенеративных состояний. Однако согласно другому варианту реализации настоящего изобретения источником В-клеток, из которых могут быть выделены происходящие от человека моноклональные антитела к DPR и кДНК, кодирующая их вариабельную область, являются пациенты с симптомами заболевания и/или расстройства, связанного с DPR-белками. Поскольку антитела согласно настоящему изобретению выделены из организма человека и, как описано в примерах, было показано, что они специфично связываются с DPR-белками у пациентов с FTLT, целесообразно ожидать, что моноклональные антитела человека к DPR-белку согласно настоящему изобретению и их производные, помимо отсутствия у них иммуногенности, также проявляют терапевтически полезное действие у человека.

Лобно-височная деменция (FTD) также известная как болезнь Пика, представляет собой группу расстройств, связанных с прогрессирующей дегенерацией нервных клеток в лобной доле и/или височной доле головного мозга. Симптомы, связанные со сниженной функцией головного мозга из-за повреждения клеток и сжатия тканей, были названы лобно-височной долевой дегенерацией (FTLD). Как уже отмечалось в разделе предшествующего уровня техники, содержание которого включено в настоящее описание, было установлено, что гетерозиготный удлинённый гексануклеотидный повтор (GGGGCC), т.е. дипептидный повтор (DPR), расположенный между некодирующими экзонами 1a и 1b C9ORF72 (NC_000009.12, 27546545-27573866, дополнение; NG_031977.1, 5001-32322 RefSeqGene), является наиболее частой причиной FTLT и латерального амиотрофического склероза (ALS). Удлинённый гексануклеотидный повтор приводит к синтезу, выработке и/или агрегации различных полипептидов, состоящих из повторяющихся блоков двух аминокислот (дипептидных повторов, DPR), в частности поли(Gly-Ala; GA), поли(Gly-Pro, GP), поли(Pro-Arg, PR), или поли(Pro-Ala, PA), и/или поли(Gly-Arg, GR).

Настоящее изобретение в целом относится к происходящим от человека антителам, их антигенсвязывающим фрагментам, синтетическим и биотехнологическим вариантам и эквивалентным антигенсвязывающим молекулам, которые способны специфично распознаваться DPR-белками, в частности, теми, в которых DPR состоит из поли(Gly-Ala; GA), поли(Gly-Pro, GP), поли(Pro-Arg, PR), поли(Pro-Ala, PA) и/или поли(Gly-Arg, GR). Следовательно, в настоящем изобретении предложены антитела, которые селективно распознают один конкретный дипептидный повтор, например поли-GA, а также антитела, которые способны распознавать более одного дипептидного повтора, например поли-GA и поли-GP или поли-GR, поли-GA и поли-PR, по существу с одинаковой или различной аффинностью, однако статистически достоверно по сравнению с неспецифичным связыванием. Если не указано иное, под антителами "специфично распознающими DPR" "антителами, специфичными в отношении DPR" и "антителами к DPR" понимают антитела, которые специфично и, как правило, в совокупности связываются с нативной или агрегированной формой "DPR-белков", "дипептидных повторов", "DPR", которые используются здесь взаимозаменяемо. DPR представляют собой удлинённые гексануклеотидные повторы и содержат повторяющиеся блоки из двух аминокислот. Повторяющиеся блоки могут содержать любую аминокислоту. Однако в предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения DPR содержит глицин и аланин (Gly-Ala, GA), глицин и пролин (Gly-Pro, GP), глицин и аргинин (Gly-Arg, GR), пролин и аргинин (Pro-Arg, PR) или пролин и аланин (Pro-Ala, PA). Следовательно, в настоящем изобретении предложены происходящие от человека антитела, их белоксвязывающие фрагменты, синтетические и биотехнологические варианты, селективные в отношении DPR-белков, состоящих из GA, GP, GR, PR или PA. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения DPR-связывающие молекулы со-

гласно настоящему изобретению связываются с DPR-белками, содержащими большее количество повторов, т.е. с DPR, состоящими из (GA)_x, (GP)_x, (GR)_x, (PR)_x или (PA)_x. В частности, *x* обозначает количество повторов, например DPR-белок с 15 повторами будет обозначен (GA)₁₅, это также означает, что, например, удлинённый гексануклеотидный повтор G₄C₂ повторяется 15 раз. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело предпочтительно распознаёт DPR-белок (GA)₁₅.

Как правило, способность антитела связываться с DPR-белком оценивают с использованием пептида DPR, присоединённого к белку-носителю, такому как БСА или GST; см., например, работы Mori et al., *Science* 339 (2013), 1335-1338 и Mackenzie et al., *Acta Neuropathol.* 126 (2013), 859-879, в которых описано, помимо прочего, использование рекомбинантного белка GST-GA₁₅ для получения и описания мышиного моноклонального антитела к GA. Однако эксперименты, выполненные в соответствии с настоящим изобретением, неожиданно выявили, что некоторые антитела к DPR, которые не были способны связываться в значительной степени с БСА-присоединёнными пептидами DPR или проявляли лишь довольно низкую аффинность, связываются с не присоединённым пептидом DPR и связываются с существенно более высокой аффинностью, чем с БСА-присоединённым DPR-пептидом; см. для сравнения, например, значения ЭК₅₀, представленные на фиг. 3А для антитела к поли-GA, NI-308.45C2, антитела к поли-PR, NI-308.24E11, и, в частности, антител к поли-GR, NI-308.6B11 и NI-308.46F8, которые не связывались с БСА-присоединённым пептидом (GR)₁₅ в детектируемой степени, и, следовательно, вероятно, не поддавались детектированию методами ИФА, используемыми в предшествующем уровне техники для получения мышиных моноклональных антител к DPR.

Например, в международных заявках WO 2014/114303 A1 и WO 2014/114660 A1 соответственно описаны поликлональные антитела, которые вырабатываются у кролика к поли-GA (GA)₁₅ и поли-GP (GP)₁₅, гибридованным с белком, связывающим мальтозу (MBP), и мышиные моноклональные антитела к агрегированному поли-GA (GA)₁₀, соединённому с полиэтиленгликолем (ПЭГ), и распознающие поли-GA (GA)₁₅, гибридованный с глутатион-S-трансферазой (GST). Однако в указанных заявках не представлены данные о специфичности связывания с неродственными амилоидогенными белками и связывания с патологическими агрегатами DPR в ткани мозга человека с C9ORF72-FTLD. Следовательно, диагностическая и терапевтическая пригодность указанных антител не подтверждена и остается неизвестной.

В международной заявке WO 2014/116865A1 описано получение поликлональных антител, которые вырабатываются у кролика к смеси поли-GA (GA)₈, поли-GP (GP)₈ и поли-GR (GR)₈, каждый из которых соединен с аминокaproновой кислотой (Ahx) и конъюгирован с м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидным эфиром (MBS) в качестве иммунного носителя. Описано связывание одного поликлонального антитела кролика, названного MC-001, с поли-GP (GP)₈, но не с другими DPR. Описано, что поликлональное антитело MC-001 позволяет детектировать иммунореактивность в спинномозговой жидкости (СМЖ) пациентов с C9⁺ ALS и нерастворимые включения полипептидов поли-GP в головном мозге пациентов с генетическим удлинением C9ORF72. Помимо этого описаны попытки получения поликлональных антител к поли-GA, поли-GP, поли-GR и поли-PA у кролика и козы соответственно с использованием отдельных пептидов DPR с различным числом повторов и иммунными носителями, а также один эксперимент по получению мышиных моноклональных антител к поли-GP с использованием подхода, который применяли для получения поликлонального антитела MC-001. Однако несмотря на то, что было описано получение трех клонов моноклональных антител, G2, G3 и G4, которые связываются только с поли-GP (GP)₈, отсутствуют данные о специфичности связывания с неродственными амилоидогенными белками и связывания с патологическими агрегатами DPR в ткани головного мозга пациентов с C9ORF72-FTLD. Также помимо критического описания протокола получения моноклонального антитела не представлена информация о последовательности в варибельной области антитела или ее регистрационном номере в базе данных. В этой связи также следует изучить диагностическую и терапевтическую пригодность моноклональных антител, которые, возможно, могут быть получены в соответствии с протоколом иммунизации, описанным в WO 2014/116865A1.

В международной заявке WO 2014/159247 A1 описаны поликлональные антитела кролика и мыши, которые направлены к синтетическим пептидам DPR с разным числом повторов и N- и/или C-концевыми модификациями, например, ацетилированием и амидированием. Однако способ получения моноклональных антител к DPR не описан. Помимо этого в WO 2014/159247 A1, в частности, описана трансгенная мышиная модель C9ORF72 ALS для исследования гипотезы о том, что смысловые и антисмысловые транскрипты способствуют развитию ALS/FTD. В соответствии с настоящим изобретением указанную мышиную модель можно применять для исследования терапевтической пригодности антител согласно настоящему изобретению.

Подытоживая, следует отметить, что в предшествующем уровне техники не изложены идеи или предположения, более того не обеспечены антитела к DPR, которые селективно связываются с одним или более DPR, полученными из разных рамок считывания гена C9ORF72, которые способны связываться с патологическими агрегатами DPR в ткани головного мозга людей с C9ORF72-FTLD и которые можно применять для диагностики и лечения расстройств, связанных с накоплением и агрегацией DPR-белков, таких как ALS/FTD. Напротив, в настоящем изобретении впервые обеспечен набор монокло-

нальных происходящих от человека антител к DPR из В-клеток памяти человека, которые специфично распознают один или более DPR, которые транслируются с гена C9ORF72 в смысловом и/или антисмысловом направлении. Как показано в примерах, происходящие от человека моноклональные антитела к DPR согласно настоящему изобретению обладают высокой аффинностью, по существу не распознают неродственные амилоидогенные белки и способны связываться с патологическими агрегатами DPR в ткани головного мозга индивидуумов с C9ORF72-FTLD.

В этой связи и ввиду того факта, что антитела к DPR согласно настоящему изобретению получены из аутоантител человека и, следовательно, как предполагается, они являются по существу неиммуногенными у людей, целесообразно ожидать, что помимо их диагностической ценности, проиллюстрированной в примерах, они также имеют терапевтическое применение. Применительно к этому факту следует отметить, что в предшествующем уровне техники отсутствуют данные о возможном существовании аутоантител человека к DPR-белкам, однако имеются указания о применении иммунизации лабораторных животных только синтетическими и модифицированными пептидами DPR, а также о том, что выработка моноклональных мышиных антител к DPR является довольно сложной, поскольку обычные способы иммунизации были неэффективны, и только иммунизация с использованием ПЭГ-конъюгированного поли-GA (GA)₁₀ пептида позволила получить стабильные клоны антител; см., например, международную заявку WO 2014/114660 A1 в примере 10 на с. 80, строки 5-15. Следовательно, изложенные факты делают результаты настоящего изобретения, то есть обеспечение происходящих от человека антител к DPR, еще более удивительными, поскольку В-клетки памяти, обеспечивающие источник антител согласно настоящему изобретению, разумеется, были получены у неиммунизированных пациентов/добровольцев.

Соответственно в настоящем изобретении в целом предложены следующие варианты реализации:

1. Происходящее от человека моноклональное антитело, способное связываться с дипептидным (XX') повтором (DPR), или его DPR-связывающий фрагмент, синтетический вариант или биотехнологическое производное, которое распознает по меньшей мере один DPR, который транслируется с открытой рамки считывания 72 гена хромосомы 9 (C9ORF72) в смысловом и/или антисмысловом направлении, причем предпочтительно по меньшей мере один, предпочтительно два и наиболее предпочтительно все три определяющих комплементарность участка (CDR) одной или предпочтительно обеих переменных областей легкой и тяжелой цепей антитела получены из антитела человека, экспрессируемого В-клеткой памяти человека (аутоантитело человека). Предпочтительно указанное антитело распознает по меньшей мере два разных DPR, предпочтительно по меньшей мере один DPR, который транслируется с гена C9ORF72 в смысловом направлении, и по меньшей мере один DPR, который транслируется с гена C9ORF72 в антисмысловом направлении; см., например, рассматриваемое антитело NI-308.6B11, проиллюстрированное в примерах и в таблице на фиг. 2A. Для ясности понимания следует учитывать, что, если не указано иное, ссылка на антитело в следующих пунктах сделана исключительно для краткости и, разумеется, включает указанный DPR-связывающий фрагмент, синтетический вариант и биотехнологическое производное указанного антитела.

2. Антитело по п.1, которое характеризуется тем, что указанный DPR входит в состав или конъюгирован с белком (DPR-белок), причем предпочтительно указанный белок представляет собой бычий сывороточный альбумин (BSA) и конъюгирован с DPR.

3. Антитело по п.1 или 2, которое характеризуется тем, что указанный DPR состоит из повторов полиглицин-аланин (Gly-Ala; GA), полиглицин-пролин (Gly-Pro; GP), поли-(Gly-Apr; GR), поли-(Pro-Arg; PR) и/или поли-(Pro-Ala, PA), причем предпочтительно количество повторов составляет (XX')₁₅.

4. Антитело по любому из пп.1-3, которое распознает комбинацию DPR-белков, причем предпочтительно указанные DPR-белки состоят из поли-(GA) или поли-(PA), поли-(GP) или поли-(PA) или поли-(GR) или поли-(PR), при этом предпочтительно указанное антитело распознает поли-(GA) и поли-(GP); поли-(GA) и поли-(GR); поли-(PA) и поли-(GA); поли-(GA), поли-(GR) и необязательно поли-(PR); поли-(PA), поли-(PR) и необязательно поли-(GR) или поли-(PA), поли-(GR), поли-(PR) и необязательно поли-(GA).

5. Антитело по любому из пп.1-4, которое характеризуется тем, что указанное антитело способно связываться с пептидом DPR, состоящим из (XX')₁₅, при этом указанное антитело необязательно не связывается или связывается с величиной аффинности, которая по меньшей мере ниже величины аффинности для пептида, связанного с BSA или с другим белком-носителем, таким как белок, связывающий хитин (CBP), белок, связывающий мальтозу (MBP), или с глутатион-S-трансферазой (GST).

6. Антитело по любому из пп.1-5, которое способно связываться с агрегированными формами DPR и белком DPR соответственно.

7. Антитело по любому из пп.1-6, которое характеризуется тем, что указанный DPR-белок представляет собой C9ORF72-DPR.

8. Антитело по любому из пп.1-7, которое распознает DPR, содержащий повтор GA, причем указанное антитело содержит в своей переменной области:

(а) по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи (VH) и/или легкой цепи (VL) любого из антител NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.28G1 и NI-308.45C2, представленный на любой из фиг. 1A-1D и ука-

занный в

- (i) последовательности V_H (SEQ ID NO: 2, 8, 22, 26, 30, 34) и
- (ii) последовательности V_L (SEQ ID NO: 4, 6, 10, 12, 24, 28, 32, 36) соответственно;

(b) аминокислотную последовательность области V_H и/или V_L , представленную на любой из фиг. 1A-1D;

(c) по меньшей мере один CDR, состоящий из аминокислотной последовательности, полученной в результате частичного изменения любой из аминокислотных последовательностей (a);

(d) вариабельную область тяжелой цепи и/или легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, полученную в результате частичного изменения аминокислотной последовательности (b); и/или

(e) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно дополнительно содержащий полипептидную последовательность, которая является гетерологичной по отношению к области V_H и/или V_L или по меньшей мере одному CDR, причем предпочтительно полипептидная последовательность содержит константный домен человека предпочтительно типа IgG, наиболее предпочтительно класса или изотипа IgG1.

9. Антитело по любому из пп.1-7, которое распознает DPR, содержащий повтор GP, причем указанное антитело содержит в своей вариабельной области:

(a) по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) аминокислотной последовательности вариабельной области V_H и/или V_L любого из антител NI-308.5G2, NI-308.46E9 и NI-308.12A3, представленный на фиг. 1F, 1G и 1K и указанный в

- (i) последовательности V_H (SEQ ID NO: 14, 18, 44, 48, 72, 76) и
- (ii) последовательности V_L (SEQ ID NO: 16, 20, 46, 50, 74, 78) соответственно;

(b) аминокислотную последовательность области V_H и/или V_L , представленную на фиг. 1F, 1G или 1K;

(c) по меньшей мере один CDR, состоящий из аминокислотной последовательности, полученной в результате частичного изменения любой из аминокислотных последовательностей (a);

(d) вариабельную область тяжелой цепи и/или легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, полученную в результате частичного изменения аминокислотной последовательности (b); и/или

(e) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который необязательно дополнительно содержит полипептидную последовательность, которая является гетерологичной по отношению к области V_H и/или V_L или по меньшей мере одному CDR, причем предпочтительно полипептидная последовательность содержит константный домен человека предпочтительно типа IgG, наиболее предпочтительно класса или изотипа IgG1.

10. Антитело по любому из пп.1-7, которое распознает DPR, содержащий повтор GR, причем указанное антитело содержит в своей вариабельной области:

(a) по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) аминокислотной последовательности вариабельной области V_H и/или V_L антитела NI-308.6B11 или NI-308.46F8, представленный на фиг. 1H и 1I и указанный в

- (i) последовательности V_H (SEQ ID NO: 52, 56, 58, 62) и
- (ii) последовательности V_L (SEQ ID NO: 54, 60) соответственно;

(b) аминокислотную последовательность области V_H и/или V_L , представленную на фиг. 1H или 1I;

(c) по меньшей мере один CDR, состоящий из аминокислотной последовательности, полученной в результате частичного изменения любой из аминокислотных последовательностей (a);

(d) вариабельную область тяжелой цепи и/или легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, полученную в результате частичного изменения аминокислотной последовательности (b); и/или

(e) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно дополнительно содержащий полипептидную последовательность, которая является гетерологичной по отношению к области V_H и/или V_L или по меньшей мере одному CDR, причем предпочтительно полипептидная последовательность содержит константную область человека предпочтительно типа IgG, наиболее предпочтительно класса или изотипа IgG1.

11. Антитело по любому из пп.1-7, которое распознает DPR, содержащий PR-повтор, причем указанное антитело содержит в своей вариабельной области:

(a) по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) аминокислотной последовательности вариабельной области V_H и/или V_L антитела NI-308.24E11, представленный на фиг. 1E и указанный в

- (i) последовательности V_H (SEQ ID NO: 38) и
- (ii) последовательности V_L (SEQ ID NO: 40, 42) соответственно;

(b) аминокислотную последовательность области V_H и/или V_L , представленную на фиг. 1E;

(c) по меньшей мере один CDR, состоящий из аминокислотной последовательности, полученной в результате частичного изменения любой из аминокислотных последовательностей (a);

(d) вариабельную область тяжелой цепи и/или легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, полученную в результате частичного изменения аминокислотной последовательности (b); и/или

(e) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно дополнительно содержащий полипептидную последовательность, которая является гетерологичной по отношению к области V_H и/или V_L или по меньшей мере одному CDR, причем предпочтительно полипептидная последовательность содержит константную область человека предпочтительно типа IgG, наиболее предпочтительно класса или изотипа IgG1.

12. Антитело по любому из пп.1-7, распознающее DPR, содержащий повтор PA, причем указанное антитело содержит в своей вариабельной области:

(a) по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) аминокислотной последовательности вариабельной области V_H и/или V_L антитела NI-308.4M1, представленный на фиг. 1J и указанный в

(i) последовательности V_H (SEQ ID NO: 64, 68) и

(ii) последовательности V_L (SEQ ID NO: 66, 70) соответственно;

(b) аминокислотную последовательность области V_H и/или V_L, представленную на фиг. 1J;

(c) по меньшей мере один CDR, состоящий из аминокислотной последовательности, полученной в результате частичного изменения любой из аминокислотных последовательностей (a);

(d) вариабельную область тяжелой цепи и/или легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, полученную в результате частичного изменения аминокислотной последовательности (b); и/или

(e) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно дополнительно содержащий полипептидную последовательность, которая является гетерологичной по отношению к области V_H и/или V_L или по меньшей мере одному CDR, причем предпочтительно полипептидная последовательность содержит константную область человека предпочтительно типа IgG, наиболее предпочтительно класса или изотипа IgG1.

[13] Антитело по любому из пп.1-7, распознающее DPR, содержащий повтор PR, причем указанное антитело содержит в своей вариабельной области:

(a) по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) аминокислотной последовательности вариабельной области V_H и/или V_L антитела NI-308.16C10, представленный на фиг. 1L и указанный в

(i) последовательности V_H (SEQ ID NO: 80, 84) и

(ii) последовательности V_L (SEQ ID NO: 82, 86) соответственно;

(b) аминокислотную последовательность области V_H и/или V_L, представленную на фиг. 1L;

(c) по меньшей мере один CDR, состоящий из аминокислотной последовательности, полученной в результате частичного изменения любой из аминокислотных последовательностей (a);

(d) вариабельную область тяжелой цепи и/или легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, полученную в результате частичного изменения аминокислотной последовательности (b); и/или

(e) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно дополнительно содержащий полипептидную последовательность, которая является гетерологичной по отношению к области V_H и/или V_L или по меньшей мере одному CDR, причем предпочтительно полипептидная последовательность содержит константную область человека предпочтительно типа IgG, наиболее предпочтительно класса или изотипа IgG1.

14. Антитело по п.9, которое также способно связываться с повтором поли-GA, причем предпочтительно указанное антитело представляет собой или получено из антитела NI-308.5G2.

15. Антитело по п.10, которое также способно связываться с повтором поли-GA, причем предпочтительно указанное антитело представляет собой или получено из антитела NI-308.6B11.

16. Антитело по п.10 или 14, которое также способно связываться с повтором поли-PR, причем предпочтительно указанное антитело представляет собой или получено из антитела NI-308.6B11.

17. Антитело по п.12, которое также способно связываться с повтором поли-GA, причем предпочтительно указанное антитело представляет собой или получено из антитела NI-308.4M1.

18. Антитело по п.13, которое также способно связываться с повтором поли-GA, причем предпочтительно указанное антитело представляет собой или получено из антитела NI-308.16C10.

19. Антитело по любому из пп.1-18, которое селективно или предпочтительно связывается с не присоединенным пептидом DPR.

20. Антитело по любому из пп.1-19, которое связывается с DPR, только если число повторов n ≥ 6, предпочтительно ≥ 10, более предпочтительно ≥ 15.

21. Антитело по любому из пп.1-20, которое способно связываться с не присоединенным и БСА-присоединенным DPR по существу с аналогичной величиной аффинности или с величиной аффинности, которая находится в пределах одного и того же порядка, предпочтительно величина ЭК₅₀ (полумакси-

мальная эффективная концентрация) для связывания несвязанного и БСА-связанного DPR отличается на коэффициент ≤ 20 , предпочтительно ≤ 15 , более предпочтительно ≤ 10 , еще более предпочтительно ≤ 5 и наиболее предпочтительно не более чем приблизительно ≤ 2 или 3 согласно результатам определения методом непрямого ИФА, при этом число повторов n равно 15.

22. Антитело к DPR по любому из пп.1-22, которое способно связываться с двумя или более различными DPR по существу с аналогичной величиной аффинности или с величиной аффинности, которая находится в пределах одного и того же порядка, предпочтительно величина $ЭК_{50}$ для связывания любого из DPR составляет по меньшей мере ≤ 200 нМ, предпочтительно ≤ 150 нМ, более предпочтительно ≤ 100 нМ, еще более предпочтительно ≤ 50 нМ и наиболее предпочтительно ≤ 25 нМ для связывания DPR_n или DPR_n белка согласно результатам определения методом непрямого ИФА, при этом число повторов n равно 15. Например, антитело NI-308.5G2 связывается с (GA)₁₅ с величиной $ЭК_{50}$ приблизительно 15,3 и с (GP)₁₅ с величиной $ЭК_{50}$ приблизительно 0,88, и антитело NI-308.6B11 связывается с (GA)₁₅ с величиной $ЭК_{50}$ приблизительно 38,4, с (GR)₁₅ с величиной $ЭК_{50}$ приблизительно 0,94 и с (PR)₁₅ с величиной $ЭК_{50}$ приблизительно 119; см. пример 3 и фиг. 2.

23. Антитело по любому из пп.1-22, аффинность связывания которого по отношению по меньшей мере к одному DPR_n или белку DPR_n соответствует величине $ЭК_{50}$ (полумаксимальной эффективной концентрации) ≤ 25 нМ, предпочтительно ≤ 2 нМ, более предпочтительно ≤ 1 нМ и наиболее предпочтительно $\leq 0,5$ нМ согласно результатам определения методом непрямого ИФА, при этом число повторов n равно 15.

24. Антитело по любому из пп.1-23, которое представляет собой химерное антитело человека-мыши или антитело, содержащее фрагменты антител мыши.

25. Антитело или антигенсвязывающая молекула, которая конкурирует с указанным антителом по любому из пп.1-24 за специфичное связывание с DPR или DPR-белком, как определено в любом из пп.1-24.

26. Антитело по любому из пп.1-25, которое выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv), фрагмента F(ab'), фрагмента F(ab) и фрагмента F(ab')₂.

27. Полинуклеотид, кодирующий, по меньшей мере, связывающий домен или вариабельную область цепи иммуноглобулина антитела по любому из пп.1-26, при этом предпочтительно полинуклеотид представляет собой кДНК.

28. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.7, необязательно в комбинации с полинуклеотидом по п. 27, который кодирует вариабельную область другой цепи иммуноглобулина указанной связывающей молекулы.

29. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.27 или вектор по п.28.

30. Применение кДНК по п.27, вектора по п.28 или клетки-хозяина по п.29 для получения антитела к DPR.

31. Способ получения антитела к DPR или его биотехнологического производного или цепи(цепей) иммуноглобулина, причем указанный способ включает:

(a) культивирование клетки по п.30 и

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

32. Антитело или цепь(цепи) иммуноглобулина, кодируемая полинуклеотидом по п.27, которые могут быть получены с помощью способа по п.31.

33. Антитело по любому из пп.1-26 или 32, которое содержит детектируемую метку.

34. Антитело по п.33, которое характеризуется тем, что указанная детектируемая метка выбрана из группы, состоящей из фермента, радиоактивного изотопа, флуорофора и тяжелого металла.

35. Антитело по любому из пп.1-26 или 32, которое присоединено к лекарственному препарату.

36. Композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-26 или 32-34, полинуклеотид по п.27, вектор по п.28 или клетку по п.29.

37. Композиция по п.36, которая представляет собой фармацевтическую композицию и дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

38. Композиция по п.37, которая представляет собой вакцину.

39. Способ получения фармацевтической композиции для применения в лечении расстройства, связанного или вызванного DPR и агрегатами DPR-белков, причем указанный способ включает:

(a) культивирование клетки по п.29;

(b) очистку указанного антитела, его биотехнологического производного или цепи (цепей) иммуноглобулина из культуры до фармацевтической степени чистоты; и

(c) смешивание указанного антитела или биотехнологического производного с фармацевтически приемлемым носителем.

40. Фармацевтическая композиция по п.36 или 37, дополнительно содержащая дополнительный агент, который можно применять для лечения заболеваний и/или симптомов, связанных с агрегированными белками DPR, например C9ORF72-DPR.

41. Композиция по п.40, которая представляет собой диагностическую композицию.

42. Диагностическая композиция по п.41, которая содержит реагенты, обычно используемые в иммунологических способах диагностики или способах диагностики на основе нуклеиновых кислот.

43. Антитело по любому из пп.1-26 или 32-34 или молекула, связывающая DPR-белок, специфичность связывания которой по существу аналогична специфичности связывания любого из указанных антител, полинуклеотид по п.27, вектор по п.28 или клетка по п.29 для применения в получении фармацевтической или диагностической композиции для профилактического и терапевтического лечения заболеваний, связанных с белком DPR и его агрегированными формами.

44. Антитело по п.43 для применения в получении фармацевтической или диагностической композиции для профилактического и терапевтического лечения, причем указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из лобно-височной долевого дегенерации (FTLD), латерального амиотрофического склероза (ALS) и FTLD-ALS.

45. Молекула, связывающая DPR-белок, содержащая по меньшей мере один CDR антитела по любому из пп.1-26 или 32-35 для применения в детектировании в условиях *in vivo* или нацеливания терапевтического и/или диагностического агента к агрегированному белку в организме человека или животного.

46. Молекула, связывающая DPR-белок, по п.45, которая характеризуется тем, что указанная визуализация в условиях *in vivo* включает позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (СПЕКТ), визуализацию в ближней инфракрасной области (NIR) или магнитно-резонансную томографию (МРТ).

47. Способ диагностики расстройств, связанных с белком DPR, включающий этапы определения присутствия указанного антитела по любому из пп.1-26 или 32-35 в биологическом образце указанного субъекта.

49. Набор, пригодный для применения в диагностике или мониторинге расстройств, связанных с белком DPR, причем указанный набор содержит по меньшей мере одно указанное антитело по любому из пп.1-27 или 32-35 или молекулу, связывающую белок DPR, специфичность связывания которой по существу аналогична специфичности связывания любого из указанных антител, полинуклеотид по п.27, вектор по п.28 или клетку по п.29, необязательно с реагентами и/или инструкциями по применению.

Токсические свойства удлиненных повторов были выявлены при нескольких заболеваниях, включая, но не ограничиваясь ими, лобно-височную долевую дегенерацию (FTLD), латеральный амиотрофический склероз (ALS), FTLD-ALS и спиноцеребеллярную атаксию типа 36. Следовательно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению способно связываться с DPR при любом одном из заболеваний и/или расстройств, выбранных из группы, состоящей из лобно-височной долевого дегенерации (FTLD), латерального амиотрофического склероза (ALS), FTLD-ALS, и/или спиноцеребеллярной атаксии типа 36. Поскольку было показано, что C9ORF72-DPR связан с FTLD, см. выше, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению связывается с дипептидными повторами (DPR) C9ORF72.

Как показано в примерах и на фигурах, антитела, полученные в соответствии с настоящим изобретением, связываются с агрегированными формами C9ORF72-DPR у пациентов с C9ORF72-FTLD; см., например, примеры 10 и 12, а также фиг. 9-12 и 14. Следовательно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению способно связываться с агрегированными формами C9ORF72-DPR. Интересно отметить, что антитела, полученные в соответствии с настоящим изобретением, также связываются с коагрегированными формами C9ORF72-DPR у пациентов с C9ORF72-FTLD; см. пример 13 и фиг. 15. Следовательно, согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению способно связываться с коагрегированными формами C9ORF72-DPR.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело или его связывающий фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное имеют иммунологические характеристики связывания антитела, содержащего любую из переменных областей V_H и/или V_L , показанных на фиг. 1. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит в своей переменной области по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) аминокислотной последовательности переменной области V_H и/или V_L , указанный в (i) последовательности V_H (SEQ ID NO: 2, 8, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 44, 48, 52, 56, 58, 62, 64, 68, 72, 76, 80, 84) и (ii) последовательности V_L (SEQ ID NO: 4, 6, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 42, 46, 50, 54, 60, 66, 70, 74, 82, 86, 88).

Помимо этого или в качестве альтернативы согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело содержит аминокислотную последовательность области V_H и/или V_L , указанную на любой из фиг. 1A-1J.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению дополнительно или альтернативно содержит по меньшей мере один CDR, состоящий из аминокислотной последовательности, полученной в результате частичного изменения любой из аминокислотных последовательностей V_H (SEQ ID NO: 2, 8, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 44, 48, 52, 56, 58, 62, 64,

68, 72, 76, 80, 84) и (ii) аминокислотных последовательностей V_L (SEQ ID NO: 4, 6, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 42, 46, 50, 54, 60, 66, 70, 74, 82, 86, 88). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, полученную в результате частичного изменения аминокислотной последовательности, описанной выше.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно или альтернативно, необязательно дополнительно, содержит полипептидную последовательность, которая является гетерологичной по отношению к области V_H и/или V_L или по меньшей мере одному CDR, причем предпочтительно полипептидная последовательность содержит константную область человека.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, см. ниже, антитело или его биотехнологическое производное представляет собой антитело человека изотипа IgG, предпочтительно класса или изотипа IgG1.

Как показано в примерах и на фигурах, было установлено, что антитела к белку DPR специфично связываются с C9ORF72-DPR с повтором $(GA)_{15}$, или $(GP)_{15}$, или $(GR)_{15}$, или $(PA)_{15}$, или $(PR)_{15}$. Следовательно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению или его биотехнологическое производное имеет аффинность связывания, соответствующую величине $ЭK_{50}$ (полумаксимальной эффективной концентрации) ≤ 2 нМ, предпочтительно ≤ 1 нМ и наиболее предпочтительно $\leq 0,5$ нМ в отношении связывания DPR, состоящего из $(XX')_{15}$, причем предпочтительно DPR представляет собой белок DPR $(GA)_{15}$ или белок DPR $(GP)_{15}$, белок DPR $(GR)_{15}$, или белок DPR $(PA)_{15}$, или белок DPR $(PR)_{15}$.

Поскольку антитела к DPR с высокой аффинностью и специфичностью в отношении отдельных дипептидных повторов представляют интерес в целом, и рассматриваемые антитела, проиллюстрированные в примерах, обеспечивают средства для получения эквивалентных антител и аналогичных DPR-связывающих молекул, в настоящем изобретении также предложено антитело или антигенсвязывающая молекула, которая конкурирует с антителом, см. выше, в отношении специфичного связывания с белком DPR.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела может представлять собой одноцепочечный фрагмент Fv, фрагмент F(ab'), фрагмент F(ab) и фрагмент F(ab')₂ или любой другой антигенсвязывающий фрагмент. Согласно другому варианту реализации антитело представляет собой химерное антитело человека-грызуна или антитело, содержащее фрагменты антител грызуна, такое как антитело мыши-человека, мышинное антитело или антитело, содержащее фрагменты антител мыши, антитело крысы или антитело, содержащее фрагменты антител крысы, варианты антител грызунов являются наиболее подходящими для диагностических способов и исследований на животных.

Помимо этого в настоящем изобретении предложены композиции, содержащие антитело согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное и иммунотерапевтические и иммунодиагностические способы применения указанных композиций в предотвращении, диагностике или лечении заболеваний и/или расстройств, связанных с белками DPR и/или агрегированными C9ORF72, в которых эффективное количество композиции вводят пациенту, нуждающемуся в этом.

В настоящем изобретении также предложены полинуклеотиды, кодирующие, по меньшей мере, вариабельную область цепи иммуноглобулина антитела согласно настоящему изобретению. Предпочтительно указанная вариабельная область содержит по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) V_H и/или V_L вариабельной области, указанный на любой из фиг. 1A-L.

Соответственно в настоящем изобретении также предложены векторы, содержащие указанные полинуклеотиды и клетки-хозяева, трансформированные указанными векторами, а также их применение для получения антитела и эквивалентных связывающих молекул, которые являются специфичными в отношении DPR и предпочтительно способны связываться с белками C9ORF72-DPR или их фрагментами. В данной области техники известны средства и способы рекомбинантного получения антител и их миметиков, а также способы скрининга конкурирующих связывающих молекул, которые могут представлять собой антитело или не являются антителом. Однако, как описано в настоящем документе, в частности, в отношении вариантов терапевтического применения у человека, антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, происходящее от человека, в том смысле, что применение указанного антитела по существу не вызывает иммунного ответа, направленного против указанного антитела, который в ином случае наблюдается для химерных и даже гуманизированных антител.

Помимо этого в настоящем документе раскрыты композиции и способы, которые можно применять для выявления DPR, в частности C9ORF72-DPR или фрагментов в условиях *in vitro*, например в образцах, и/или в условиях *in vivo*. Раскрыты антитела к белку DPR и их антигенсвязывающие фрагменты можно применять для скрининга крови, плазмы крови, сыворотки крови, слюны, перитонеальной жидкости, спинномозговой жидкости ("СМЖ") и мочи человека для определения присутствия DPR и/или молекул C9ORF72-DPR или их фрагментов в образцах, например, с помощью количественных исследований

на основе ИФА или модифицированных поверхностей. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ диагностики или мониторинга прогрессирования заболевания и/или расстройства, связанного с молекулами белков DPR или их фрагментами, у субъекта, причем указанный способ включает определение присутствия молекул DPR-белка или фрагментов в образце субъекта, которому будет поставлен диагноз, с использованием по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению или эквивалентной DPR-связывающей молекулы, причем присутствие молекул DPR-белка или фрагментов является показателем заболевания. Помимо этого согласно одному варианту реализации настоящего изобретения раскрыты антитела к DPR и DPR-связывающие молекулы, содержащие по меньшей мере один CDR антитела согласно настоящему изобретению, обеспечены для получения композиции для детектирования в условиях *in vivo* (также называемого визуализация в условиях *in vivo*) или нацеливания терапевтического и/или диагностического агента к DPR, в частности, к молекуле C9ORF72-DPR в организме человека или животного. Способы и композиции, раскрытые в настоящем документе, могут облегчить течение заболеваний и/или расстройств, связанных с белками DPR, и характеризующихся, например, возникновением агрегированных форм DPR, и могут быть использованы для мониторинга прогрессирования заболевания и терапевтической эффективности проводимой терапии, предоставленной субъекту, например, в диагностических способах, относящихся к визуализации в условиях *in vivo*. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения детектирование в условиях *in vivo* (визуализация) включает сцинтиграфию, позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (SPECT), визуализацию в ближней инфракрасной области (NIR) или магнитно-резонансную томографию (МРТ).

Следовательно, конкретная цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы обеспечить способы лечения, диагностики или предотвращения заболевания и/или расстройства, связанного с белками DPR, предпочтительно с C9ORF72-DPR. Указанные способы включают введение эффективной концентрации предпочтительно антитела, происходящего от человека или биотехнологического производного антитела субъекту, причем указанное антитело нацелено к DPR и DPR-белкам, предпочтительно молекулам белка C9ORF72-DPR или их фрагментам.

Дополнительные варианты реализации настоящего изобретения будут очевидны из описания и примеров ниже.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Аминокислотные последовательности переменных областей антител человека NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 и NI-308.16C10. Каркасные участки (FR) и определяющие комплементарность участки (CDR) обозначены, при этом CDR подчеркнуты. Была использована схема нумерации Kabat (см. <http://www.bioinf.org.uk/abs/>). В рамках показаны CDR1 V_H в соответствии с определением в работе Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983), упомянутой в указанной ссылке на веб-сайт, и приведены в табл. I, см. ниже.

Фиг. 2. Специфичность связывания и определение величины ЭК₅₀ для C9ORF72-DPR-белков. (А) Обобщенные данные по специфичности связывания и аффинности антител NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1 в отношении C9ORF-DPR-белков. Величины ЭК₅₀ антител NI-308, происходящих от человека, в отношении C9ORF72-DPR-белков (GA)₁₅ (■), (GP)₁₅ (▲), (GR)₁₅ (▼), (PA)₁₅ (◆), (PR)₁₅ (●) и контрольного БСА (△) определяли с помощью непрямого ИФА. Антитела NI-308.15O7 (B), NI-308.28G1 (C), NI-308.45C2 (D) и NI-308.18F7 (E) специфично распознавали пептид (GA)₁₅ C9ORF72-DPR-белка с аффинностью связывания 0,48, 1,1, 1,1 и 1,5 нМ соответственно. Антитело NI-308.24E11 (F) специфично нацелено связывалось с пептидом (PR)₁₅ C9ORF72-DPR-белка с величиной ЭК₅₀ 12,8 нМ, тогда как антитело NI-308.16C10 (M) предпочтительно связывалось с пептидом (PR)₁₅ C9ORF72-DPR-белка с аффинностью связывания 3,5 нМ, но также распознавало пептид (GA)₁₅ C9ORF2-DPR-белка с более низкой аффинностью связывания. Антитела NI-308.5G2 (G), NI-308.12A3 (L) и NI-308.46E9 (H) предпочтительно связывались с пептидом (GP)₁₅ C9ORF2-DPR-белка с аффинностью связывания 0,88, 2,2 и 13,9 нМ соответственно, но также распознавали пептид (GA)₁₅ C9ORF2-DPR-белка с более низкой аффинностью связывания. Антитела NI-308.6B11 (I) и NI-308.46F8 (J) предпочтительно нацелено воздействовали на пептид (GR)₁₅ C9ORF2-DPR-белка с аффинностью связывания 0,94 и 40,6 нМ соответственно, но также распознавали пептиды (GA)₁₅ и (PR)₁₅ C9ORF72-DPR-белков с более низкой аффинностью связывания. Антитело NI-308.4M1 (K) предпочтительно связывалось с пептидом (PA)₁₅ C9ORF2-DPR-белка с аффинностью связывания 0,10 нМ, но также распознавало пептид (GA)₁₅ C9ORF2-DPR-белка с более низкой аффинностью связывания.

Фиг. 3. Определение величины ЭК₅₀ в отношении БСА-связанных и несвязанных пептидов C9ORF72-DPR-белков. (А) Обобщенные данные по аффинности связывания антител NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 и NI-308.16C10 с БСА-присоединенными и не присоединенными пептидами C9ORF72-DPR. Определение величины полумаксимальной эффективной концентрации (ЭК₅₀) происходящего от человека антитела NI-308 в отношении БСА-связанных (▲) и несвязанных (■) пептидов

C9ORF72-DPR-белков (GA)₁₅, (GP)₁₅, (GR)₁₅, (PR)₁₅, (PA)₁₅ или контрольного БСА(Δ) с использованием непрямого ИФА. Антитела NI-308.18F7 (B), NI-308.15O7 (C), NI-308.28G1 (D), NI-308.5G2 (G), NI-308.46E9 (H), NI-308.4M1 (K) и NI-308.12A3 (L) распознавали БСА-связанные и несвязанные пептиды C9ORF72-DPR-белков с аналогичными величинами аффинности связывания. Антитела NI-308.45C2 (E), NI-308.24E11 (F) и NI-308.16C10 (M) нацелено воздействовали на БСА-связанные пептиды DPR-белков с более низкой ЭК₅₀ по сравнению с не присоединенными пептидами. Не было обнаружено связывания антител NI-308.6B11 (I) и NI-308.46F8 (J) с БСА- присоединенным пептидом (GR)₁₅ DPR-белка.

Фиг. 4. Исследование специфичности связывания происходящих от человека антител к DPR с неродственными агрегированными белками. Связывание антител со смесью смысловых пептидов ((GA)₁₅, (GA)₁₅ и (GR)₁₅) и смесью антисмысловых пептидов ((PA)₁₅ и (PR)₁₅) DPR-белка и шестью неродственными амилоидогенными белками определяли с помощью непрямого ИФА. Антитела NI-308.15O7 (A), NI-308.18F7 (B), NI-308.28G1 (C), NI-308.45C2 (D), NI-308.5G2 (F) и NI-308.46F8 (I) связывались со смесью смысловых пептидов DPR-белка без значительного нецелевого связывания с неродственными анализатами. Антитело NI-308.46E9 (G) также нацелено воздействовало на смесь смысловых пептидов DPR-белка и дополнительно проявило умеренное нецелевое связывание с неродственными анализатами. Антитело NI-308.24E11 (E) специфично связывалось со смесью антисмысловых пептидов DPR-белка, тогда как антитело NI-308.6B11 (H) нацелено воздействовало на смеси смысловых и антисмысловых пептидов DPR. Для обоих антител не было выявлено значительного нецелевого связывания с неродственными амилоидогенными белками. Антитела NI-308 испытывали в концентрации 20 нМ.

Фиг. 5. Селективность связывания антитела NI-308 в отношении C9ORF72-DPR-белков. Определение селективности связывания происходящего от человека антитела к C9ORF72-DPR в отношении пептидов БСА-связанного C9ORF72-DPR-белка (GA)₁₅, (GP)₁₅, (GR)₁₅, (PA)₁₅ и (PR)₁₅ с помощью вестерн-блоттинга. Антитела NI-308.15O7 (A), NI-308.18F7 (B), NI-308.28G1 (C) и NI-308.45C2 (D) распознавали поли-GA C9ORF72-DPR-белок. Антитела NI-308.24E11 (E) и NI-308.16C10 (J) специфично распознавали поли-PR DPR-белок, при этом антитело NI-308.16C10 также слабее связывалось с поли-GA DPR-белком. Антитела NI-308.5G2 (F), NI-308.46E9 (G) и NI-308.12A3 (I) нацелено воздействовали на поли-GP DPR-белок, при этом антитело NI-308.5G2 слабее связывалось с поли-GA DPR-белком. Антитело NI-308.4M1 (H) специфично распознавало поли-PA C9ORF72-DPR-белок.

Фиг. 6. Связывание с C9ORF72-DPR-белками в растворе. Определение связывания происходящего от человека антитела к C9ORF72-DPR в растворе с пептидами (GA)₁₅, (PR)₁₅ и (GR)₁₅ с помощью метода иммунопреципитации. Поли-GA C9ORF72-DPR-белок захватывали в растворе антителами NI-308.15O7, NI-308.18F7, NI-308.45C2 и NI-308.28G1 (A). Поли-PR DPR-белок осаждали антителом NI-308.24E11 (B), тогда как антитело NI-308.6B11 захватывало поли-GR DPR-белок. Антитело для контроля изотипа NI-43A11 не осаждало любой из C9ORF72-DPR-белков (A-C).

Фиг. 7. Зависимость связывания выбранных антител NI-308 от длины повтора в C9ORF72-DPR-белках. (A) Обобщенные данные по зависимости связывания выбранных антител NI-308 от длины повтора поли-GA C9ORF72. (B) Обобщенные данные по зависимости связывания выбранных антител NI-308 от длины повтора поли-GP C9ORF72. (C) Обобщенные данные по зависимости связывания выбранных антител NI-308 от длины повтора поли-GR C9ORF72. (D) Обобщенные данные по зависимости связывания выбранных антител NI-308 от длины повтора поли-PR C9ORF72. (E) Обобщенные данные по зависимости связывания выбранных антител NI-308 от длины повтора поли-PA C9ORF72. Определение зависимости специфичности связывания и полумаксимальной эффективной концентрации (ЭК₅₀) происходящего от человека антитела NI-308 от длины дипептидного повтора для пептидов C9ORF72-DPR с помощью непрямого ИФА. Антитело NI-308.15O7 (F) связывалось с пептидами DPR-белков (GA)₅, (GA)₆, (GA)₁₀ и (GA)₂₀ с аффинностью связывания при ЭК₅₀ >150, 7,9, 0,37 и 0,54 нМ соответственно. Антитело NI-308.18F7 (G) распознавало пептиды (GA)₆, (GA)₁₀ и (GA)₂₀ DPR-белков с аффинностью связывания при ЭК₅₀ >200, 0,78 и 0,83 нМ соответственно. Антитело NI-308.28G1 (H) нацелено воздействовало на пептиды (GA)₅, (GA)₆, (GA)₁₀ и (GA)₂₀ DPR-белков с аффинностью связывания при ЭК₅₀ >200, 6,3, 0,9 и 1,1 нМ соответственно. Антитело NI-308.45C2 (I) связывалось с пептидами (GA)₆, (GA)₁₀ и (GA)₂₀ DPR-белков с аффинностью связывания при ЭК₅₀ >200, 7,6 и 9,6 нМ соответственно. Антитело NI-308.5G2 (J и K) распознавало пептиды (GP)₅, (GP)₆, (GP)₁₀ и (GP)₂₀ DPR-белков с аффинностью связывания при ЭК₅₀ >200, 26,8, 0,94 и 0,47 нМ соответственно и с пептидами (GA)₆, (GA)₁₀ и (GA)₂₀ DPR-белков с аффинностью связывания при ЭК₅₀ >200, 5,7 и 18,2 нМ соответственно. Антитело NI-308.6B11 (L и M) связывалось с пептидами (GR)₃, (GR)₄, (GR)₅, (GR)₆, (GR)₁₀ и (GR)₂₀ DPR-белков с аффинностью связывания при ЭК₅₀ 14,3, 13,2, 0,47, 0,33, 1,3 и 0,25 нМ соответственно и с пептидами (GA)₆, (GA)₁₀ и (GA)₂₀ DPR-белков с аффинностью связывания при ЭК₅₀ >200, 27,7 и 33,6 нМ соответственно. Антитело NI-308.46E9 (N) нацелено воздействовало на пептиды (GP)₁₀ и (GP)₂₀ DPR-белков с аффинностью связывания при ЭК₅₀ 63,3 и 15,5 нМ соответственно. Антитело NI-308.24E11 (O) распознавало пептиды DPR-белков (PR)₆, (PR)₁₀ и (PR)₂₀ с аффинностью связывания при ЭК₅₀ >200, 31,7 и 11,3 нМ соответственно. Антитело NI-308.4M1 (P) связывалось с пептидами (PA)₅, (PA)₆, (PA)₁₀ и (PA)₂₀ DPR-белков с аффинностью связывания при ЭК₅₀ 26,9, 4,3, 0,06 и 0,06 нМ соответственно.

Фиг. 8. Зависимость связывания выбранных антител NI-308 от длины повтора в поли-GA и поли-GP

C9ORF72-DPR-белках. (А) Обобщенные данные по зависимости связывания выбранных антител NI-308 от длины повтора поли-GA C9ORF72. (В) Обобщенные данные по зависимости связывания выбранных антител NI-308 от длины повтора поли-GP C9ORF72. Определение зависимости специфичности связывания и полумаксимальной эффективной концентрации ($ЭК_{50}$) происходящих от человека антител NI-308 от длины дипептидных повторов для пептидов поли-GA или поли-GP C9ORF72-DPR-белков с помощью ИФА в формате "сэндвич". Антитело NI-308.15O7 (С) связывалось в растворе с пептидами (GA)₁₀ и (GA)₂₀ DPR-белков с аффинностью связывания при $ЭК_{50}$ >400 и 9,0 нМ соответственно. Антитело NI-308.18F7 (D) распознавало в растворе пептиды (GA)₁₀ и (GA)₂₀ DPR-белков с аффинностью связывания при $ЭК_{50}$ 0,34 и 0,45 нМ соответственно. Антитело NI-308.28G1 (Е) нацелено воздействовало в растворе на пептиды (GA)₁₀ и (GA)₂₀ DPR-белков с аффинностью связывания при $ЭК_{50}$ 0,46 и 0,40 нМ соответственно. Антитело NI-308.5G2 (F) распознавало в растворе лишь один пептид (GP)₂₀ DPR-белка с аффинностью связывания при $ЭК_{50}$ 38,2 нМ.

Фиг. 9. Специфичность связывания и аффинность антител NI-308.18F7 и NI-308.15O7 в отношении мономерных и агрегированных препаратов пептида (GA)₂₀ C9ORF72-DPR-белка.

Фиг. 10. Исследование препаратов пептида (GA)₂₀ C9ORF72-DPR-белка в условиях *in vitro* с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Типичные изображения неагрегированных (мономерный, А.) и агрегатов, сходных с амилоидными фибриллами (агрегированный, В.), препаратов пептида (GA)₂₀ DPR-белка. Увеличение: 66000. Масштабная метка: 0,5 мкм.

Фиг. 11. Определение специфичности связывания и $ЭК_{50}$ антител NI-308.18F7 и NI-308.15O7 в отношении препаратов мономерных и агрегированных пептидов (GA)₂₀ C9ORF72-DPR-белка с помощью непрямого иммуноферментного анализа связывания. Определение специфичности связывания и $ЭК_{50}$ антител NI-308.18F7 и NI-308.15O7 в отношении препаратов мономерных (●) и агрегированных (■) пептидов (GA)₂₀ C9ORF72-DPR-белка с помощью непрямого иммуноферментного анализа. Антитело NI-308.18F7 (А) распознавало мономерные и агрегированные препараты (GA)₂₀ с аффинностью связывания при $ЭК_{50}$ 0,87 и 0,89 нМ соответственно. Антитело NI-308.15O7 (В) связывалось с мономерными и агрегированными препаратами (GA)₂₀ с аффинностью связывания при $ЭК_{50}$ 0,53 и 0,78 нМ соответственно.

Фиг. 12. Определение специфичности связывания и $ЭК_{50}$ антител NI-308.18F7 и NI-308.15O7 в отношении препаратов мономерных и агрегированных пептидов (GA)₂₀ C9ORF72-DPR-белка с помощью ИФА в формате "сэндвич" для анализа связывания. Определение специфичности связывания и $ЭК_{50}$ антител NI-308.18F7 и NI-308.15O7 в отношении препаратов мономерных (●) и агрегированных (■) пептидов (GA)₂₀ C9ORF72-DPR-белка с помощью ИФА в формате "сэндвич". Антитело NI-308.18F7 (А) распознавало препараты мономерных и агрегированных (GA)₂₀ с аффинностью связывания при $ЭК_{50}$ 0,64 и 2,9 нМ соответственно. Антитело NI-308.15O7 (В) связывалось с препаратами мономерных и агрегированных (GA)₂₀ с величиной $ЭК_{50}$ 6,3 и 8,1 нМ соответственно. Не было обнаружено связывания антител в отсутствие His-меченых препаратов (GA)₂₀ (А). Данные по определению специфичности связывания и аффинности обобщены в таблице, представленной на фиг. 9.

Фиг. 13. Анализ целостности антитела NI-308. Исследование методом электрофореза в ДСН-ПААГ с последующим окрашиванием кумасси синим 5 мкг рекомбинантного происходящего от человека антитела NI-308 к C9ORF72-DPR. Были обнаружены две основные полосы ожидаемого размера, соответствующие тяжелой и легкой цепям антитела.

Фиг. 14. NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.5G2 и NI-308.4M1 детектируют патологические агрегаты C9ORF72-DPR-белка у пациентов с FTLT. (А) Происходящие от человека антитела NI-308.18F7, NI-308.15O7 и NI-308.5G2 выявили патологические нейрональные цитоплазматические включения, нейрональные внутриядерные включения и дистрофические нейриты в слое гранулярных клеток мозжечка во всех трех испытанных случаях C9ORF72-FTLT. В противоположность этому не неврологический контрольный мозжечок был отрицательным в отношении окрашивания NI-308.18F7, NI-308.15O7 и NI-308.5G2. Коммерчески доступное антитело C9RANT использовали в качестве контрольного антитела. Представлены типичные изображения. (В) Типичные изображения, сделанные при большом увеличении, нейрональных включений C9ORF72-DPR в слое гранулярных клеток мозжечка выбранного случая C9ORF72-FTLT, которые детектировали с помощью антител NI-308.18F7, NI-308.15O7 и NI-308.5G2. (С) Типичные изображения, сделанные при большом увеличении, нейрональных цитоплазматических и внутриядерных включений C9ORF72-DPR в слое гранулярных клеток мозжечка выбранного случая C9ORF72-FTLT, которые детектировали с помощью антитела NI-308.4M1. В противоположность этому не неврологический контрольный мозжечок был отрицательным в отношении окрашивания NI-308.4M1.

Фиг. 15. Поли-GA и поли-GP C9ORF72-DPR белки образуют коагрегаты. Присутствие патологических коагрегатов поли-GA и поли-GP C9ORF72-DPR-белков в гранулярном слое мозжечка пациента с FTLT, несущего удлинённый гексануклеотидный повтор C9ORF72. Антитело NI-308.18F7 распознавало поли-GA C9ORF72, тогда как антитело NI-308.5G2 специфично детектировало цитоплазматические и внутриядерные включения поли-GP C9ORF72. Подавляющее большинство агрегатов поли-GP DPR-белка были колокализированы с агрегатами поли-GA. Представлены типичные изображения.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к иммунотерапии и неинвазивным способам детектиро-

вания заболеваний и состояний, связанных с присутствием белков, содержащих дипептидные повторы (DPR), и в частности их агрегированных форм. Более конкретно настоящее изобретение относится к рекомбинантным моноклональным происходящим от человека антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые были получены на основании информации о последовательности, полученной из отобранных популяций доноров-людей, и которые способны связываться с указанными DPR, в частности повторами полиглицин-аланин (Gly-Ala, GA)-DPR, полиглицин-пролин (Gly-Pro; GP)-DPR, полиглицин-аргинин (Arg-Gly; GR)-DPR, полипролин-аргинин (Pro-Arg; PR)-DPR и/или полипролин-аланин (Ala-Pro; PA)-DPR и их антигенами. Рекомбинантные моноклональные происходящие от человека антитела согласно настоящему изобретению, а также их синтетические и биотехнологические производные предпочтительно характеризуются специфичным связыванием с измененным C9ORF72 с удлиненными гексануклеотидными повторами, образующими C9ORF72-дипептидные повторы (DPR). Как показано в примерах, рекомбинантные антитела согласно настоящему изобретению являются высокоспецифичными в качестве диагностического реагента для детектирования DPR и/или патологического C9ORF72 без ложноположительных результатов и благодаря наличию последовательностей человека, кодирующих по меньшей мере вариабельную область и CDR соответственно, созревание исходных антител в организме человека, как ожидается, будет эффективным и безопасным в качестве терапевтического агента.

Помимо этого в настоящем изобретении предложены моноклональные происходящие от человека антитела, включая любые их биотехнологические производные, описанные в настоящем документе, для применения в лечении пациентов, по отдельности или в комбинации с другими агентами, используемыми для лечения заболеваний, расстройств и/или симптомов, ассоциированных с DPR, причем предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению предназначено для введения одновременно с агентом, подавляющим дополнительные побочные эффекты, или последовательно перед или после введения указанного агента. В этой связи антитела к DPR согласно настоящему изобретению предпочтительно являются по существу неиммуногенными у человека. В одном из вариантов реализации настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие происходящее от человека моноклональное антитело согласно настоящему изобретению и один или более лекарственных препаратов, используемых для лечения заболеваний, расстройств и/или симптомов, связанных с DPR.

I. Определения.

Если не указано иное, в настоящей заявке термин определен, как это предусмотрено в Оксфордском словаре биохимии и молекулярной биологии, Oxford University Press, 1997, переработан в 2000 г. и повторно издан в 2003 г., ISBN 0198506732.

Следует отметить, что термин "a" или элемент "an" относится к одному или более из указанных элементов; например, следует понимать, что "антитело" представляет собой одно или более антител. Следовательно, термины "a" (или "an"), "один или более" и "по меньшей мере один" могут быть использованы в настоящем документе взаимозаменяемо.

Если конкретно не указано иное, в настоящей заявке термин "DPR", то есть белки, содержащие "дипептидный повтор", используется с конкретной ссылкой на повторяющиеся блоки из двух аминокислот, в частности, в связи с удлиненным гексануклеотидным повтором в гене. Термины "DPR" и "DPRs" также используются для общего обозначения всех типов и форм DPR, таких как GA, GR, GP, PA, PR и т.п. В дальнейшем настоящее изобретение, главным образом, будет описано в отношении антител, специфично распознающих DPR, содержащие или состоящие из GA предпочтительно с 15 повторами (GA₁₅), GP предпочтительно с 15 повторами (GP₁₅), GR предпочтительно с 15 повторами (GR₁₅), или PR предпочтительно с 15 повторами (PR₁₅), или PA предпочтительно с 15 повторами (PA₁₅), обычно наблюдаемые в C9ORF72-DPR-белках, обнаруженных в тканях головного мозга пациентов, страдающих FLTD или ALS. Однако несмотря на то, что антитела к C9ORF72-DPR представляют собой предпочтительный вариант реализации, настоящее изобретение в целом обеспечивает антитела к DPR белку и соответствующие варианты. Соответственно следует подчеркнуть, что, в принципе, любой вариант реализации и соответствующие признаки, раскрытые в настоящем документе и проиллюстрированные в примерах и фигурах, за исключением случаев, когда они применимы только конкретно к антителу к C9ORF72-DPR, также относятся к любому антителу к DPR в целом.

Другой пример заболевания, связанного с DPR, включает спиноцеребеллярную атаксию типа 36, медленно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, и подтип аутосомно-доминантной мозжечковой атаксии типа 1 (ADCA типа 1), которая характеризуется началом развития атаксии походки и конечностей во взрослом возрасте, снижением спастичности лимба, дизартрией, фасцикуляцией мышц, атрофией языка и гиперрефлексией. У некоторых пострадавших индивидуумов также может развиваться потеря слуха; см., например, Garcia-Murias et al., Brain 135 (2012), 1423-1435. Было показано, что спиноцеребеллярная атаксия типа 36 вызвана гетерозиготным удлинением интронного гексануклеотидного повтора GGCTG в гене NOP56 на хромосоме 20p13; см., например, Garcia-Murias et al., Brain 135 (2012), 1423-1435. Ikeda et al., Neurology 79 (2012), 333-341, Kobayashi et al., Am. J. Hum. Genet. 89 (2011), 121-130.

Термин "C9ORF72", если специально не указано иное, относится к измененным формам открытой рамки считывания 72 (C9ORF72) хромосомы 9. Термин "C9ORF72" также используется, чтобы в целом

определить удлинённые гексануклеотидные повторы C9ORF72, которые приводят к образованию C9ORF72-дипептидных повторов (DPR). Следовательно, данный термин также используется для обозначения C9ORF72-DPR. Термин "C9ORF72" также используется для общего обозначения всех видов и форм C9ORF72, таких как мутированный C9ORF72. Добавленные буквы перед терминами C9ORF72 используются для обозначения организма, из которого получен конкретный ортолог, например hC9ORF72 для C9ORF72 человека или MC9ORF72 для мыши.

Антитела к DPR, раскрытые в настоящем документе, предпочтительно связываются с C9ORF72-дипептидными повторами (DPR) и их эпитопами. Например, в настоящей заявке раскрыты антитела, которые специфично связываются с патологически изменёнными молекулами C9ORF72 или их фрагментами, т.е. дипептидными повторами, которые нестандартно транслируются с транскриптов C9ORF72 удлинённых интронных гексануклеотидных повторов C9ORF72, а также с агрегированными формами C9ORF72-DPR или их фрагментами. В настоящей заявке термин (патологически) агрегированный/агрегаты C9ORF72-DPR конкретно относится к вышеупомянутым формам. Термин (патологические) "агрегированные формы" или "агрегаты" описывает продукты накопления или образования кластеров вследствие ошибочной/патологической трансляции C9ORF72 с транскриптов C9ORF72 удлинённых интронных гексануклеотидных повторов C9ORF72. Указанные агрегаты, скопления или кластерные формы могут быть по существу состоят или состоят из C9ORF72-DPR-белка и/или его фрагментов. В настоящей заявке ссылка на антитело, которое "специфично связывается", "селективно связывается" или "преимущественно связывается" с C9ORF72-DPR, относится к антителу, которое не связывается с другими неродственными белками; см., например, фиг. 4. Как показано на фиг. 4 и в примере 5, антитела согласно настоящему изобретению по существу не распознают неродственные амилоидогенные белки, выбранные из группы, состоящей из спаренных спиральных нитей (PHF)-тау, тау, транзактивного ДНК-связывающего белка 43 (TDP-43), транстиретина (TTP), полноразмерного белка-предшественника амилоида (fIAPP) и/или хантингтина (HTT).

Согласно одному примеру антитело к C9ORF72-DPR, описанное в настоящем документе, может связываться с DPR и/или C9ORF72-DPR или их эпитопами и не проявляет связывания с другими белками, степень которого превышает примерно двукратную величину неспецифического связывания. Антитело, которое "специфично связывается" или "селективно связывается" с DPR и/или вариантом C9ORF72-DPR-белка относится к антителу, которое не связывается со всеми вариантами C9ORF72-DPR-белков, то есть не связывается по меньшей мере с одним другим конформером C9ORF72. Например, в настоящей заявке раскрыты антитела, которые могут преимущественно связываться с формами C9ORF72, содержащими удлинённые гексануклеотидные повторы, образующие DPR в условиях *in vitro* и в тканях, полученных от пациентов с заболеваниями, связанными с C9ORF72, или от пациентов, подверженных риску развития заболеваний, связанных с C9ORF72; см., например, пример 8 и фиг. 7.

Поскольку антитела к DPR согласно настоящему изобретению были выделены у субъектов-людей, то антитела к DPR согласно настоящему изобретению также можно назвать "аутоантителами человека" или "антителами человеческого происхождения (происходящие от человека антитела)", чтобы подчеркнуть, что указанные антитела действительно первоначально были экспрессированы у субъектов и не являются синтетическими конструкциями, полученными, например, с помощью фаговых библиотек, экспрессирующих иммуноглобулины человека, или ксеногенных антител, полученных в трансгенном животном, экспрессирующем часть репертуара иммуноглобулинов человека, которые до настоящего времени представляли один общий способ получения антител, сходных с антителами человека. С другой стороны, антитело, происходящее от человека, полученное в соответствии с настоящим изобретением, может быть обозначено как синтетическое, рекомбинантное и/или биотехнологическое, чтобы отличить его от сыровороточных антител человека *per se*, которые могут быть очищены с помощью белка А или аффинной колонки.

Конкретное преимущество терапевтического подхода согласно настоящему изобретению заключается в том, что антитела согласно настоящему изобретению получены из В-клеток или В-клеток памяти от здоровых индивидуумов, не имеющих признаков заболевания, которое возникает вследствие присутствия или связано с DPR-белками и их агрегированными формами, и, следовательно, с некоторой вероятностью, способны предотвращать клиническое проявление заболевания, связанного с агрегированными DPR-белками, такими как C9ORF72-DPR, или уменьшают риск возникновения клинически выраженного заболевания, или замедляют начало развития или прогрессирования клинически выраженного заболевания.

Как правило, антитела согласно настоящему изобретению также успешно прошли через соматическое созревание, т.е. оптимизацию в отношении селективности и эффективности высокой аффинности связывания с молекулами-мишенями DPR-белков посредством соматических изменений переменных областей антитела. Понимание того, что родственные или другие физиологические белки или клеточные структуры не активировали в указанных клетках в условиях *in vivo*, например, у человека, аутоиммунные или аллергические реакции также имеет большое медицинское значение, поскольку это означает существенно увеличенный шанс успешного прохождения фаз клинических исследований. Иными словами, эффективность, приемлемость и переносимость уже были продемонстрированы по меньшей мере у одного

субъекта-человека перед осуществлением доклинической и клинической разработки профилактического или терапевтического антитела. Следовательно, можно ожидать, что такие свойства происходящих от человека антител к DPR согласно настоящему изобретению как специфичная эффективность в отношении целевой структуры в качестве терапевтического агента и сниженная вероятность развития побочных эффектов значительно повышают клиническую вероятность успеха.

Напротив, антитела, полученные из дисплеев библиотек к ДНК или фаговых дисплеев, представляют собой искусственные молекулы, такие как гуманизированное антитело, которое по сути имеет мышинное происхождение и, следовательно, является чужеродным по отношению к организму человека. В этой связи клиническая целесообразность и эффективность терапевтических антител может быть ограничена выработкой антител к лекарственным препаратам (ADA), которые могут влиять на эффективность и фармакокинетику антител и иногда приводят к развитию серьезных побочных эффектов; см., например, Igawa et al., MAbs. 3 (2011), 243-252. В частности, гуманизированные антитела или антитела, полученные с помощью новейших технологий получения антител человека, отличаются от антител человека, таких как антитела согласно настоящему изобретению, способные индуцировать гуморальный ответ, при этом было установлено, что указанные антитела, сходные с антителами человека, полученные, например, из фагового дисплея, такие как адалимумаб, индуцируют выработку ADA; см., например, Mansour, Br. J. Ophthalmol 91 (2007), 274-276 и Igawa et al., MAbs. 3 (2011), 243-252. Следовательно, антитела, происходящие от человека, которые не индуцируют нежелательный иммунный ответ, являются более предпочтительными для пациента, чем искусственные молекулы, полученные из библиотек или дисплеев.

Следует понимать, что термин "пептид" включает термины "полипептид" и "белок" (которые время от времени могут быть использованы в настоящем документе как взаимозаменяемые) в пределах своего значения. Аналогичным образом, фрагменты белков и полипептидов также включены в объем настоящего изобретения и могут называться в настоящем документе "пептидами". Тем не менее, термин "пептид" предпочтительно обозначает аминокислотный полимер, содержащий по меньшей мере 5 смежных аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 10 смежных аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 15 смежных аминокислот, еще более предпочтительно по меньшей мере 20 смежных аминокислот и особенно предпочтительно по меньшей мере 25 смежных аминокислот. Помимо этого пептид в соответствии с настоящим изобретением, как правило, содержит не более 100 смежных аминокислот, предпочтительно менее 80 смежных аминокислот и более предпочтительно менее 50 смежных аминокислот.

В настоящей заявке термин "полипептид" включает отдельный "полипептид", а также многие "полипептиды" и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям, состоящим из двух или более аминокислот, и не относится к конкретной длине продукта. Следовательно, термины "пептиды", "дипептиды", "трипептиды", "олигопептиды", "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей, состоящих из двух или более аминокислот, включены в определение термина "полипептид", и термин "полипептид" может быть использован вместо или взаимозаменяемо с каким-либо из указанных терминов.

Термин "полипептид" также предназначен для обозначения продуктов модификаций полипептида после его экспрессии, включая, но не ограничиваясь ими, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование и дериватизацию известных защитных/блокирующих групп, протеолитическое расщепление или модификацию с использованием неприродных аминокислот. Полипептид может быть получен из природного биологического источника или получен с помощью рекомбинантной технологии, но не обязательно транслирован с обозначенной нуклеиновой последовательности. Полипептид может быть получен любым способом, включая химический синтез.

Размер полипептида согласно настоящему изобретению может составлять приблизительно 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 25 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 200 или более, 500 или более, 1000 или более, или 2000 или более аминокислот. Полипептиды могут иметь определенную трехмерную структуру, хотя они необязательно имеют такую структуру. Полипептиды с определенной трехмерной структурой называются свернутыми, и полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой и могут принимать большое количество различных конформаций, называются развернутыми. В настоящей заявке термин "гликопротеин" относится к белку, соединенному по меньшей мере с одним углеводным фрагментом, который присоединен к белку посредством кислородсодержащей или азотсодержащей латеральной цепи аминокислотного остатка, например остатка серина или остатка аспарагина.

Под "выделенным" полипептидом или его фрагментом, вариантом или производным подразумевают полипептид, который находится вне своей естественной среды. Какой-либо определенный уровень очистки не требуется. Например, выделенный полипептид может быть выделен из естественной или природной среды. Рекомбинантно полученные полипептиды и белки, экспрессированные в клетках-хозяевах, рассматриваются как выделенные применительно к настоящему изобретению, так же как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были отделены, фракционированы или частично или в значительной степени очищены с использованием любой подходящей методики.

Термин "рекомбинантные пептиды, полипептиды или белки" относится к пептидам, полипептидам или белкам, полученным с помощью методик рекомбинантных ДНК, т.е. полученным из клеток микробов или млекопитающих, трансформированных экзогенной конструкцией для экспрессии рекомбинантной ДНК, кодирующей гибридный белок, включая желаемый пептид. Белки или пептиды, экспрессированные в большинстве бактериальных культур, как правило, не содержат гликанов. Белки или полипептиды, экспрессированные в дрожжах, могут иметь характер гликозилирования, отличный от такового для белков и полипептидов, экспрессированных в клетках млекопитающих.

Полипептиды согласно настоящему изобретению также включают фрагменты, производные, аналоги или варианты указанных выше полипептидов, а также их синтетические или биологические варианты и любые комбинации. Термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог" включают пептиды и полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, которая в достаточной степени сходна с аминокислотной последовательностью природного пептида. Термин "в достаточной степени сходный" означает первую аминокислотную последовательность, которая содержит достаточное или минимальное количество идентичных или эквивалентных аминокислотных остатков по сравнению со второй аминокислотной последовательностью, так, что первая и вторая аминокислотные последовательности имеют общий структурный домен и/или общую функциональную активность. Например, аминокислотные последовательности, которые содержат общий структурный домен, который по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или по меньшей мере приблизительно на 100% идентичен, определены в настоящем документе как сходные в достаточной степени. Предпочтительные варианты будут в достаточной степени сходны с аминокислотной последовательностью предпочтительных пептидов согласно настоящему изобретению, в частности, с измененным белком C9ORF72, таким как патологические белки C9ORF72-DPR, а также с DPR-белками по отдельности, вариантами, производными или аналогами любого из них. Указанные варианты в целом сохраняют функциональную активность пептидов согласно настоящему изобретению. Варианты включают пептиды, аминокислотная последовательность которых отличается от таковой нативного пептида и пептида дикого типа соответственно, одной или более делециями, вставками и/или заменами аминокислот. Указанные варианты могут представлять собой природные варианты, а также искусственные варианты.

Помимо этого термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог" применительно к антителам или полипептидам антител согласно настоящему изобретению включают любые полипептиды, которые сохраняют, по меньшей мере, некоторые из антигенсвязывающих свойств соответствующей нативной связывающей молекулы, антитела или полипептида. Фрагменты полипептидов согласно настоящему изобретению включают протеолитические фрагменты, а также фрагменты, содержащие делеции, помимо конкретных фрагментов антител, обсуждаемых в настоящем документе в другом месте. Варианты антител и полипептидов антител согласно настоящему изобретению включают фрагменты, описанные выше, а также полипептиды с измененными аминокислотными последовательностями в результате замен, делеций или вставок аминокислот. Варианты могут иметь природное или неприродное происхождение. Неприродные варианты могут быть получены с использованием известных методов мутагенеза. Варианты полипептидов могут содержать консервативные или неконсервативные замены, делеции или вставки аминокислот. Производные молекул, специфично связывающих DPR-белки, например, антитела и полипептиды антител согласно настоящему изобретению, представляют собой полипептиды, которые были изменены так, чтобы придать им дополнительные функции, которые не свойственны нативному полипептиду. Примеры включают гибридные белки. Варианты полипептидов также могут быть упомянуты в настоящем документе как "аналоги полипептидов". В настоящей заявке термин "производное" связывающей молекулы или ее фрагмента, антитела или полипептида антитела относится к рассматриваемому полипептиду, содержащему один или более остатков, химически дериватизированных в результате реакции функциональной латеральной группы. В область настоящего изобретения в качестве "производных" также включены пептиды, которые содержат одно или более производных двадцати стандартных природных аминокислот. Например, пролин может быть замещен 4-гидроксипролином; лизин может быть замещен 5-гидроксилизином; гистидин может быть замещен 3-метилгистидином; серин может быть замещен гомосерином; и лизин может быть замещен орнитинном.

Определение сходства и/или идентичности молекул.

"Сходство" между двумя пептидами определяется путем сравнения аминокислотной последовательности одного пептида с последовательностью второго пептида. Аминокислота одного пептида сходна с соответствующей аминокислотой второго пептида, если она представляет собой идентичную аминокислоту или консервативную замену аминокислоты. Консервативные замены включают те, которые опи-

саны в Dayhoff, M.O., ed., The Atlas of Protein Sequence and Structure 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. (1978) и в Argos, EMBO J. 8 (1989), 779-785. Например, аминокислоты, принадлежащие к одной из следующих групп, представляют консервативные изменения или замены: Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr; Cys, Ser, Tyr, Thr; Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; Lys, Arg, His; Phe, Tyr, Trp, His и Asp, Glu.

"Сходство" между двумя полинуклеотидами определяется путем сравнения последовательности нуклеиновой кислоты одного полинуклеотида с последовательностью полинуклеотида. Нуклеиновая кислота одного полинуклеотида сходна с соответствующей нуклеиновой кислотой второго полинуклеотида, если она является идентичной или если нуклеиновая кислота является частью кодирующей последовательности, соответствующий триплет, содержащийся в нуклеиновой кислоте, кодирует аналогичную аминокислоту или консервативную замену аминокислоты.

Определение процента идентичности или сходства между двумя последовательностями предпочтительно осуществляются с использованием математического алгоритма, описанного в работе Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 5873-5877. Указанный алгоритм включен в программы BLASTn и BLASTp в Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, доступные в NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Определение процента идентичности или сходства производится с использованием стандартных параметров программ BLASTn для поиска полинуклеотидов в BLAST и программ BLASTp для поиска белков в BLAST в соответствии с рекомендациями на веб-странице NCBI и в "BLAST Program Selection Guide" в отношении последовательностей определенной длины и состава.

Поиск полинуклеотидов в BLAST выполняют с использованием программы BLASTn.

Для общих параметров значение поля "максимальное количество целевых последовательностей" может быть установлено 100, функция "короткие запросы" может быть активирована, значение поля "ожидаемый порог" может быть установлено 1000 и значение поля "размер слова" может быть установлено 7 в соответствии с рекомендациями для коротких последовательностей (менее 20 оснований) на веб-странице NCBI. Для более длинных последовательностей значение поля "ожидаемый порог" может быть установлено 10, значение поля "размер слова" может быть установлено 11. Для параметров подсчета баллов значение поля "баллы совпадения/несовпадения" может быть установлено 1-2, и значение поля "штраф за пропуск в последовательности" может быть установлено как линейное. Для фильтров и маскирующих параметров функция "участки низкой сложности" может быть деактивирована, функция "видоспецифичные повторы" может быть деактивирована, функция "маска только для таблицы поиска" может быть активирована, функция "настройки фильтра DUST" может быть активирована и функция "маска строчных букв" может быть деактивирована. В целом для указанных целей может быть использован "поиск коротких почти точных соответствий", который предоставляет большинство из указанных выше параметров. Дополнительную информацию можно найти в "BLAST Program Selection Guide", опубликованном на веб-странице NCBI.

Поиск белков в BLAST выполняют с использованием программы BLASTp. Для общих параметров значение поля "максимальное количество целевых последовательностей" может быть установлено 100, функция "короткие запросы" может быть активирована, значение поля "ожидаемый порог" может быть установлено 10, и значение поля "размер слова" может быть установлено 3. Для параметров подсчета баллов поле "матрица" может быть установлено "BLOSUM62", поле "штраф за пропуск в последовательности" может быть установлено "существующий пропуск: 11; продление пропуска: 1", значение поля "композиционные настройки" может быть установлено "Условные композиционные настройки оценочной матрицы". Для фильтров и параметров маскирования функция "участки низкой сложности" может быть деактивирована, функция "маска только для таблицы поиска" может быть деактивирована и функция "маска строчных букв" может быть деактивирована.

Модификации обеих программ, например, в отношении длины искомых последовательностей, осуществляют в соответствии с рекомендациями, приведенными в "BLAST Program Selection Guide", опубликованном в виде файлов с расширением "HTML" и "PDF" на веб-странице NCBI.

Полинуклеотиды.

Термин "полинуклеотид" включает отдельную нуклеиновую кислоту, а также множество нуклеиновых кислот, и относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты или конструкции, например матричной РНК (мРНК) или плазмидной ДНК (пДНК). Полинуклеотид может содержать обычную фосфодиэфирную связь или нестандартную связь (например, амидную связь, например, такую, которая присутствует в пептидных нуклеиновых кислотах (PNA)). Термин "нуклеиновая кислота" относится к любому одному или более сегментам нуклеиновых кислот, например фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде. Термин "выделенная" нуклеиновая кислота или полинуклеотид обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая была выделена из естественной среды. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий антитело, содержащийся в векторе, считается выделенным для целей настоящего изобретения. Другие примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, поддерживаемые в гетерологичных клетках-хозяевах или очищенные (частично или по существу) полинуклеотиды в растворе. Выделенные молекулы РНК включают транс-

крипты РНК полинуклеотидов согласно настоящему изобретению в условиях *in vivo* или в условиях *in vitro*. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению дополнительно включают указанные молекулы, полученные синтетическим путем. Помимо этого полинуклеотид или нуклеиновая кислота может содержать регуляторный элемент, такой как промотор, сайт связывания рибосом или терминатор транскрипции, или не содержать указанные элементы.

В настоящей заявке термин "кодирующая область" представляет собой часть нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Несмотря на то, что "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) не транслируется в аминокислоту, он может рассматриваться как часть кодирующей области, однако любые фланкирующие последовательности, например промоторы, участки связывания рибосомы, терминаторы транскрипции, интроны и т.п., не являются частью кодирующей области. Два или более кодирующих участка согласно настоящему изобретению могут присутствовать в одной полинуклеотидной конструкции, например на одном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например на отдельных (различных) векторах. Помимо этого любой вектор может содержать один кодирующий участок или может содержать два или более кодирующих участка, например один вектор может кодировать отдельно варибельную область тяжелой цепи иммуноглобулина и варибельную область легкой цепи иммуноглобулина. Помимо этого вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению могут кодировать гетерологичные кодирующие участки, гибридизованные или негибридизованные с нуклеиновой кислотой, кодирующей связывающую молекулу, антитело или фрагмент, вариант или его производное. Гетерологичные кодирующие участки содержат, но не ограничиваются ими, специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В случае ДНК полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, как правило, может содержать промотор и/или другие элементы, контролирующие транскрипцию или трансляцию, функционально связанные с одним или более кодирующими участками. Функциональная связь представляет собой связь, при которой кодирующий участок генного продукта, например полипептида, связан с одной или более регуляторными последовательностями так, чтобы экспрессия генного продукта находилась под влиянием или контролем регуляторной последовательности(ей). Два фрагмента ДНК (такие как участок, кодирующий полипептид, и промотор, связанный с ним) являются "функционально ассоциированными" или "функционально связанными", если индукция функции промотора приводит к транскрипции мРНК, кодирующей нужный генный продукт и если природа связи между двумя фрагментами ДНК не нарушает способность последовательностей, регулирующих экспрессию, направлять экспрессию генного продукта или не нарушает транскрипцию ДНК-матрицы. Следовательно, промоторный участок может быть функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если промотор был способен осуществлять транскрипцию указанной нуклеиновой кислоты. Промотор может представлять собой клеточно-специфичный промотор, который направляет значимую транскрипцию ДНК только в заранее определенных клетках. Другие элементы, контролирующие транскрипцию, помимо промотора, например энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминирования транскрипции, могут быть функционально связаны с полинуклеотидом, чтобы направлять клеточно-специфичную транскрипцию. Подходящие промоторы и другие участки, контролирующие транскрипцию, раскрыты в настоящем документе.

Различные участки, контролирующие транскрипцию, известны специалистам в данной области техники. Указанные участки включают, но не ограничиваются ими, участки, контролирующие транскрипцию, которые функционируют в клетках позвоночных, такие как, но не ограничиваясь ими, промоторные и энхансерные сегменты из цитомегаловирусов (немедленный ранний промотор в комбинации с интроном А), вируса обезьян 40 (промотор ранних генов) и ретровирусов (например, вируса саркомы Рауса). Другие участки, контролирующие транскрипцию, включают те, которые получены из генов позвоночных, таких как актин, белок теплового шока, бычий гормон роста и бета-глобин кролика, а также других последовательностей, способных контролировать экспрессию генов в эукариотических клетках. Дополнительные подходящие участки, контролирующие транскрипцию, включают тканеспецифичные промоторы и энхансеры, а также лимфокининдуцируемые промоторы (например, промоторы, индуцируемые интерферонами или интерлейкинами).

Помимо этого различные элементы контроля транскрипции известны специалистам в данной области техники. Указанные элементы включают, но не ограничиваются ими, сайты связывания рибосом, кодоны инициации и терминирования трансляции и элементы, полученные из пикорнавирусов (в частности, сайт внутренней посадки рибосомы или IRES, также называемый последовательностью CITE).

Согласно другим вариантам реализации полинуклеотид согласно настоящему изобретению представляет собой РНК, например матричную РНК (мРНК).

Полинуклеотид и участки, кодирующие нуклеиновые кислоты, согласно настоящему изобретению могут быть связаны с дополнительными кодирующими участками, которые кодируют секреторные или сигнальные пептиды, которые направляют секрецию полипептида, кодируемого полинуклеотидом согласно настоящему изобретению. В соответствии с гипотезой о передаче сигналов белки, секретируемые

клетками млекопитающих, содержат сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, которая отщепляется от зрелого белка после инициации экспорта растущей белковой цепи через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Специалисты в данной области техники поймут, что полипептиды, секретируемые клеткой позвоночных, обычно содержат сигнальный пептид, гибридный с N-концом полипептида, который отщепляется от полного или "полноразмерного" полипептида с получением секретируемой или "зрелой" формы полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения используется нативный сигнальный пептид, например сигнальный пептид тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина, или функциональное производное указанной последовательности, которое сохраняет способность направлять секрецию полипептида, который функционально с ним связан. Согласно другому варианту можно применять гетерологичный сигнальный пептид млекопитающего или его функциональное производное. Например, лидерная последовательность дикого типа может быть заменена лидерной последовательностью тканевого активатора плазминогена человека (ТРА) или бета-глюкуронидазы мыши.

Применительно к настоящему изобретению термин "связывающая молекула" относится, прежде всего, к антителам и их фрагментам, но также может относиться к другим молекулам, не являющимся антителами, которые связываются с белками, содержащими дипептидные повторы (DPR), предпочтительно, которые связываются с измененным C9ORF72, в частности с (патологически) измененным C9ORF72-DPR, включая, но не ограничиваясь ими, гормоны, рецепторы, лиганды, молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС), шапероны, такие как белки теплового шока (HSP), а также молекулы межклеточной адгезии, такие как члены суперсемейств кадгеринов, интегринов, лектинов С-типа и иммуноглобулинов (Ig). Следовательно, для ясности понимания настоящего изобретения и не ограничивая объем настоящего изобретения, большинство из следующих вариантов реализации обсуждается в отношении антител и антителоподобных молекул, которые представляют собой предпочтительные связывающие молекулы для разработки терапевтических и диагностических агентов.

Антитела.

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

Как будет описано более подробно ниже, термин "иммуноглобулин" включает различные общие классы полипептидов, которые можно отличить биохимическими способами. Специалисты в данной области техники поймут, что тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ , ϵ), включая ряд их подклассов (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Тип тяжелых цепей определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA, IgG или IgE соответственно. Подклассы иммуноглобулинов (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д., хорошо охарактеризованы и, как известно, обеспечивают функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из указанных классов и изотипов легко различимы для специалиста в данной области техники, применительно к настоящему описанию, и соответственно находятся в пределах объема настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов явным образом включены в объем настоящего изобретения, дальнейшее обсуждение будет посвящено в целом классу молекул иммуноглобулинов IgG. В отношении IgG стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 Да и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой 53000-70000 Да. Четыре цепи обычно соединены дисульфидными связями в конфигурации "Y", при этом легкие цепи скреплены с тяжелыми цепями, начиная с устья "Y", и тянутся по всей длине вариабельной области.

Легкие цепи классифицируются как каппа и лямбда (κ , λ). Тяжелая цепь каждого класса может быть связана с каппа или лямбда легкой цепью. В целом легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, и "концевые" участки двух тяжелых цепей связаны друг с другом посредством ковалентных дисульфидных связей или нековалентных связей, если иммуноглобулины получены с помощью гибридом, В-клеток или генетически сконструированных клеток-хозяев. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности начинаются от N-конца на разветвленных концах Y-конфигурации и заканчиваются C-концом в нижней части каждой цепи.

Легкие и тяжелые цепи разделены на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константные" и "вариабельные" области используются функционально. В этой связи следует принять во внимание, что вариабельные области легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепей определяют распознавание антигена и специфичность. И наоборот, константные области легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание с рецептором Fc, связывание комплемента и т.п. В соответствии с общепринятыми правилами нумерация доменов константной области увеличивается по мере удаления от антигенсвязывающего сайта или амина-конца антитела. N-концевой участок представляет собой вариабельную об-

ласть, и С-концевой участок представляет собой константную область; домены CH3 и CL фактически содержат карбоксиконец тяжелой и легкой цепей соответственно.

Как было указано выше, вариабельная область позволяет антителу селективно распознавать и специфично связывать эпитопы на антигенах. То есть область V_L и область V_H или подгруппа определяющих комплементарность участков (CDR), антитела объединены с образованием вариабельной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Данная четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно антигенсвязывающий сайт определяется тремя CDR на каждой из цепей V_H и V_L . Любое антитело или фрагмент иммуноглобулина, структура которого позволяет ему специфично связываться с DPR, в частности, с измененным C9ORF72, образующим C9ORF72-DPR, взаимозаменяемо обозначается в настоящем документе как "связывающий фрагмент" или "иммуноспецифичный фрагмент".

Как описано в примере 11 и показано на фиг. 13, антитела согласно настоящему изобретению, которые экспрессируются в виде IgG, предпочтительно IgG1 в клетках млекопитающих, в частности клетках линии CHO-S, имели высокую целостность по отношению к частям легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепей, при этом не было обнаружено каких-либо существенных загрязнений или продуктов протеолитического разложения.

Природные антитела содержат шесть определяющих комплементарность участков, иногда называемых "определяющие комплементарность области" или "CDR", присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, которые представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, специфично расположенные так, чтобы формировать антигенсвязывающий домен, после того как антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. "CDR" фланкированы четырьмя относительно консервативными участками "каркаса" или "FR", для которых менее характерна межмолекулярная изменчивость. Каркасные участки преимущественно имеют конформацию β -листа, и CDR образуют петли, которые соединяют и в некоторых случаях образуют часть структуры β -листа. Следовательно, каркасные участки образуют каркас, который обеспечивает размещение CDR в правильной ориентации с помощью межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный правильно размещенными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Указанная комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с его когнатным эпитопом. Аминокислоты, содержащие CDR и каркасные участки соответственно, могут быть легко идентифицированы для любой заданной вариабельной области тяжелой или легкой цепи специалистом в данной области техники, поскольку они были точно определены; см., работы "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983) и Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

В том случае, если имеется два или более определений термина, который используется и/или принят в данной области техники, то определение термина в настоящей заявке включает все имеющиеся значения, если явно не указано обратное. Конкретным примером является использование термина "определяющий комплементарность участок" ("CDR") для описания несмежных антигенсвязывающих сайтов, найденных в пределах вариабельной области тяжелой и легкой цепей полипептидов. Данный конкретный участок был описан в работах Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) и Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки, при этом определения включают перекрывающиеся аминокислотные остатки или подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, применение любого определения для обозначения CDR антитела или его вариантов включено в объем указанного термина, который определен и используется в настоящем документе. Соответствующие аминокислотные остатки, которые составляют CDR, определенные в каждой из процитированных выше ссылок, представлены ниже в табл. I для сравнения. Точные номера остатков, которые составляют конкретный CDR, будут варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут рутинно определить, какие остатки составляют конкретный определяющий комплементарность участок или CDR из антитела человека подтипа IgG, учитывая аминокислотную последовательность вариабельной области антитела.

Таблица I

Определения CDR ¹		
	Кабат (Kabat)	Чотна (Chothia)
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

¹ - нумерация всех определений CDR в табл. I представлена в соответствии с правилами нумерации, установленными Kabat et al. (см. ниже).

В работе Kabat et al. также определена система нумерации для последовательностей переменных областей, которая применима к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначно применить систему "нумерации по Kabat" для любой последовательности переменной области без ссылки на любые экспериментальные данные, помимо самой последовательности. В настоящем документе термин "нумерация по Kabat" относится к системе нумерации, предложенной в работе Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Если не указано иное, ссылки на нумерацию положений конкретных аминокислотных остатков в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, варианте или производном согласно настоящему изобретению представлены в соответствии с системой нумерации по Kabat, которая, однако, является теоретической и не может быть применена в равной степени к каждому антителу согласно настоящему изобретению. Например, в зависимости от положения первого CDR следующие участки CDR могут быть смещены в любом направлении.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, иммуноспецифичные фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, полиспецифичные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, антитела, содержащие фрагменты антител приматов, антитела, содержащие фрагменты антител мыши, или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитопсвязывающие фрагменты, например Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fvs, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидными связями Fv (sdFv), фрагменты, содержащие домен V_L или V_H, фрагменты, полученные с помощью библиотеки экспрессии Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела к антителам, описанным в настоящем документе). Молекулы scFv известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США 5892019. Иммуноглобулин или молекулы антител согласно настоящему изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекул иммуноглобулинов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению не является IgM или его производным, имеющим пентавалентную структуру. В частности, в конкретных вариантах применения настоящего изобретения, в частности терапевтического применения, IgM является менее подходящим, чем IgG и другие двухвалентные антитела или соответствующие связывающие молекулы, поскольку IgM благодаря их пентавалентной структуре и отсутствию созревания аффинности часто вступают в неспецифичные перекрестные реакции и имеют очень низкую аффинность. В особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению не является поликлональным антителом, то есть оно по существу состоит из одного конкретного вида антител, а не является смесью, полученной из иммуноглобулинов образца плазмы крови.

Фрагменты антител, включая одноцепочечные антитела, могут содержать переменную область(и) по отдельности или в комбинации с полноразмерным вариантом или частью: шарнирной области, домена CH1, CH2 и CH3. В область настоящего изобретения также включены DPR-связывающие фрагменты, которые содержат любую комбинацию переменной области(ей) и шарнирной области, домена CH1, CH2 и CH3. Антитела или их иммуноспецифичные фрагменты согласно настоящему изобретению могут быть любого животного происхождения, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. Согласно другому варианту реализации переменная область может быть получена из хрящевых рыб (например, акул).

Согласно одному аспекту антитело согласно настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело человека. Участок каркаса антитела человека необязательно может быть выровнен и принят в соответствии с соответствующими последовательностями переменных областей зародышевой линии человека в базе данных; см., например, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), организованной Центром белковой инженерии Совета по исследованиям в области медицины (MRC) (Кембридж, Великобритания). Например, аминокислоты, которые, как полагают, потенциально отклоняются от истинной последовательности зародышевой линии, могут быть связаны с последовательностями праймеров для ПНР, включенными в процессе клонирования. По сравнению с искусственно полученными антителами, сходными с антителами человека, такими как, например, фрагменты одноцепочечных антител (scFv) из библиотеки фагового дисплея антител или ксеногенных мышей, моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению характеризуется тем, что (i) оно получено с использованием иммунного ответа человека, а не ответа у замещающих животных, т.е. антитело было получено в ответ на природные DPR и DPR белки, предпочтительно C9ORF72-DPR в соответствующей конформации в организме человека, (ii) защищает индивидуума или является, по меньшей мере, существенным для присутствия DPR, предпочтительно C9ORF72-DPR, и (iii) поскольку антитело представляет собой антитело человека, то риск перекрестной реактивности против аутоантигенов сведен к минимуму; см. также ссылки выше. Следовательно, в соответствии с настоящим изобретением термины "моноклональное антитело челове-

ка", "моноклональное аутоантитело человека", "антитело человека" и т.п. используются для обозначения DPR-связывающей молекулы, которая имеет человеческое происхождение, т.е. которая была выделена из клетки человека, такой как В-клетка или гибридома, или кДНК которой была непосредственно клонирована из мРНК клетки человека, например В-клетки памяти человека. Антитело человека все еще рассматривается как антитело "человека", т.е. человеческого происхождения, даже если в антителе сделаны замены аминокислот, например, чтобы улучшить характеристики связывания. Применительно к антителам человека в отличие от гуманизированных антител и иных антител, сходных с антителами человека, см. также обсуждение ниже, антитела, происходящие от человека согласно настоящему изобретению, характеризуются тем, что они содержат CDR, которые ранее были распознаны иммунной системой человека и, следовательно, по существу риск их иммуногенности снижен. Следовательно, антитела согласно настоящему изобретению все еще можно рассматривать как антитела, происходящие от человека, если по меньшей мере один, предпочтительно два и наиболее предпочтительно все три CDR одной или обеих переменных областей легкой и тяжелой цепей антитела получены из антител человека, описанных в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитела, происходящие от человека, согласно настоящему изобретению содержат гетерологичные участки по сравнению с природными антителами, например замены аминокислот в участке каркаса, константную область, экзогенно гибридованную с переменной областью, различные аминокислоты на С- или N-конце и т.п.

Антитела, полученные из библиотек иммуноглобулинов человека или из животных, трансгенных по одному или более иммуноглобулинам человека и не экспрессирующих эндогенные иммуноглобулины, как описано ниже и, например, в патенте США 5939598 Kucherlapati et al., обозначены как человекоподобные антитела для того чтобы отличить их от истинных антител человека согласно настоящему изобретению. Например, спаривание тяжелых и легких цепей человекоподобных антител, например синтетических и полусинтетических антител, как правило, выделенных из фагового дисплея, не обязательно отражает исходное спаривание, которое имело место в исходной В-клетке человека. Соответственно фрагменты Fab и scFv, полученные из рекомбинантных библиотек экспрессии, обычно используемых в предшествующем уровне техники, можно рассматривать как искусственные со всеми возможными сопутствующими эффектами в отношении иммуногенности и стабильности. Напротив, в настоящем изобретении предложены выделенные антитела с созревшей аффинностью, полученные от отобранных субъектов-людей, которые характеризуются терапевтической пригодностью и переносимостью у человека.

В настоящей заявке термин "антитело, содержащее фрагменты антител грызунов" или "иммуноглобулин, содержащий фрагменты антител грызунов" относится к антителу, содержащему один или более CDR из антитела человека согласно настоящему изобретению; и участку каркаса человека, который содержит замены и/или делеции и/или вставки аминокислот, основанному на последовательности антитела грызуна. При упоминании грызунов предпочтительно применяют последовательности, полученные от мышей и крыс, при этом антитела, содержащие указанные последовательности, называются "антитела, содержащие фрагменты антител мыши" или "антитела, содержащие фрагменты антител крысы" соответственно. Иммуноглобулин человека, из которого получены участки CDR, называется "исходным" или "акцепторным", и антитело грызуна, из которого получены последовательности для модификации каркаса, называется "донором". Константные области не должны присутствовать, однако если они присутствуют, то, как правило, они по существу идентичны константным областям антител грызунов, т.е. идентичны по меньшей мере приблизительно на 85-90%, предпочтительно приблизительно на 95% или более. Следовательно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полноразмерный иммуноглобулин, который содержит тяжелую или легкую цепи человека и фрагменты из последовательности антитела мыши, содержит константную область мыши, CDR человека и по существу каркас человека, который содержит ряд замен аминокислот аминокислотами из последовательности иммуноглобулина мыши. Как правило, "антитело, содержащее фрагменты антител мыши" представляет собой антитело, содержащее переменную легкую цепь, содержащую фрагменты антител мыши, и/или переменную тяжелую цепь, содержащую фрагменты антител мыши. Например, антитело, содержащее фрагменты антител мыши, не будет включать типичные химерные антитела, например, поскольку вся переменная область химерного антитела не является переменной областью мыши. Модифицированное антитело, которое было модифицировано для включения фрагментов антитела мыши, связывается с тем же антигеном, что и исходное антитело, которое обеспечивает CDR, и, как правило, менее иммуногенно у мышей по сравнению с исходным антителом. Вышеприведенные пояснения в отношении "антител, содержащих фрагменты антител мыши" аналогично применимы для "антител, содержащих фрагменты антител грызунов", таких как "антитела, содержащие фрагменты антител крысы", в которых последовательность крысы используется вместо последовательности мыши.

В настоящей заявке "участок тяжелой цепи" содержит аминокислотные последовательности, полученные из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий часть тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один из домена CH1, шарнирной области (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю часть шарнирной области), домена CH2, домена CH3 или его варианта или фрагмента. Например, связы-

вающий полипептид для применения в соответствии с настоящим изобретением может содержать полипептидную цепь, содержащую домен СН1; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирной области и домен СН2; полипептидную цепь, содержащую домен СН1 и домен СН3; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирной области и домен СН3, или полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирной области, домен СН2 и домен СН3. Согласно другому варианту реализации полипептид согласно настоящему изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен СН3. Помимо этого связывающий полипептид для применения в соответствии с настоящим изобретением может быть лишен по меньшей мере части домена СН2 (например, всего или части домена СН2). Как указано выше, специалист в данной области техники поймет, что указанные домены (например, части тяжелых цепей) могут быть модифицированы так, что они отличаются по аминокислотной последовательности от нативных молекул иммуноглобулинов.

В некоторых антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных, раскрытых в настоящем документе, части тяжелой цепи одной полипептидной цепи мультимера идентичны таковым на второй полипептидной цепи мультимера. Согласно другому варианту реализации мономер, содержащий участки тяжелой цепи согласно настоящему изобретению, не являются идентичными. Например, каждый мономер может содержать другой сайт связывания мишени, образуя, например, биспецифичное антитело или диатело.

Согласно другому варианту реализации антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, описанные в настоящем документе, состоят из одной полипептидной цепи, такой как scFv, и должны быть экспрессированы внутри клеток (интратела) для возможного терапевтического и диагностического применения в условиях *in vivo*.

Части тяжелой цепи связывающего полипептида для применения в диагностических и терапевтических способах, раскрытых в настоящем документе, могут быть получены из различных молекул иммуноглобулинов. Например, часть тяжелой цепи полипептида может содержать домен СН1, полученный из молекулы IgG1, и шарнирную область, полученную из молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать шарнирную область, полученную частично из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать химерную шарнирную область, полученную частично из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG4.

В настоящей заявке термин "участок легкой цепи" содержит аминокислотные последовательности, полученные из легкой цепи иммуноглобулина. Предпочтительно участок легкой цепи содержит по меньшей мере один из доменов VL или CL.

Минимальный размер эпитопа пептида или полипептида для антитела, как полагают, составляет приблизительно от четырех до пяти аминокислот. Эпитопы пептидов или полипептидов предпочтительно содержат по меньшей мере семь, более предпочтительно по меньшей мере девять и наиболее предпочтительно по меньшей мере от приблизительно 15 до приблизительно 30 аминокислот. Поскольку CDR может распознать антигенный пептид или полипептид в его третичной форме, аминокислоты, составляющие эпитоп, не обязательно должны быть смежными и в некоторых случаях могут быть расположены на разных пептидных цепях. Согласно настоящему изобретению эпитоп пептида или полипептида, распознаваемый антителами согласно настоящему изобретению, содержит последовательность, состоящую по меньшей мере из 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, более предпочтительно по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или от приблизительно 15 до приблизительно 30 смежных или не смежных аминокислот, таких как DPR GA₁₅, обнаруженных в C9ORF72-DPR. Иными словами, антитело согласно настоящему изобретению или его биотехнологическое производное предпочтительно распознает DPR с числом дипептидных повторов, состоящих из двух различных аминокислот X и X' (XXX и XXX'; XaaXaa'), например от 3 до 50, предпочтительно от 10 до 40, более предпочтительно от 15 до 30 и наиболее предпочтительно 15. Следовательно, эпитоп или антиген, распознаваемый антителом согласно настоящему изобретению или его биотехнологическим производным, если он состоит из DPR с числом повторов 15, в целом может быть обозначен как (XX')₁₅.

В настоящей заявке термины "специфично связывающийся" или "специфично распознающий", используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, означают, что связывающаяся молекула, например антитело, связывается с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена, а также то, что связывание подразумевает присутствие определенной степени комплементарности между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно этому определению антитело "специфично связывается" с эпитопом, если оно связывается с данным эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена легче, чем оно может связаться со случайным неродственным эпитопом. Термин "специфичность" используется в настоящем документе, чтобы квалифицировать относительную аффинность, с помощью которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, как полагают, антитело "А" может иметь более высокую специфичность в отношении конкретного эпитопа, чем антитело "В", или антитело "А", можно сказать, связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью, чем его специфичность в отношении родственного эпитопа "D".

В случае его упоминания термин "иммунологические характеристики связывания" или другие характеристики связывания антитела с антигеном во всех его грамматических формах относится к специфичности, аффинности перекрестной реактивности и другим характеристикам связывания антитела.

Под термином "преимущественно связывающийся" подразумевают, что связывающая молекула, например антитело, специфично связывается с эпитопом легче, чем оно может связаться с родственным, сходным, гомологичным или аналогичным эпитопом. Следовательно, антитело, которое "преимущественно связывается" с конкретным эпитопом, более вероятно свяжется с этим эпитопом, чем с родственным эпитопом, даже если указанное антитело может перекрестно реагировать с родственным эпитопом.

В качестве неограничивающего примера связывающая молекула, например антитело, может рассматриваться как связывающаяся предпочтительно с первым эпитопом, если она связывается с указанным первым эпитопом с константой диссоциации (KD), которая меньше, чем KD антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере антитело может рассматриваться как связывающееся с первым антигеном, если оно преимущественно связывается с первым эпитопом с аффинностью, величина которой по меньшей мере на один порядок ниже, чем величина KD антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере антитело может рассматриваться как связывающееся с первым эпитопом, если оно преимущественно связывается с первым эпитопом с аффинностью, величина которой по меньшей мере на два порядка ниже величины KD антитела для второго эпитопа.

В другом неограничивающем примере связывающая молекула, например антитело, может рассматриваться как преимущественно связывающаяся с первым эпитопом, если она связывается с первым эпитопом с константой обратной реакции (k_{off}), величина которой меньше, чем величина k_{off} антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере антитело может рассматриваться как преимущественно связывающееся с первым эпитопом, если оно связывается с первым эпитопом с аффинностью, величина которой по меньшей мере на один порядок ниже, чем величина k_{off} антитела для второго эпитопа. В другом неограничивающем примере антитело может рассматриваться как связывающееся с первым эпитопом, если оно преимущественно связывается с первым эпитопом с аффинностью, величина которой по меньшей мере на два порядка ниже, чем величина k_{off} антитела для второго эпитопа.

Связывающая молекула, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, описанное в настоящей заявке, может рассматриваться как связывающееся с DPR или его фрагментом, вариантом или специфичной конформацией с величиной k_{off} , которая меньше или равна $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, 10^{-2} c^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-3} c^{-1} . Более предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению может рассматриваться как связывающееся с DPR-белками или их фрагментом, вариантом или специфичной конформацией с величиной k_{off} , которая меньше или равна $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, 10^{-4} c^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-5} c^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$, 10^{-6} c^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-7} c^{-1} . В особенно предпочтительном варианте реализации DPR представляет собой DPR, связанный с C9ORF72, т.е. C9ORF72-DPR.

Связывающая молекула, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, раскрытое в настоящем документе, может рассматриваться как связывающееся с DPR или его фрагментом, вариантом или специфичной конформацией с величиной скорости прямой реакции (k_{on}), которая больше или равна $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Более предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению можно рассматривать как связывающееся с DPR или его фрагментом, вариантом или специфичной конформацией с величиной скорости прямой реакции (k_{on}), которая больше или равна $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, или $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения связывающая молекула может рассматриваться как связывающаяся с C9ORF72-DPR или его фрагментом, вариантом или специфичной конформацией с величиной k_{on} , которая больше или равна $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Более предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению можно рассматривать как связывающееся с C9ORF72-DPR или его фрагментом, вариантом или специфичной конформацией с величиной k_{on} , которая больше или равна $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, или $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, или $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

Связывающую молекулу, например антитело, можно рассматривать как конкурентно ингибирующую связывание эталонного антитела с данным эпитопом, если она преимущественно связывается с данным эпитопом в такой степени, что она блокирует до некоторой степени связывание эталонного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование может быть определено любым способом, известным в данной области техники, например, с помощью иммуоферментного анализа (ИФА) конкурентного связывания. Антитело можно рассматривать как конкурентно ингибирующее связывание эталонного антитела с данным эпитопом по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 50%.

В настоящей заявке термин "аффинность" относится к измерению прочности связывания отдельного эпитопа с CDR связывающей молекулы, например молекулы иммуноглобулина; см., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) на с. 27, 28. В настоящей заявке термин "авидность" относится к общей стабильности комплекса между популяцией иммуноглобулинов и антигеном, т.е. к функциональной суммарной прочности смеси иммуноглобулинов с антигеном; см., например, Harlow на с. 29-34. Авидность связана с аффинностью отдельных молекул

иммуноглобулина в популяции в отношении конкретных эпитопов и валентностями иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между двухвалентным моноклональным антителом и антигеном с многократно повторяющейся структурой эпитопа, таким как полимер, может быть примером высокой авидности. Аффинность или авидность антитела в отношении антигена может быть определена экспериментально с использованием любого подходящего способа; см., например, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" в *Fundamental Immunology*, Paul, W.E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kubly, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company New York, N Y (1992), и способов, описанных в настоящем документе. Общие методики измерения аффинности антитела в отношении антигена включают ИФА, РИА и поверхностный плазмонный резонанс. Измеренная величина аффинности конкретного взаимодействия антитело-антиген может варьироваться при измерении в различных условиях, например концентрации соли, pH. Следовательно, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров, например KD, ЭК₅₀, предпочтительно осуществляют с использованием стандартизированных растворов антитела и антигена и стандартизированного буфера.

Связывающая молекула, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению также могут быть описаны или определены с точки зрения их перекрестной реактивности. В настоящей заявке термин "перекрестная реактивность" относится к способности антитела, специфичного в отношении одного антигена, взаимодействовать со вторым антигеном; т.е. это мера связанности между двумя различными антигенными веществами. Следовательно, антитело обладает перекрестной реактивностью, если оно связывается с эпитопом, отличным от того, который индуцировал его образование. Эпитоп с перекрестной реактивностью обычно содержит многие из тех же комплементарных структурных особенностей, что и индуцирующий эпитоп, и в некоторых случаях может быть более комплементарным, чем исходный эпитоп.

Например, некоторые антитела имеют определенную степень перекрестной реактивности так, что они связываются с родственными, но не идентичными эпитопами, например эпитопами, обладающими по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 55% и по меньшей мере 50% идентичностью (рассчитанной с использованием способов, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе) с эталонным эпитопом. Антитело можно рассматривать как практически лишенное перекрестной реактивности, если оно не связывается с эпитопами с менее чем 95%, менее чем 90%, менее чем 85%, менее чем 80%, менее чем 75%, менее чем 70%, менее чем 65%, менее чем 60%, менее чем 55% и менее чем 50% идентичностью (рассчитанной с использованием способов, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе) с эталонным эпитопом. Антитело можно рассматривать как "высокоспецифичное" в отношении определенного эпитопа, если оно не связывается с каким-либо иным аналогом, ортологом или гомологом указанного эпитопа.

Связывающие молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению также могут быть описаны или определены с точки зрения их аффинности связывания с DPR и/или мутированными молекулами C9ORF72, содержащими C9ORF72-DPR и/или их фрагменты. Предпочтительные величины аффинности связывания включают величину константы диссоциации или Kd менее 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M или 10^{-15} M.

Как было указано ранее, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В настоящей заявке термин "VN-домен" включает аминоконцевую вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, и термин "CH1 домен" включает первую (наиболее близкую к аминоконцу) константную область тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен CH1 примыкает к домену VN и расположен на аминоконце относительно шарнирной области тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина.

В настоящей заявке термин "домен CH2" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, от приблизительно остатка 244 до остатка 360 антитела в соответствии со стандартными схемами нумерации (остатки 244-360, система нумерации по Kabat, а также остатки 231-340, система нумерации ЕС, см. ссылку Kabat EA et al.). Домен CH2 является уникальным, поскольку он не спарен непосредственно с другим доменом. Точнее, две N-связанные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя доменами CH2 интактной нативной молекулы IgG. Также хорошо известно, что домен CH3 простирается от домена CH2 до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

В настоящей заявке термин "шарнирная область" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 и домен CH2. Указанная шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим участкам двигаться независимо друг от друга. Шарнирные области могут быть разделены на три различные области: верхнюю, среднюю и нижнюю шарнирные области; см. Roux et al., *J. Immunol.* 161 (1998), 4083-4090.

В настоящей заявке термин "дисульфидная связь" включает ковалентную связь, образованную ме-

жду двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиольной группой. В большинстве природных молекул IgG участки CH1 и CL связаны дисульфидной связью, и две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242, при использовании системы нумерации по Kabat (положение 226 или 229, система нумерации ЕС).

В настоящей заявке термины "связанный", "гибридизованный" или "гибрид" используются взаимозаменяемо. Перечисленные термины относятся к соединению друг с другом более двух элементов или компонентов с использованием любых способов, включая химическую конъюгацию или рекомбинантные способы. Термин "гибридизованный в рамке считывания" относится к соединению открытых рамок считывания (ОРС) двух или более полинуклеотидов с образованием непрерывной более длинной ОРС так, чтобы сохранить правильную трансляционную рамку считывания исходных ОРС. Следовательно, рекомбинантный гибридный белок представляет собой один белок, содержащий два или более сегмента, которые соответствуют полипептидам, кодируемым исходными ОРС (сегменты, которых обычно не соединены таким способом в природных условиях). Несмотря на то, что рамка считывания, следовательно, сделана непрерывной на всем протяжении гибридизованных сегментов, сегменты могут быть физически или пространственно разделены, например, линкерной последовательностью в этой же рамке считывания. Например, полинуклеотиды, кодирующие CDR, из вариабельной области иммуноглобулина могут быть гибридизованы в рамке считывания, но разделены с помощью полинуклеотида, кодирующего по меньшей мере один участок каркаса иммуноглобулина или дополнительные участки CDR, до тех пор, пока "гибридизованные" CDR совместно транслируются как часть непрерывного полипептида. В настоящей заявке термин "экспрессия" относится к способу, с помощью которого ген производит биохимические продукты, например РНК или полипептид. Процесс включает любое проявление функционального присутствия гена в клетке, включая, но не ограничиваясь ими, подавление гена, а также кратковременную экспрессию и стабильную экспрессию. Указанный процесс включает, но не ограничивается ими, транскрипцию гена в матричную РНК (мРНК), перенос РНК (тРНК), образование короткой шпильчатой РНК (кшРНК), малой интерферирующей РНК (миРНК) или любого другого продукта РНК, а также трансляцию мРНК в полипептид(ы). Если конечный желаемый продукт является биохимическим, то экспрессия включает создание указанного биохимического продукта и любых предшественников. Экспрессия гена приводит к получению "генного продукта". В настоящей заявке термин "генный продукт" может представлять собой нуклеиновую кислоту, например матричную РНК, полученную в результате транскрипции гена, или полипептид, который транслируется с транскрипта. Генные продукты, описанные в настоящем документе, дополнительно включают нуклеиновые кислоты с посттрансляционными модификациями РНК, например полиаденилированием, или полипептиды с посттрансляционными модификациями, например метилированием, гликозилированием, добавлением липидов, связывание с другими белковыми субъединицами, протеолитическое расщепление и т.п.

В настоящей заявке термин "образец" относится к любому биологическому материалу, полученному от субъекта или пациента. Согласно одному аспекту образец может содержать кровь, перитонеальную жидкость, ЦСЖ, слюну или мочу. Согласно другим аспектам образец может содержать цельную кровь, плазму крови, сыворотку крови, В-клетки, обогащенные из образцов крови, и культивированные клетки (например, В-клетки субъекта). Образец также может включать образец биопсии или ткани, включая нервную ткань. В других аспектах образец может включать целые клетки и/или лизат клеток. Образцы крови могут быть собраны с помощью способов, известных в данной области техники.

Заболевания.

Если не указано иное, термины "расстройство" и "заболевание" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и включают нежелательные физиологические изменения у субъекта, животного, в отдельном органе, ткани или клетке/культуре клеток.

Лобно-височная долевая дегенерация (FTLD) представляет собой патологическое состояние, связанное с атрофией в лобной доле и височной доле головного мозга. Помимо этого также было показано, что 50% пациентов с FTLD имеют случаи заболевания в семейном анамнезе по сравнению с латеральным амиотрофическим склерозом (ALS). Как уже было описано выше, общая основная причина патогенеза, по-видимому, представляет собой гетерозиготный удлинённый гексануклеотидный повтор, расположенный в C9ORF72 у пациентов с FTLD и ALS. В частности, было показано, что указанные повторы образуются в результате повторения блоков из двух аминокислот (дипептидные повторы, DPR).

Однако удлинённые гексануклеотидные повторы, образованные в результате повторения двух аминокислот (DPR), как сообщалось, также наблюдаются при нескольких других заболеваниях и/или расстройствах. Заболевания включают, но не ограничиваются ими, лобно-височную долевую дегенерацию (FTLD), латеральный амиотрофический склероз (ALS), FTLD-ALS и/или спиноцереbellарную атаксию тип 36 и симптомы, связанные с ними.

Поскольку антитела согласно настоящему изобретению, как было показано, способны связываться с DPR, в частности с C9ORF72-DPR, в срезах тканей пациентов с FTLD, см., например, пример 12 и фиг. 14, антитела, происходящие от человека, и их биотехнологические производные можно применять при лечении и диагностике FTLD, а также других заболеваний и/или расстройств, связанных с DPR, и их

симптомов. В частности, терапевтический потенциал антител согласно настоящему изобретению в модулировании прогрессирования заболевания в условиях *in vitro* и *in vivo* оценивали в моделях на основе клеток или в некоторых мышинных моделях, содержащих удлинённые гексануклеотидные повторы C9ORF72 соответственно; см., например, примеры 14 и 15.

Следовательно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению, связывающие молекулы, специфичность связывания которых по существу аналогична специфичности связывания любого из указанных антител, полинуклеотиды, векторы или клетки согласно настоящему изобретению применяют для получения лекарственного средства или диагностической композиции для профилактического и/или терапевтического лечения заболеваний, связанных с DPR, для мониторинга прогрессирования заболевания и/или ответа на лечение, а также для диагностики заболеваний, связанных с DPR-амилоидозом, включая лобно-височную долевую дегенерацию (FTLD), латеральный амиотрофический склероз (ALS), FTLD-ALS и/или спиноцереbellарную атаксию типа 36.

Как показано в примерах 12 и 13, а также на фиг. 14 и 15, антитела согласно настоящему изобретению связываются с патологическими агрегатами C9ORF72-белка с дипептидными повторами у пациентов с FTLD. Следовательно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитела, связывающие молекулы, специфичность связывания которых по существу аналогична специфичности связывания любого из указанных антител, полинуклеотиды, векторы или клетки согласно настоящему изобретению применяют для получения фармацевтической или диагностической композиции для профилактического и/или терапевтического лечения заболеваний, связанных с C9ORF72-DPR, для мониторинга прогрессирования заболевания и/или ответа на лечение, а также для диагностики заболеваний, связанных с агрегатами C9ORF72-DPR, включая лобно-височную долевую дегенерацию (FTLD), латеральный амиотрофический склероз (ALS) и/или FTLD-ALS, и симптомы, связанные в них.

Лечение.

В настоящей заявке термины "лечить" или "лечение" относятся к терапевтическому лечению и профилактическим или превентивным мерам, целью которых является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как развитие сердечной недостаточности. Предпочтительные или желательные клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, облегчение симптомов, снижение степени тяжести заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) патологического состояния, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение патологического состояния и ремиссию (частичную или полную), независимо от того, поддается она детектированию или нет. Термин "лечение" также может означать увеличение продолжительности выживания по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если пациент не получает лечения. Пациенты, нуждающиеся в лечении, включают тех, у кого состояние или заболевание уже развилось, а также тех, кто склонен к развитию состояния или заболевания, или тех, у кого проявление состояния или заболевания должно быть предотвращено.

Если не указано иное, термины "лекарственный препарат", "лекарство" или "лекарственное средство" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и включают, но не ограничиваются ими, (А) изделия, лекарственные средства и препараты для внутреннего или наружного применения и любое вещество или смесь веществ, предназначенную для использования для диагностики, устранения, смягчения, лечения или профилактики заболеваний человека или других животных; и (В) изделия, лекарственные средства и препараты (кроме еды), предназначенные для воздействия на структуру или любую функцию тела человека или других животных; и (С) изделия, предназначенные для использования в качестве компонента любого изделия, указанного в пунктах (А) и (В). Термины "лекарственный препарат", "лекарство" или "лекарственное средство" должны включать полную формулу препарата, предназначенного для использования у человека или других животных, содержащего один или более "агентов", "соединений", "веществ" или "(химических) композиций" и применительно к другим вариантам также другие фармацевтически неактивные вспомогательные вещества, такие как наполнители, разрыхлители, смазывающие вещества, вещества, способствующие скольжению, связующие вещества или вещества, обеспечивающие легкий транспорт, распад, дезагрегацию, растворение и биологическую доступность "лекарственного препарата", "лекарства" или "лекарственного средства" на месте предполагаемой мишени в организме человека или других животных, например на коже, в желудке или кишечнике. В настоящей заявке термины "агент", "соединение" или "вещество" используются взаимозаменяемо и включают, в более конкретном контексте, но не ограничиваются ими, фармакологически активные вещества, то есть агенты, которые индуцируют желаемый биологический или фармакологический эффект или которые являются исследованными или их способность индуцировать указанное возможное фармакологическое действие с помощью способов согласно настоящему изобретению исследована.

Под терминами "субъект", или "индивидуум", или "животное", или "пациент", или "млекопитающее" подразумевают любого субъекта, в частности млекопитающее, например пациента-человека, который нуждается в диагностике, прогнозе, профилактике или терапии.

Фармацевтические носители:

Фармацевтически приемлемые носители и способы введения могут быть взяты из соответствующей

литературы, известной специалисту в данной области техники. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники; см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000), опубли. University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472, Vaccine Protocols 2nd Edition by Robinson et al., Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2003; Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems. 2nd Edition by Taylor and Francis. (2006), ISBN: 0-8493-1630-8. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как масляные/водные эмульсии, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д. Композиции, содержащие указанные носители, могут быть приготовлены с помощью хорошо известных стандартных способов. Указанные фармацевтические композиции могут быть введены субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций можно осуществлять различными способами. Примеры включают введение композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель с помощью орального, интраназального, ректального, местного, внутривенного, внутримышечного, подкожного, субдермального, трансдермального, интратекального и внутричерепного пути введения. Аэрозольные составы, такие как аэрозольные назальные составы, содержат очищенные водные или другие растворы активного агента с консервирующими агентами и изотоническими агентами. Указанные составы предпочтительно доводят до значения показателя pH и изотоничности, которые совместимы со слизистыми оболочками носа. Фармацевтические композиции для перорального введения, такие как однодоменные антитела (например, "нанотелаTM") и т.д., также включены в объем настоящего изобретения. Указанные пероральные составы могут быть в форме таблетки, капсулы, порошка, жидкости или в полутвердой форме. Таблетка может содержать твердый носитель, такой как желатин или адъювант. Составы для ректального или вагинального введения могут быть обеспечены в виде суппозитория с подходящим носителем; см. также O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2(9) (2003), 727-735. Дополнительные указания, касающиеся составов, которые подходят для различных видов применения, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985) и соответствующих обновлениях. Для краткого обзора способов доставки лекарственных средств см. Langer, Science 249 (1990), 1527-1533.

II. Антитела согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение в целом относится к антителам, происходящим от человека, к DPR, предпочтительно антителам к C9ORF72-DPR и антигенсвязывающим фрагментам, а также биотехнологическим производным, которые предпочтительно проявляют иммунологические характеристики связывания и/или биологические свойства, сходные с теми, которые описаны для антител, описанных в примерах. В соответствии с настоящим изобретением моноклональные антитела человека, специфичные в отношении DPR, были клонированы из пула здоровых субъектов-людей. Однако согласно другому варианту реализации настоящего изобретения моноклональные антитела человека к DPR также могут быть клонированы от пациентов с симптомами заболевания и/или расстройства, связанного с агрегацией DPR.

В ходе экспериментов, проведенных в соответствии с настоящим изобретением, рекомбинантные антитела IgG, полученные из антител, присутствующих в кондиционированной среде культивированных В-клеток памяти человека, которые подвергали первоначальному скринингу для определения связывания с DPR, оценивали по их способности связываться с DPR и другими белками, включая бычий сывороточный альбумин (BSA); см. примеры 3-7, а также фиг. 2-6. Для последующего исследования, включая определение класса антител и подкласса легкой цепи, были отобраны только В-клеточные супернатанты, способные связываться с DPR-белком, но не с каким-либо из других белков, при скрининге. Отобранные В-клетки затем обрабатывали для клонирования антител; см. примеры 1 и 12, а также фиг. 14.

В общих чертах способ клонирования заключался в выделении матричных РНК из отобранных В-клеток, ретротранскрипции с помощью ОТ-ПЦР, амплификации кодирующих антитело областей с помощью ПНР, клонирования в плазмидные векторы и секвенирования. Выбранные антитела человека затем получали путем рекомбинантной экспрессии в клетках линии HEK293 или CHO и очищали, и затем описывали их способность связываться с DPR-белком человека. Сочетание различных способов исследования, например рекомбинантной экспрессии антител в клетках линии HEK293 или CHO с последующим описанием специфичности их связывания с DPR-белком человека, а также их отличительного связывания с патологическими мутированными и/или агрегированными формами указанных белков, подтвердили, что впервые были клонированы антитела человека, которые являются высокоспецифичными в отношении DPR и явным образом распознают и селективно связываются с патологически агрегированными формами DPR-белка, например C9ORF72-DPR. В некоторых случаях химерные антитела мыши также были получены на основе переменных областей антител человека согласно настоящему изобретению.

Следовательно, в настоящем изобретении предложены рекомбинантные происходящие от человека моноклональные антитела к DPR и DPR-связывающим фрагментам, их синтетические и биотехнологические производные и варианты. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело способно связываться с C9ORF72-DPR человека.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело связывается с DPR-белком или пептидом, в котором число повторов составляет приблизительно от 10 до 20, предпочтитель-

но 15, использованное в примерах для повтора GA, GP, GR, PR и PA C9ORF72; см., например, примеры 8 и 9, а также фиг. 7 и 8. Белок DPR может по существу состоять только из DPR или содержать DPR в пределах более крупного полипептида, например, на N-конце, C-конце или между ними, как повтор GA или GP в экзоне 1 в C9ORF72.

Помимо этого, как показано в примерах 12 и 13 и на фиг. 14 и 15, моноклональные происходящие от человека антитела к DPR, NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.5G2 и NI-308.4M1 согласно настоящему изобретению предпочтительно характеризуются специфичным связыванием с патологическими мутированными и/или агрегированными формами C9ORF72-DPR и по существу не распознают C9ORF72 в физиологической форме; см., например, фиг. 14 и 15. Следовательно, в настоящем изобретении предложен набор антител человека к DPR, которые обладают связывающими свойствами, особенно подходящими для диагностических и терапевтических целей. Следовательно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены антитела, которые способны специфично связываться с патологически агрегированными формами DPR-белков, например C9ORF72-DPR.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению проявляет связывающие свойства любого из типичных антител, NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 и NI-308.16C10, как описано в примерах. Антитело к DPR согласно настоящему изобретению преимущественно распознает патологически измененную молекулу C9ORF72, такую как молекулы C9ORF72-DPR и их фрагменты, но не физиологическую форму C9ORF72. Следовательно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению по существу не распознает физиологические молекулы C9ORF72.

Термин "по существу не распознает" при использовании в настоящей заявке для описания аффинности связывания молекулы из группы, содержащей антитело, его фрагмент или связывающую молекулу для конкретной молекулы-мишени, антигена и/или конформации молекулы-мишени и/или антигена, означает, что молекула вышеуказанной группы связывается с указанной молекулой, антигеном и/или конформацией с величиной аффинности связывания, которая по меньшей мере в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз или 9 раз меньше, чем аффинность связывания молекулы вышеуказанной группы в отношении связывания другой молекулы, антигена и/или конформации. Очень часто константа диссоциации (KD) используется в качестве меры аффинности связывания. Иногда используют величину $ЭК_{50}$ в специфичном количественном исследовании, например ИФА, которая используется в качестве меры аффинности связывания. Предпочтительно термин "по существу не распознает" при использовании в настоящем изобретении означает, что молекула вышеуказанной группы связывается с указанной молекулой, антигеном и/или конформацией с величиной аффинности связывания, которая по меньшей мере в 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз, 1000 раз или 10000 раз меньше, чем величина аффинности связывания указанной молекулы из вышеуказанной группы при связывании с другой молекулой, антигеном и/или конформацией.

Как описано выше, наиболее распространенной генетической причиной агрегации C9ORF72 при FTLN и ALS, как было показано, является гетерозиготный удлиненный гексануклеотидный повтор (GGGGCC), расположенный между некодирующими экзонами 1a и 1b гена C9ORF72. В частности, было показано, что указанная нестандартная ATG-независимая трансляция смыслового транскрипта в трех чередующихся рамках считывания, т.е. удлиненных гексануклеотидных повторов, приводила к синтезу, выработке и агрегации различных полипептидов, каждый из которых содержит блоки из двух аминокислот (дипептидные повторы, DPR), т.е. поли-(Gly-Ala; GA), поли-(Gly-Pro; GP) и/или поли-(Gly-Arg; GR). Следовательно, в одном варианте реализации настоящего изобретения DPR содержит повторы полиглицин-аланин (Gly-Ala; GA), полиглицин-пролин (Gly-Pro; GP) или полиглицин-аргинин (Gly-Arg; GR). В предпочтительном варианте DPR состоит из повторов полиглицин-аланин (Gly-Ala; GA) или полиглицин-пролин (Gly-Pro; GP).

Несмотря на то, что удлиненный гексануклеотидный повтор расположен между некодирующими экзонами 1a и 1b C9ORF72 и то, что мутированный C9ORF72 не имеет страт-кодона, все рамки считывания транслируются с образованием белков, содержащих дипептидные повторы (DPR), т.е. поли-(Gly-Ala; GA), поли-(Gly-Pro; GP) и/или поли-(Gly-Arg; GR). Результаты предварительных исследований также свидетельствуют о том, что в экспериментах, выполненных в соответствии с настоящим изобретением, были идентифицированы и клонированы антитела, которые не только окрашивают нейрональные цитоплазматические включения, нейрональные внутриядерные включения и дистрофические нейриты в слое гранулярных клеток мозжечка, связанные с C9ORF72-DPR GA, GP или GP-типа, т.е. транслированными в смысловом направлении (смысловые DPR), как показано в примерах 12 и 13, а также на фиг. 14 и 15, но также антитела, которые способны распознавать DPR, транслированные в двух направлениях, т.е. белки, содержащие дипептидные повторы, которые транслированы в антисмысловом направлении, то есть поли-(Pro-Arg; PR) и/или поли-(Pro-Ala; PA). Следовательно, в настоящем изобретении предложены антитела, которые способны выявлять и связываться с агрегатами белковых продуктов C9ORF72, полученных из обеих цепей, т.е. с DPR полученными в результате трансляции удлиненного гексануклеотидного повтора некодирующей области между экзонами 1a и 1b C9ORF72, транслированного в смысловом и

антисмысловом направлении. Следовательно, в одном варианте реализации антитела к DPR, DPR-связывающие молекулы или их фрагменты, синтетические или биотехнологические варианты распознают DPR, транслированные с гена C9ORF72 в смысловом и/или антисмысловом направлении. В предпочтительном варианте антитела к DPR распознают DPR поли-(Gly-Ala; GA), поли-(Gly-Pro; GP), поли-(Gly-Arg; GR), поли-(Pro-Arg; PR) и/или поли-(Pro-Ala; PA) типа.

Помимо этого в предварительных экспериментах были выявлены антитела к DPR, которые могут связываться с различными группами DPR, т.е. с различными композициями аминокислот DPR-белков. В частности, были обнаружены антитела к DPR, распознающие DPR-белки, состоящие из обоих $(PA)_n$ и $(GA)_n$, $(GP)_n$ и $(GA)_n$, $(PR)_n$ и $(GA)_n$, или $(GR)_n$ и $(GA)_n$ и $(PR)_n$. Соответственно согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к DPR может распознавать DPR-белки, состоящие из комбинации DPR-белков с различным аминокислотным составом. Следовательно, как показано в примерах и на фиг. 2А-М и 7А-Р, получены происходящие от человека антитела, которые распознают два или даже три различных дипептидных повтора со специфичностью, величина которой имеет сходный порядок. В предпочтительном варианте антитела к DPR могут распознавать DPR-белки, состоящие из комбинации DPR-белков, причем указанные DPR-белки представляют собой $(PA)_n$ или $(GA)_n$, $(GP)_n$ или $(GA)_n$, $(PR)_n$ или $(GA)_n$, или $(GR)_n$, или $(GA)_n$ или $(PR)_n$, то есть антитело к DPR согласно настоящему изобретению может распознавать любую комбинацию DPR, предпочтительно $(GP)_n$ и $(GA)_n$, как показано для антитела NI-308.5G2 (см. 2А и G и фиг. 7А, В, J и K), или $(GR)_n$, $(GA)_n$ и $(PR)_n$, как показано для антитела NI-308.6B11 (см. 2А и I и фиг. 7А, С, L и М), или $(PA)_n$ и $(GA)_n$, как показано для антитела NI-308.4M1 (см. 2А и K и фиг. 7Е и Р), или $(PR)_n$ и $(GA)_n$, как показано для антитела NI-308.16C10 (фиг. 2А и М).

Альтернативно или дополнительно антитело согласно настоящему изобретению может быть модифицировано для включения по меньшей мере первого и второго антигенсвязывающих сайтов, т.е. вариативной области из двух различных антител согласно настоящему изобретению с различными эпитопами, причем предпочтительно одна или обе вариативные области получены из любого одного из рассматриваемых антител, описанных в прилагаемых примерах и фигурах и дополнительно описанных в настоящем документе. Например, комбинация вариативной области антитела NI-308.6B11 и NI-308.4M1 позволит получить антитело, способное связываться с комбинацией DPR, состоящей из $(GA)_n$, $(GR)_n$, $(PR)_n$ и $(PA)_n$. Следовательно, рассматриваемые антитела обеспечивают антитела, способные распознавать любую комбинацию DPR. Би- и мультиспецифичные антитела могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники, например путем химической рекомбинации фрагментов моноклональных иммуноглобулинов G1, как описано, например, в работе Brennan et al., Science. 229 (1985), 81-83, или рекомбинантной одновременной совместной экспрессии соответствующей тяжелой и легкой цепей и соответствующего спаривания; см., например, Lewis et al., Nature Biotechnology 32 (2014), 191-198; для обзора см., например, Kontermann, mAbs 4 (2012), 182-197 и Kontermann and Brinkmann, Drug Discovery Today 20 (2015), 838-847.

В нескольких исследованиях было показано, что агрегация DPR происходит главным образом у тех пациентов, которые имеют большее количество дипептидных повторов. Следовательно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения DPR-связывающие молекулы связываются с DPR-белками, содержащими большее количество повторов, т.е. DPR, состоящими из $(GA)_n$, $(GP)_n$, $(GR)_n$, $(PR)_n$ или $(PA)_n$. В настоящем документе n обозначает число повторов, например DPR-белок с 15 повторами будет обозначен $(XX)_{15}$, это также означает, что, например, удлиненный гексануклеотид G_4C_2 повторяется 15 раз. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения количество повторов составляет от 10 до 30 $(XX')_{10-30}$. В конкретном предпочтительном варианте реализации количество повторов составляет $(XX')_{15}$.

Однако, не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы настоящего изобретения полагают, что меньший размер повтора, т.е. <15 повторов, предпочтительно <10 повторов, более предпочтительно <5 повторов, может имитировать более крупные пептиды при плотном покрытии на поверхности. Следовательно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитела к DPR связываются с DPR, состоящими из $(GA)_n$, $(GP)_n$, $(GR)_n$, $(PR)_n$ или $(PA)_n$, в которых число повторов (n) составляет менее 15 повторов. В предпочтительном варианте антитела к DPR связываются с DPR, состоящими из $(GA)_n$, $(GP)_n$, $(GR)_n$, $(PR)_n$ или $(PA)_n$, в которых количество повторов (n) составляет менее 10 повторов. В особенно предпочтительном варианте антитела к DPR связываются с DPR, состоящими из $(GA)_n$, $(GP)_n$, $(GR)_n$, $(PR)_n$ или $(PA)_n$, в которых количество повторов (n) составляет менее 5 повторов. Результаты предварительных экспериментов свидетельствуют о том, что антитела к DPR согласно настоящему изобретению также могут связываться с DPR-белками, содержащими только от 3 до 4 повторов; см., например, фиг. 7. Соответственно согласно одному варианту реализации настоящего изобретения от 3 до 4 повторов являются достаточными для связывания антитела к DPR. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению по существу не связывается или связывается лишь в значительной меньшей степени с эпитопом, содержащим менее 3 любых из описанных выше дипептидных повторов ($n < 3$); см., например, примеры 8 и 9, а также фиг. 7 и 8.

Как показано в примерах, в частности в примерах 3 и 4, были разработаны различные конструкции

DPR с большим количеством дипептидных повторов. В частности, были созданы конструкции DPR с 15 повторами, т.е. (GA)₁₅, (GP)₁₅, (GR)₁₅, (PA)₁₅ и (PR)₁₅. Используя указанные конструкции, были выполнены исследования свойств антител, идентифицированных в соответствии с настоящим изобретением; см., например, примеры 3 и 4. Полученные результаты выявили, что антитела NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.28G1 и NI-308.45C2 специфично связываются с высокой аффинностью с C9ORF72-DPR (GA)₁₅, но не с DPR, состоящими из (GA)₁₅, (GR)₁₅, (PA)₁₅ или (PR)₁₅; см., например, фиг. 2А, В, С, D и Е, а также фиг. 3А, В, С, D и Е. Напротив, антитела NI-308.5G2, NI-308.12A3 и NI-308.46E9 специфично распознают с высокой аффинностью C9ORF72-DPR (GA)₁₅ и (GP)₁₅, но не DPR, состоящие из (GR)₁₅, (PA)₁₅ или (PR)₁₅; см., например, фиг. 2А, G, H и L, а также фиг. 3А, G, H и L. Антитело NI-308.24E11 распознает только C9ORF72-DPR (PR)₁₅, но не DPR, состоящие из (GP)₁₅, (GR)₁₅, (GA)₁₅ или (PA)₁₅; см., например, фиг. 2А и F, а также фиг. 3А и F. Напротив, антитело NI-308.16C10 преимущественно распознавало C9ORF72-DPR (PR)₁₅, а также связывалось с (GA)₁₅, но не DPR, состоящими из (GP)₁₅, (GR)₁₅ или (PR)₁₅; см. фиг. 2А и M, а также фиг. 3А и M. Неожиданным фактом оказалось то, что антитела NI-308.6B11 и NI-308.46F8 проявили высокую аффинность в отношении (GR)₁₅, (GA)₁₅ и (PR)₁₅, но не DPR, состоящих из (GP)₁₅ или (PA)₁₅; см., например, фиг. 2А, I, J, а также фиг. 3А, I и J. Антитело NI-308.4M1 распознает C9ORF72-DPR (PA)₁₅ и (GA)₁₅, но не DPR, состоящие из (GP)₁₅, (GR)₁₅ или (PR)₁₅; см., например, фиг. 2А и K, а также фиг. 3А и K. Следовательно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно распознают DPR-белок, состоящий из (GA)₁₅. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению распознает DPR-белок, состоящий из (GA)₁₅, но по существу не распознает DPR-белок, состоящий из (GP)₁₅, или (GR)₁₅, или (PA)₁₅, или (PR)₁₅. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно распознает DPR-белок, состоящий из (GP)₁₅ или (GA)₁₅, предпочтительно антитело, которое распознает DPR-белок, состоящий из (GP)₁₅ или (GA)₁₅, по существу не распознает DPR-белки, состоящие из (GR)₁₅, или (PR)₁₅, или (PA)₁₅. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению, распознающее DPR-белок, состоящий из (PR)₁₅, по существу не распознает DPR-белок, состоящий из (GA)₁₅, (GP)₁₅, или (GR)₁₅, или (PA)₁₅. Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению, распознающее DPR-белок, состоящий из (GA)₁₅, (GR)₁₅ или (PR)₁₅, по существу не распознает DPR-белок, состоящий из (GP)₁₅ или (PA)₁₅. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно распознает DPR-белок, состоящий из (PA)₁₅ или (GA)₁₅, предпочтительно антитело, распознающее DPR-белок, состоящий из (PA)₁₅ или (GA)₁₅, по существу не распознает DPR-белок, состоящий из (GP)₁₅, или (GR)₁₅ или (PR)₁₅. В другом дополнительном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно распознает DPR-белок, состоящий из (GA)₁₅ или (PR)₁₅, предпочтительно антитело, распознающее DPR-белок, состоящий из (PR)₁₅ или (GA)₁₅, по существу не распознает DPR-белок, состоящий из (GP)₁₅, или (GR)₁₅, или (PA)₁₅. Другими словами, антитела в указанных вариантах реализации могут связываться с одним или по меньшей мере с двумя различными DPR-белками, см., например, типичные антитела NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 и NI-308.16C10, описанные в примерах 3 и 4, а также показанные на фиг. 2 и 3.

Используя конструкции, описанные в примерах, может быть показано, что антитело к DPR согласно настоящему изобретению связывается с C9ORF72-DPR (GA)₁₅, или (GP)₁₅, или (GR)₁₅, или (PR)₁₅, или (PA)₁₅ человека. В этой связи величины аффинности связывания любого из антител к DPR согласно настоящему изобретению или его биотехнологического производного могут находиться в диапазоне, представленном для типичных антител NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 и NI-308.16C10 на фиг. 2, т.е. имеющих величины полумаксимальной эффективной концентрации (ЭК₅₀), составляющие приблизительно от 0,1 до 200 нМ, предпочтительно от 1 пМ до 100 нМ, более предпочтительно величины ЭК₅₀ приблизительно от 50 пМ до 50 нМ, наиболее предпочтительно величины ЭК₅₀ приблизительно от 0,1 до 0,5 нМ для конструкций ECA-(GA)₁₅, ECA-(GP)₁₅ или BCA-(PA)₁₅ и наиболее предпочтительно величины ЭК₅₀ приблизительно от 10 до 200 нМ для конструкций ECA-(PR)₁₅; см., например, фиг. 3А-М.

Предпочтительно антитело к DPR, DPR-связывающий фрагмент или его биотехнологическое производное обладают аффинностью связывания, соответствующей величине ЭК₅₀ (полумаксимальной эффективной концентрации) >200 нМ, предпочтительно ≤100 нМ, более предпочтительно ≤50 нМ, еще более предпочтительно ≤10 нМ и наиболее предпочтительно ≤0,5 нМ для связывания DPR-белка (GA)₁₅, (GR)₁₅, или (PR)₁₅, или ≤10 нМ, предпочтительно ≤2 нМ, еще более предпочтительно ≤1 нМ и наиболее предпочтительно ≤0,5 нМ для связывания DPR-белка (GP)₁₅ или (PA)₁₅; см., например, фиг. 2 А-М.

Некоторые антитела способны связываться с широким спектром биомолекул, например, с белками. Специалист в данной области техники поймет, что термин "специфичный" используется в настоящем документе, чтобы показать, что другие биомолекулы, отличные от DPR, существенно не связываются с антигенсвязывающей молекулой, например одним из антител согласно настоящему изобретению. Пред-

почтительно уровень связывания с биомолекулой, отличной от DPR, приводит к величине аффинности связывания, которая составляет не более чем только 20% или менее, 10% или менее, только 5% или менее, только 2% или менее или только 1% или менее (т.е. ниже по меньшей мере в 5, 10, 20, 50 или 100 раз или на любую еще более низкую величину) от величины аффинности в отношении DPR соответственно; см., например, примеры 3-5, а также фиг. 2-4.

Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения антитело к DPR согласно настоящему изобретению связывается преимущественно с агрегированными формами DPR, например C9ORF72-DPR и/или его фрагментами, производными, фибриллами и/или олигомерами. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело к DPR согласно настоящему изобретению преимущественно связывается с C9ORF72-DPR, не связанным с заболеванием и/или расстройством, и с патологически агрегированными формами C9ORF72-DPR; см., например, пример 10, а также фиг. 9-12. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело к DPR согласно настоящему изобретению способно связываться с формами DPR, например C9ORF72-DPR и/или его фрагментами, производными, фибриллами и/или олигомерами в растворе; см. пример 7, а также фиг. 6. В этой связи любое из антител к DPR согласно настоящему изобретению или их биотехнологических производных может быть способно захватывать пептиды поли-Ga DPR-белков в растворе, как показано для типичных антител NI-308.15O7, NI-308.18F7, NI-308.45C2 и NI-308.28G1, или любое из антител к DPR согласно настоящему изобретению или их биотехнологических производных может быть способно осаждать поли-PR и поли-GR, как показано для типичных антител NI-308.24E11 и NI-308.6B11; см., например, фиг. 6 от (A) до (C).

На фиг. 14 и 15, а также в примерах 12 и 13, было показано, что антитела согласно настоящему изобретению способны окрашивать патологические нейрональные цитоплазматические включения, нейрональные внутриядерные включения и дистрофические нейриты в слое гранулярных клеток мозжечка у пациентов с FTLT, которая связана с агрегатами DPR, в частности C9ORF72-DPR-белков. Следовательно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению способно связываться с агрегированным C9ORF72 в тканях человека. В особенно предпочтительном варианте антитело способно связываться с агрегированным C9ORF72 в ткани человека с FTLT. Как уже упоминалось, агрегированный C9ORF72 означает мутированный C9ORF72, который содержит, как описано выше, удлиненный гексануклеотидный повтор в его некодирующей области. Указанный повтор приводит к потере старт-кодона ATG и трансляции повторов в DPR, как описано выше.

Как упоминалось ранее, накопление белковых агрегатов DPR в лобной и височной долях головного мозга является отличительной чертой нейродегенеративного расстройства FTLT. Пациенты с агрегатами DPR в нейрональных цитоплазматических включениях, нейрональных внутриядерных включениях и дистрофических нейритах в слое гранулярных клеток мозжечка, как показано на фиг. 14 и 15, а также примерах 12 и 13 согласно настоящему изобретению, часто имеют измененные когнитивные функции. В частности, у пациентов с FTLT наблюдают деменцию, изменения поведения и расстройства личности, дисфункцию речи и/или психоз, которые вызваны дегенерацией коры лобной и височной долей головного мозга, как описано выше. Следовательно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению можно применять для лечения заболеваний и/или расстройств, связанных с DPR. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению можно применять в лечении FTLT и ее симптомов.

В настоящем изобретении также предложено антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, биотехнологические варианты и производные, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающий домен, идентичный таковому антитела, выбранного из группы, состоящей из NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 и NI-308.16C10, или способный конкурировать с любым или всеми антителами за связывание с DPR, например (GA)₁₅, или (GP)₁₅, или (GR)₁₅, или (PR)₁₅, или (PA)₁₅.

В настоящем изобретении дополнительно описано несколько связывающих молекул, например антитела и их связывающие фрагменты, распознающие DPR, которые характеризуются тем, что содержат в своей вариательной области, например, связывающий домен по меньшей мере одного определяющего комплементарность (CDR) вариательной области V_H и/или V_L, содержащий любую из аминокислотных последовательностей, представленных на любой из фиг. 1A-L.

Соответствующие нуклеотидные последовательности, кодирующие указанные выше вариательные области, приведены в табл. II ниже. Типичные наборы CDR указанных выше аминокислотных последовательностей областей V_H и/или V_L представлены на любой из фиг. 1A-L. Тем не менее, как описано ниже, специалист в данной области техники хорошо осведомлен о том, что в дополнение или в качестве альтернативы можно применять CDR, которые отличаются по их аминокислотной последовательности от тех, которые указаны на любой из фиг. 1A-L, на один, два, три или даже более остатков аминокислот в случае CDR2 и CDR3. Следовательно, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложено антитело согласно настоящему изобретению, его биотехнологическое производное или DPR-связывающий фрагмент, содержащий в вариательной области по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR), представленный на любой из фиг. 1A-L, и/или один или более

CDR, содержащих одну или более замен аминокислот.

Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению представляет собой любое из антител, содержащих аминокислотную последовательность области V_H и/или V_L , представленную на любой из фиг. 1A-L, или его область V_H и/или V_L , содержащую одну или более замен аминокислот. Предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению характеризуется сохранением когнатного спаривания тяжелой и легкой цепей, которое имело место в В-клетке человека.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело к DPR, его DPR-связывающий фрагмент, синтетический или биотехнологический вариант может быть оптимизирован так, чтобы иметь соответствующую аффинность связывания с мишенью, а также фармакокинетические свойства и стабильность. Следовательно, по меньшей мере одна аминокислота в CDR или вариабельной области, которая склонна к модификациям, выбранным из группы, состоящей из гликозилирования, окисления, дезаминирования, расщепления пептидной связи, образования изоаспартата и/или непарного цистеина, замещена мутированной аминокислотой, которая не подвергается таким изменениям, или где по меньшей мере один углеводный фрагмент удален или добавлен химически или ферментативно к антителу, см., например, Liu et al., *J. Pharm. Sci.* 97(7) (2008), 2426-2447; Beck et al., *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010), 345-352; Habberger et al., *MAbs.* 6 (2014), 327-339.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, биотехнологическое производное или вариант, который конкурирует за связывание с DPR по меньшей мере с одним из антител, содержащих область V_H и/или V_L , представленную на любой из фиг. 1A-L.

Экспериментальные результаты, представленные на фиг. 4 и в примере 5, показывают, что некоторые из антител к DPR согласно настоящему изобретению преимущественно связываются с патологическими агрегированными формами DPR, такими как C9ORF72-DPR по сравнению с другими амилоидогенными белками. Соответственно согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно распознает C9ORF72-DPR, по сравнению с амилоидогенными белками.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к DPR, его DPR-связывающий фрагмент, синтетическое или биотехнологическое производное преимущественно распознает мутированные и/или агрегированные формы C9ORF72-DPR по сравнению с физиологическими формами C9ORF72.

Антитело согласно настоящему изобретению может быть получено (происходить от) от человека, в частности, для терапевтического применения. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело грызуна, антитело, содержащее фрагменты антител грызунов, или химерное антитело грызуна-человека, предпочтительно мышинное антитело, антитело, содержащее фрагменты антител мыши, или химерное антитело мыши-человека или антитело крысы, антитело, содержащее фрагменты антител крысы, или химерное антитело крысы-человека, которое является особенно подходящим для диагностических методов и исследований на животных. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению представляет собой химерное антитело грызуна-человека или антитело, содержащее фрагменты антител грызунов.

Помимо этого согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения химерное антитело согласно настоящему изобретению, т.е. содержащее вариабельные домены антитела человека и родо-вые константные области легких и тяжелых цепей мыши, связывается с высокой аффинностью с DPR человека. Предпочтительно аффинность связывания химерных антител аналогична таковой для аналогов человеческого происхождения.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению получают из культур отдельных или олигоклональных В-клеток, которые культивируют, и супернатант культуры, которая содержит антитела, вырабатываемые указанными В-клетками, подвергают скринингу для определения присутствия и аффинности антител к DPR в нем. Процесс отбора включает скрининг для оценки связывания с нативными мономерными, фибриллярными или нефибриллярными агрегатами, сходными с олигомерами hDPR, полученными из синтетического полноразмерного hDPR пептида или, например, очищенными из плазмы крови человека или путем рекомбинантной экспрессии. Соответствующие hDPR пептиды можно применять в чистом виде или согласно другому варианту реализации присоединенными или конъюгированными с подходящим носителем, таким как БСА.

Согласно предпочтительному варианту реализации в настоящем изобретении также предложены антитела к DPR и DPR-связывающие молекулы, которые конкурируют с моноклональными антителами человека согласно настоящему изобретению за специфичное связывание с мутированными и/или агрегированными молекулами C9ORF72-DPR или их фрагментами.

Конкуренцию между антителами определяют с помощью количественного исследования, в котором испытываемый иммуноглобулин ингибирует специфичное связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как DPR. Известны многочисленные способы количественных исследований конкурент-

ного связывания, например твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), количественное исследование конкурентного связывания в формате "сэндвич"; см. Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; твердофазный прямой ИФА с использованием системы биотин-авидин; см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137 (1986), 3614-3619 и Cheung et al., *Virology* 176 (1990), 546-552; твердофазный прямой количественный анализ с использованием метки, твердофазный прямой количественный анализ в формате "сэндвич" с использованием метки; см. Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); твердофазный прямой РИА с использованием I^{125} -метки; см. Morel et al., *Molec. Immunol.* 25 (1988), 7-15 и Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32 (1990), 77-82. Как правило, указанный способ количественного исследования включает использование очищенных DPR или мутированных и/или агрегированных C9ORF72-DPR, таких как их олигомеры и/или фибриллы, связанные с твердой поверхностью или клетками, несущими любой из них, немеченый исследуемый иммуноглобулин и меченый эталонный иммуноглобулин, т.е. происходящее от человека моноклональное антитело согласно настоящему изобретению. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии исследуемого иммуноглобулина. Обычно исследуемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Предпочтительно количественное исследование конкурентного связывания проводят в условиях, описанных для ИФА в прилагаемых примерах. Антитела, выявленные с помощью количественного исследования конкурентного связывания (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся с прилегающим эпитопом, расположенным достаточно проксимально относительно эпитопа, связанного с эталонным антителом, чтобы могли иметь место стерические затруднения. Обычно если конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать специфичное связывание эталонного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50 или 75%. Следовательно, в настоящем изобретении дополнительно предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производные, причем указанное антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела, выбранного из группы, состоящей из NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 и NI-308.16C10, cDPR.

В настоящем изобретении дополнительно предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производные, причем указанное антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела, выбранного из группы, состоящей из NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 и NI-308.16C10, с мутированными и/или агрегированными молекулами C9ORF72-DPR или их фрагментами.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), причем по меньшей мере один из V_H -CDR варибельной области тяжелой цепи, или по меньшей мере два V_H -CDR варибельной области тяжелой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны эталонным аминокислотным последовательностям V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3 тяжелой цепи из антител, описанных в настоящем документе. Согласно другому варианту реализации области V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны эталонным аминокислотным последовательностям V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 тяжелой цепи из антител, описанных в настоящем документе. Следовательно, согласно данному варианту реализации варибельная область тяжелой цепи согласно настоящему изобретению содержит полипептидные последовательности V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, связанные с группами, показанными на любой из фиг. 1A-L соответственно. В то время как на фиг. 1A-L представлены V_H -CDR, определенные в соответствии с системой нумерации по Kabat, другие определения CDR, например, V_H -CDR, определенные в соответствии с системой нумерации по Chothia, также включены в объем настоящего изобретения и могут быть легко определены специалистом в данной области техники, используя данные, представленные на любой из фиг. 1A-L.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из варибельной области тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, в которой области V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 имеют полипептидные последовательности, которые идентичны таковым для групп V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, представленных на любой из фиг. 1A-L соответственно.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из варибельной области тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, в которой области V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 имеют полипептидные последовательности, которые идентичны таковым для групп V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, представленных на любой из фиг. 1A-L соответственно, за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти или шести замен аминокислот в любом из V_H -CDR. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения замены аминокислот являются консервативными.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из варибельной области легкой цепи имму-

ноглобулина (V_L), при этом по меньшей мере один из CDR V_L варибельной области легкой цепи или по меньшей мере два из CDR V_L варибельной области легкой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны эталонным аминокислотным последовательностям V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3 легкой цепи антител, описанных в настоящем документе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения участки V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 из V_L по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны эталонным аминокислотным последовательностям V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 легкой цепи антител, описанных в настоящем документе. Следовательно, согласно данному варианту реализации варибельная область легкой цепи согласно настоящему изобретению содержит полипептидные последовательности V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, связанные с полипептидами, представленными на любой из фиг. 1(A)-1(J) соответственно. Несмотря на то, что на любой из фиг. 1(A)-1(L) представлены V_L -CDR, определенные с помощью системы Kabat, другие определения CDR, например V_L -CDR, определенные с помощью системы Chothia, также включены в объем настоящего изобретения.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из варибельной области легкой цепи иммуноглобулина (V_L), в которой участки V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 содержат полипептидные последовательности, которые идентичны группам V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, представленным на любой из фиг. 1(A)-1(L) соответственно.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из варибельной области легкой цепи иммуноглобулина (V_L), в которой участки V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 содержат полипептидные последовательности, которые идентичны группам V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, представленным на любой из фиг. 1(A)-1(L) соответственно, за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти или шести замен аминокислот в любом из V_L -CDR. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения замены аминокислот являются консервативными.

Иммуноглобулин или кодирующая его кДНК могут быть дополнительно модифицированы. Следовательно, в дополнительном варианте реализации способ согласно настоящему изобретению включает любой из этапов получения химерного антитела, антитела, содержащего фрагменты антител мыши, одноцепочечного антитела, фрагмента Fab, биспецифичного антитела, гибридного антитела, меченого антитела или аналога любого из них. Соответствующие способы известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). В том случае, если производные указанных антител получены с помощью методики фагового дисплея, то метод поверхностного плазмонного резонанса, применяемый в системе BIAcore, может быть использован для повышения эффективности фаговых антител, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из антител, описанных в настоящем документе (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). Получение химерных антител описано, например, в международной заявке WO 89/09622. Способы получения гуманизированных антител описаны, например, в заявке на европейский патент EP-A10239400 и международной заявке WO 90/07861. Дополнительные источники антител, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, включают так называемые ксеногенные антитела. Общий принцип получения ксеногенных антител, таких как человекоподобные антитела, у мышей, описан, например, в международных заявках WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 и WO 96/33735. Как обсуждалось выше, антитело согласно настоящему изобретению может существовать в различных формах, помимо полноразмерных антител; включая, например, Fv, Fab и $F(ab)_2$, а также в виде одиночных антител; см., например, международную заявку WO 88/09344. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, следовательно, предложено антитело согласно настоящему изобретению, выбранное из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv), фрагмента $F(ab')$, фрагмента $F(ab)$ и фрагмента $F(ab')_2$.

Антитела согласно настоящему изобретению или соответствующая им цепь(цепи) иммуноглобулина могут быть дополнительно модифицированы с помощью обычных методик, известных в данной области техники, например, с использованием делеции, вставки, замены, добавления и/или рекомбинации(й) и/или любой другой модификации(й) аминокислот(ы), известной в данной области техники, по отдельности или в комбинации. Способы введения указанных изменений в последовательность ДНК, лежащую в основе аминокислотной последовательности цепи иммуноглобулина, хорошо известны специалисту в данной области техники; см., например, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. и Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Модификации антитела согласно настоящему изобретению включают химические и/или ферментативные производные одной или более составляющих аминокислот, включая модификации латеральной цепи, модификации остова, N- и C-концевые модификации, включая ацетилирование, гидроксилирование, метилирование, амидирование и присоединение углеводных или липидных остатков, кофакторов и т.п. Помимо этого в область настоящего изобретения включены способы получения химерных белков, которые содержат описанные антитела или некоторые их фрагменты на аминоконце, гибридным с гетерологичной молекулой, такой как иммуностимулирующий лиганд на карбоксиконце; см., например, международную заявку WO 00/30680, в которой опи-

саны соответствующие технические детали.

Антитела согласно настоящему изобретению также могут содержать дополнительные модификации, которые оптимизируют их терапевтический потенциал. Указанные модификации включают, но не ограничиваются ими, модификации в аминокислотной последовательности антитела (например, в переменных областях) и посттрансляционные модификации. Посттрансляционные модификации (ПТМ) представляют собой химические модификации, которые играют ключевую роль в функциональной протеомике, поскольку они регулируют активность, локализацию и взаимодействие с другими клеточными молекулами, такими как белки, нуклеиновые кислоты, липиды и кофакторы. Следовательно, оптимизация антител может обеспечить ряд преимуществ, таких как улучшенная стабильность при хранении, а также профиль фармакокинетики и/или фармакодинамики, например, период полувыведения антитела в условиях *in vivo* или в условиях *in vitro*, повышенная растворимость, стабильность, повышенная аффинность в отношении мишени, сниженная скорость обратной реакции, улучшенная эффекторная функция константной области (области Fc) и улучшенный профиль безопасности антитела, например сниженная иммуногенность или сниженная чувствительность к посттрансляционным модификациям, как показано, например, в Igawa et al., MAbs 3 (2011), 243-52. Соответственно согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к DPR, его DPR-связывающий фрагмент, синтетический или биотехнологический вариант может быть оптимизирован, причем по меньшей мере одна аминокислота в CDR или переменной области, которая подвержена модификациям, включая, но не ограничиваясь ими, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, дезамидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфотидилинозитола, сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, изомеризацию, деметилирование, образование ковалентных сшивок, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидроксилирование, гидролиз, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование, протеолитическое расщепление, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное переносом РНК присоединение аминокислот к белкам, такое как аргинилирование и убиквитинирование (см., например, Creighton, "Proteins: Structures and Molecular Properties," 2nd eds., Freeman and Co., N.Y., 1992; "Posttranslational Covalent Modification of Proteins," Johnson, eds., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., Meth. Enzymol. 182 (1990), 626-646; Rattan et al., Ann. NY. Acad. Sci. 663 (1992) 48-62), замещена мутированной аминокислотой, которая не способна к указанным модификациям, или в котором по меньшей мере один углеводный фрагмент удален или добавлен к указанному антителу химическим или ферментативным способом. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения модификации выбраны из группы, состоящей из гликозилирования, окисления, дезаминирования, расщепления пептидной связи, образования изоаспартата и/или неспаренного цистеина. Дополнительные модификации, которые оптимизируют пригодность антитела к DPR или эквивалентных связывающих молекул в качестве терапевтического агента, хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в работе Igawa et al., MAbs 3 (2011), 243-52, содержание которой включено в настоящую заявку. Способы добавления или удаления углеводных фрагментов включают химические или ферментативные способы и подробно описаны, например, в работах Berg et al. "Biochemistry" 5th eds W H Freeman, New York 2002; WO 87/05330; Aplin et al., CRC Crit. Rev. Biochem., 22 (1981), 259-306; Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987), 10-52; Edge et al., Anal. Biochem. 118 (1981), 131; Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138. (1987), 350.

Помимо этого в область настоящего изобретения включены пептиды, включая те, которые содержат связывающую молекулу, описанную выше, например содержащую участок CDR3 переменной области любого из вышеуказанных антител, в частности CDR3 тяжелой цепи, поскольку часто наблюдали, что CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи представляет собой участок, который имеет самую высокую степень изменчивости и является основным участником взаимодействия антиген-антитело. Указанные пептиды могут быть легко синтезированы или получены рекомбинантными способами, чтобы получить связывающий агент, пригодный в соответствии с настоящим изобретением. Указанные способы хорошо известны специалистам в данной области техники. Пептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматизированных синтезаторов пептидов, которые коммерчески доступны. Указанные пептиды также могут быть получены с помощью рекомбинантных технологий путем введения ДНК, экспрессирующей пептид, в вектор экспрессии и трансформации клеток вектором экспрессии с получением пептида.

Следовательно, в настоящем изобретении предложена любая связывающая молекула, например антитело или его связывающий фрагмент, которая относится к антителам к DPR согласно настоящему изобретению и способна связываться с агрегированными DPR, которые могут присутствовать в белке, который является нормальным во всех остальных аспектах, например, с молекулами C9ORF72-DPR и их фрагментами. Указанные антитела и связывающие молекулы могут быть исследованы для определения их специфичности связывания и аффинности с помощью ИФА, электрофореза в ДСН-ПААГ и иммуногистохимических способов, описанных в настоящем документе, см., например, примеры 3-13. Указанные

характеристики антител и связывающих молекул также могут быть исследованы методом вестерн-блоттинга; см., в частности, пример 6 и фиг. 5.

Помимо способа получения иммуноглобулинов непосредственно из культуры В-клеток или В-клеток памяти клетки можно применять в качестве источника перестроенных локусов тяжелой цепи и легкой цепи для последующей экспрессии и/или генетических манипуляций. Перестроенные гены антител могут быть подвергнуты обратной транскрипции из соответствующих мРНК для получения кДНК. При желании константная область тяжелой цепи может быть замещена цепью другого изотипа или полностью устранена. Варибельные области могут быть связаны, чтобы кодировать одноцепочечные участки Fv. Несколько участков Fv могут быть связаны для придания способности связываться более чем с одной мишенью или могут быть использованы комбинации химерной тяжелой цепи и легкой цепи. После получения генетического материала аналоги, описанные выше, которые сохраняют способность к связыванию с желаемой мишенью, могут быть легко сконструированы. Способы клонирования варибельных областей антител и получения рекомбинантных антител известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в Gilliland et al., *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20; Doenecke et al., *Leukemia* 11 (1997), 1787-1792.

После получения соответствующего генетического материала и, если желательно, его модификации для кодирования аналога, кодирующие последовательности, включая те, которые кодируют, по меньшей мере, варибельные области тяжелой и легкой цепей, могут быть вставлены в системы для экспрессии, содержащиеся на векторах, которые могут быть трансфицированы в стандартные рекомбинантные клетки-хозяева. Можно применять различные клетки-хозяева; однако для эффективного процессинга предпочтительными являются клетки млекопитающих. Типичные линии клеток млекопитающих, пригодные для этой цели, включают, но не ограничиваются ими, клетки линии CHO, клетки линии HEK293 или клетки линии NSO.

Получение антитела или аналога затем осуществляют путем культивирования модифицированного рекомбинантного хозяина в условиях культивирования, подходящих для роста клеток-хозяев и экспрессии кодирующих последовательностей. Указанные антитела затем извлекают путем выделения их из культуры. Системы для экспрессии предпочтительно предназначены для включения сигнальных пептидов, так, что полученные антитела секретируются в среду; однако также возможна выработка во внутриклеточную среду.

В соответствии с вышеизложенным в настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий антитело или эквивалентную связывающую молекулу согласно настоящему изобретению, в случае антитела, предпочтительно по меньшей мере варибельную область цепи иммуноглобулина, описанного выше. Как правило, указанная варибельная область, кодируемая полинуклеотидом, содержит по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) варибельной области V_H и/или V_L указанного антитела.

Специалист в данной области техники легко поймет, что варибельную область антитела, содержащего вышеописанную варибельную область, можно применять для конструирования других полипептидов или антител с желаемой специфичностью и биологической функцией. Следовательно, в область настоящего изобретения также включены полипептиды и антитела, содержащие по меньшей мере один CDR вышеописанной варибельной области, и те, которые предпочтительно обладают по существу аналогичными или сходными свойствами, как и связывающие антитела, описанные в прилагаемых примерах. Специалист в данной области техники осведомлен, что аффинность связывания может быть усилена путем замены аминокислот в пределах CDR или в пределах гиперварибельных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917), которые частично перекрываются с CDR, согласно определению по Kabat; см., например, Riechmann, et al., *Nature* 332 (1988), 323-327. Следовательно, в настоящем изобретении также предложены антитела, в которых один или более из указанных CDR содержат одну или более, предпочтительно не более двух замен аминокислот. Предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению содержит в одной или обеих цепях иммуноглобулина два или все три участка CDR варибельных областей, как указано на любой из фиг. 1A-L.

Связывающие молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, синтетические или биотехнологические варианты или производные согласно настоящему изобретению, как известно специалистам в данной области техники, могут содержать константную область, которая опосредует одну или более эффекторных функций. Например, связывание компонента системы комплемента C1 с константной областью антитела может активировать систему комплемента. Активация комплемента играет важную роль в опсонизации и лизисе клеток патогенов. Активация комплемента стимулирует воспалительный ответ, а также может быть вовлечена в аутоиммунную гиперчувствительность. Помимо этого антитела связываются с рецепторами на различных клетках посредством области Fc, при этом сайт связывания рецептора Fc на области Fc антитела связывается с рецептором Fc (FcR) на клетке. Существует несколько рецепторов Fc, которые являются специфичными в отношении разных классов антител, включая IgG (гамма-рецепторы), IgE (эпсилон-рецепторы), IgA (альфа-рецепторы) и IgE (мю-рецепторы). Связывание антитела с рецепторами Fc на поверхности клеток инициирует ряд важных и разнообразных биологических реакций, включая захват и разрушение частиц, покрытых антителами, клиренс иммунных

комплексов, лизис покрытых антителами клеток-мишеней с помощью клеток-киллеров (так называемая антителозависимая клеточная цитотоксичность или ADCC), высвобождение воспалительных медиаторов, перенос через плаценту и контроль выработки иммуноглобулинов.

Соответственно согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, в котором по меньшей мере часть одного или более доменов константной области была удалена или изменена иным способом так, чтобы обеспечить желаемые биохимические характеристики, такие как сниженные эффекторные функции, способность к нековалентной димеризации, повышенная способность к локализации в месте агрегации и осаждения DPR-белка, уменьшенный период полувыведения из сыворотки крови или увеличенный период полувыведения из сыворотки крови по сравнению с полноразмерным не измененным антителом, которое обладает приблизительно аналогичной иммуногенностью. Например, некоторые антитела для применения в диагностических и лечебных способах, описанных в настоящем документе, представляют собой антитела с удаленными доменами, которые содержат полипептидную цепь, аналогичную тяжелой цепи иммуноглобулина, но которые лишены по меньшей мере части одного или более доменов тяжелой цепи. Например, в некоторых антителах один полный домен константной области модифицированного антитела будет удален, например весь или часть домена CH2 будет удалена. Согласно другим вариантам реализации некоторые антитела, предназначенные для применения в диагностических и лечебных способах, описанных в настоящем документе, содержат константную область, например константную область тяжелой цепи IgG, которая изменена, чтобы устранить гликозилирование, указанные антитела упомянуты в тексте настоящего документа как агликозилированные или "Agly" антитела. Указанные "Agly" антитела могут быть получены ферментативным способом, а также путем модификации консенсусного сайта(ов) гликозилирования в константной области. Не желая быть связанными соответствием какой-либо теории, авторы настоящего изобретения полагают, что "Agly" антитела могут иметь улучшенный профиль безопасности и стабильности в условиях *in vivo*. Способы получения агликозилированных антител, обладающих желаемой эффекторной функцией, можно найти, например, в международной заявке WO 2005/018572, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

В некоторых антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных, описанных в настоящем документе, область Fc может быть мутирована для снижения эффекторной функции с использованием способов, известных в данной области техники. Например, удаление или инактивация (с помощью точечных мутаций или других способов) константной области может уменьшить связывание с рецептором Fc циркулирующего модифицированного антитела, тем самым увеличивая локализацию DPR-белка. В других случаях модификации константной области в соответствии с настоящим изобретением контролируют связывание комплемента и тем самым уменьшают период полувыведения из сыворотки крови и неспецифическое связывание конъюгированного цитотоксина. Тем не менее, другие модификации константной области можно применять для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных фрагментов, которые обеспечивают улучшенную локализацию за счет увеличения специфичности антигена или гибкости антитела. Полученный в результате физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические последствия модификаций, такие как локализация DPR-белка, биораспределение и период полувыведения из сыворотки крови, легко могут быть измерены и количественно определены с использованием хорошо известных иммунологических способов без проведения излишних экспериментов.

В некоторых антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных, описанных в настоящей заявке, область Fc может быть мутирована или заменена альтернативными последовательностями белков, чтобы увеличить клеточное поглощение антител, например, путем улучшения рецептор-опосредованного эндоцитоза антител с помощью рецепторов Fcγ, LRP или рецепторов Thy1 или с помощью "технологии суперантител", которая обеспечивает перенос антител в живые клетки без нарушения их функции (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241). Например, получение гибридных белков связывающей области антитела и когнатных белковых лигандов рецепторов на клеточной поверхности или би- или полиспецифичных антител со специфичными последовательностями, связывающимися с DPR, а также с рецептором на клеточной поверхности, можно осуществлять путем модификации с использованием методик, известных в данной области техники.

В некоторых антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных, описанных в настоящем документе, область Fc может быть мутирована или замещена альтернативными последовательностями белков, или антитела могут быть химически модифицированы, чтобы увеличить их проникновение через гематоэнцефалический барьер.

Модифицированные формы антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных согласно настоящему изобретению могут быть получены из полноразмерных предшественников или исходных антител с использованием способов, известных в данной области техники. Типичные методики обсуждаются более подробно в настоящем документе. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть получены или изготовлены с использованием методик, которые известны в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела или их фрагменты получены "рекомби-

нантным способом", т.е. получены с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Типичные методики получения антител или их фрагментов обсуждаются более подробно в настоящем документе.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, биотехнологические варианты или производные согласно настоящему изобретению также включают производные, которые модифицированы, например, путем ковалентного присоединения любой молекулы к антителу так, что ковалентное присоединение не препятствует специфичному связыванию антитела с его когнатным эпитопом. Например, но не ограничиваясь перечисленными, производные антител включают антитела, которые были модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Любую из многочисленных химических модификаций можно осуществлять с помощью известных методик, включая, но не ограничиваясь ими, специфичное химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Помимо этого производное может содержать одну или более неклассических аминокислот.

В конкретных предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению не будут вызывать вредный иммунный ответ у животного, подлежащего лечению, например у человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающие молекулы, например антитела, или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению получены от пациента, например пациента-человека, и впоследствии применяются у тех же видов, из которых они были получены, например у человека, что позволяет облегчить или минимизировать возникновение вредных иммунных реакций.

Деиммунизацию также можно применять для уменьшения иммуногенности антитела. В настоящей заявке термин "деиммунизация" включает изменение антитела для модификации Т-клеточных эпитопов; см., например, международные заявки WO 98/52976 и WO 00/34317. Например, исследуют последовательности V_H и V_L исходного антитела и расположение Т-клеточного эпитопа человека из каждой области V, что позволяет установить расположение эпитопов по отношению к определяющим комплементарность участкам (CDR) и другим ключевым остаткам в последовательности. Индивидуальные Т-клеточные эпитопы из карты Т-клеточных эпитопов исследуют для того, чтобы выявить альтернативные замены аминокислот с низким риском изменения активности готовых антител. Сконструирован ряд альтернативных последовательностей V_H и V_L , включающий комбинации замен аминокислот, и указанные последовательности впоследствии включают в ряд связывающих полипептидов, например DPR-специфичных антител или их иммуноспецифичных фрагментов, для применения в диагностических и лечебных способах, описанных в настоящем документе, которые затем исследуют для определения их функциональности. Как правило, получают и исследуют от 12 до 24 вариантов антител. Гены полноразмерных тяжелых и легких цепей, содержащие модифицированные области V и C человека, затем клонируют в экспрессирующие векторы и полученные в результате плазмиды вводят в клеточные линии для получения полноразмерных антител. Указанные антитела затем сравнивают в соответствующих биохимических и биологических способах исследований и выявляют оптимальный вариант.

Моноклональные антитела могут быть получены с использованием разнообразных методик, известных в данной области техники, включая использование гибридом, технологий рекомбинантных ДНК и фагового дисплея или их комбинации. Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием методик гибридом, включая те, которые известны в данной области техники и описаны, например, в Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988); Hammerling et al., в: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981), указанные литературные источники полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. В настоящей заявке термин "моноклональное антитело" не ограничен антителами, полученными с помощью технологии гибридом. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не к способу, с помощью которого получено указанное антитело. Следовательно, термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, полученными с помощью технологии гибридом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению получены из клеток человека, которые были индуцированы для выработки антител с помощью трансформации вирусом Эпштейна-Барра, как описано в настоящем документе.

В хорошо известном способе гибридом (Kohler et al., *Nature* 256 (1975), 495) сравнительно короткоживущие или мортальные лимфоциты из млекопитающего, например В-клетки, полученные от субъекта-человека, как описано в настоящем документе, гибридизованы с бессмертной линией опухолевых клеток (например, клетками миеломы), обеспечивая тем самым гибридные клетки или "гибридомы", которые являются бессмертными и способны вырабатывать антитело, генетически кодируемое В-клетками. Полученные гибриды разделяют на отдельные генетические штаммы путем селекции, разбавления и повторного роста, при этом каждый отдельный штамм содержит специфичные гены для образования одного антитела. Штаммы вырабатывают антитела, которые гомогенны в отношении желаемого антигена и, что касается их чистого генетического родства, называются "моноклональными" антителами.

Клетки гибридомы, полученные указанным способом, высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, которые ингибируют размножение или выживание негибридизованных исходных клеток миеломы. Специалисты в данной области техники поймут, что реагенты, клеточные линии и среды для образования, отбора и размножения гибридом являются коммерчески доступными из ряда источников, и стандартные протоколы хорошо известны. Как правило, культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, количественно исследуют для определения выработки моноклональных антител к желаемому антигену. Специфичность связывания моноклональных антител, вырабатываемых клетками гибридомы, определяют с помощью количественных способов исследований в условиях *in vitro*, таких как иммунопреципитация, радиоиммунологический анализ (РИА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), описанных в настоящем документе. После выявления клеток гибридомы, которые вырабатывают антитела требуемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны могут быть субклонированы с использованием способа предельного разведения и размножены стандартными способами; см., например, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), 59-103. Кроме того, следует понимать, что моноклональные антитела, вырабатываемые субклонами, могут быть отделены от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с использованием стандартных способов очистки, таких как, например, хроматография на белке А, хроматография на гидроксиллапатитном носителе, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения лимфоциты могут быть выбраны с помощью микроманипуляции, и гены вариабельных областей могут быть выделены. Например, моноклеарные клетки периферической крови могут быть выделены из иммунизированного или исходно иммунного млекопитающего, например человека, и культивированы в течение приблизительно 7 дней в условиях *in vitro*. Культуры могут быть подвергнуты скринингу для выявления специфичных IgG, которые отвечают критериям отбора. Клетки из положительных лунок могут быть выделены. Индивидуальные Ig-вырабатывающие В-клетки могут быть выделены с помощью FACS или путем выявления с использованием теста на гемолитические бляшки, опосредованные компонентами системы комплемента. Ig-вырабатывающие В-клетки могут быть перенесены в пробирку путем микроманипуляции, и гены V_H и V_L могут быть амплифицированы с использованием, например, ОТ-ПЦР. Гены V_H и V_L могут быть клонированы в вектор экспрессии антитела и трансфицированы в клетки (например, эукариотические или прокариотические клетки) для экспрессии.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения клеточные линии, вырабатывающие антитело, могут быть отобраны и культивированы с использованием методик, хорошо известных специалисту в данной области техники. Указанные методики описаны в различных лабораторных руководствах и исходных публикациях. В связи с этим методики, пригодные для применения согласно настоящему изобретению, описанные ниже, описаны в руководстве *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), которое полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки, включая дополнительные материалы.

Фрагменты антитела, которые распознают специфичные эпитопы, могут быть получены с помощью известных методик. Например, фрагменты Fab и $F(ab')_2$ могут быть получены рекомбинантными способами или путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина, используя ферменты, такие как папаин (для получения фрагментов Fab) или пепсин (для получения фрагментов $F(ab')_2$). Фрагменты $F(ab')_2$ содержат вариабельную область, константную область легкой цепи и домен CH1 тяжелой цепи. Указанные фрагменты являются достаточными для применения, например, в иммунодиагностических способах, включающих связывание иммуноспецифичных частей иммуноглобулинов с детектирующими реагентами, такими как радиоизотопы.

Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере один CDR молекулы антитела. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере два CDR из одной или более молекул антител. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере три CDR из одной или более молекул антител. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере четыре CDR из одной или более молекул антител. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере пять CDR из одной или более молекул антител. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере шесть CDR из одной или более молекул антител. Типичные молекулы антител, содержащие по меньшей мере один CDR, которые могут быть включены в рассматриваемые антитела, описаны в настоящем документе.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть получены с помощью любого способа, известного в данной области техники для синтеза антител, в частности путем химического синтеза или предпочтительно с помощью методик рекомбинантной экспрессии, описанных в настоящей заявке.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное согласно настоящему изобретению содержит синтетическую константную область, в которой один или более доменов частично или полностью удалены ("антитела с удаленным доменом"). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения совместимые модифицированные антитела будут содержать конструкции или варианты с удаленным доменом, в которых вся область CH2 была удалена (конструкции Δ CH2). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения удаляемый домен может быть заменен коротким связывающим пептидом, чтобы обеспечить гибкость и свободу движения варибельной области. Специалист в данной области техники поймет, что указанные конструкции являются особенно предпочтительными благодаря способности домена CH2 регулировать скорость катаболизма антитела. Конструкции с удаленным доменом могут быть получены с использованием вектора, кодирующего константную область IgG1 человека, см., например, международные заявки WO 02/060955 и WO 02/096948A2. Указанный вектор сконструирован так, чтобы удалить домен CH2 и обеспечить синтетический вектор, экспрессирующий константную область IgG1 с удаленным доменом.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению представляют собой мини-тела. Мини-тела могут быть получены с использованием способов, описанных в данной области техники, см., например, патент США 5837821 или международную заявку WO 94/09817.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное согласно настоящему изобретению содержит тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую делецию или замену нескольких или даже одной аминокислоты, до тех пор, пока указанная замена обеспечивает связь между мономерными субъединицами. Например, мутация одной аминокислоты в выбранных областях домена CH2 может привести к существенному уменьшению связывания с Fc и тем самым увеличить локализацию DPR-белка. Аналогичным образом, может быть желательным удаление указанной части одного или более доменов константной области, контролирующей эффекторную функцию (например, связывание комплемента), которая подлежит модулированию. Указанные частичные делеции константных областей могут улучшить выбранные характеристики антитела (период полувыведения из сыворотки крови), оставляя неизменными другие желательные функции, связанные с рассматриваемым доменом константной области. Помимо этого, как упоминалось выше, константные области описанных антител могут быть синтетическими в результате мутации или замены одной или более аминокислот, которая улучшает профиль готовой конструкции. В этом отношении существует возможность устранения активности, обеспеченной консервативным сайтом связывания (например, связывание Fc), при этом по существу сохраняя конфигурацию и иммуногенный профиль модифицированного антитела. Другие варианты реализации включают добавление одной или более аминокислот к константной области, чтобы усилить желательные характеристики, такие как эффекторная функция, или обеспечить присоединение большего количества цитотоксинов или углеводов. В таких вариантах реализации желательным может быть введение или повторение специфичных последовательностей, полученных из выбранных доменов константной области.

В настоящем изобретении также предложены антитела, которые содержат, по существу состоят или состоят из вариантов (включая производные) молекул антител (например, областей V_H и/или V_L), описанных в настоящем документе, причем указанные антитела или их фрагменты иммуноспецифично связываются с DPR. Для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, можно применять стандартные методики, известные специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, которые приводят к заменам аминокислот. Предпочтительно варианты (включая производные) кодируют менее 50 замен аминокислот, менее 40 замен аминокислот, менее 30 замен аминокислот, менее 25 замен аминокислот, менее 20 замен аминокислот, менее 15 замен аминокислот, менее 10 замен аминокислот, менее 5 замен аминокислот, менее 4 замен аминокислот, менее 3 замен аминокислот или менее 2 замен аминокислот по сравнению с эталонной областью V_H , V_H -CDR1, V_H -CDR2, V_H -CDR3, и областью V_L , V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3. "Консервативная замена аминокислоты" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь с аналогичным зарядом. Семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи с аналогичными зарядами, были определены в данной области техники. Указанные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мутации могут быть введены случайным образом вдоль всей или части кодирующей последовательности, например путем насыщающего мутагенеза, и полученные мутированные варианты могут быть подвергнуты скринингу для определения их биологической активности для выявления мутированных вариантов, которые сохраняют активность (например, способность связываться с

ния мутированных вариантов, которые сохраняют активность (например, способность связываться с DPR и/или мутированными и/или агрегированными молекулами C9ORF72-DPR и/или их фрагментами).

Например, мутации можно ввести только в каркасные участки или только в участки CDR молекулы антитела. Введенные мутации могут быть молчащими или нейтральными миссенс-мутациями, например, оказывать незначительное влияние на способности антитела к связыванию с антигеном или не оказывать никакого влияния, действительно, некоторые указанные мутации вообще не изменяют аминокислотную последовательность. Такие типы мутаций могут быть подходящими для оптимизации кодонов или улучшения выработки антител гибридами. Кодрующие области с оптимизированными кодонами, кодирующие антитело согласно настоящему изобретению, описаны в настоящем документе в других местах. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения ненейтральные миссенс-мутации могут изменять способность антитела связываться с антигеном. Большинство молчащих и нейтральных миссенс-мутаций с большой вероятностью располагаются в каркасных участках, в то время как большинство ненейтральных миссенс-мутаций, вероятно, будет расположено в CDR, но необязательно. Специалист в данной области техники сможет сконструировать и исследовать мутированные молекулы с требуемыми свойствами, такими как отсутствие изменения антигенсвязывающей активности или изменения активности связывания (например, улучшения антигенсвязывающей активности или изменения специфичности антитела). После мутагенеза кодируемый белок может быть стандартно экспрессирован, и функциональная и/или биологическая активность кодируемого белка (например, возможность иммуноспецифичного связывания по меньшей мере одного эпитопа DPR и/или мутированных и/или агрегированных молекул C9ORF72-DPR и/или их фрагментов) может быть определена с использованием методик, описанных в настоящем документе, или с помощью стандартных методик модификации, известных в данной области техники.

III. Полинуклеотиды, кодирующие антитела.

Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, может быть составлен из любого полирибонуклеотида или полидезоксирибонуклеотида, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. Например, полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, может быть составлен из одно- и двухцепочечной ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных участков, одно- и двухцепочечной РНК и РНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных участков, гибридных молекул, содержащих ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными или представляют собой смесь одноцепочечных и двухцепочечных участков. Помимо этого полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, может состоять из трехцепочечных участков, содержащих РНК или ДНК или РНК и ДНК. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, также может содержать одно или более модифицированных оснований или остовы ДНК или РНК, модифицированные для придания им стабильности или по другим причинам. "Модифицированные" основания включают, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. Различные модификации могут быть сделаны в ДНК и РНК; следовательно, термин "полинуклеотид" включает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы.

Выделенный полинуклеотид, кодирующий неприродный вариант полипептида, полученного из иммуноглобулина (например, участок тяжелой цепи иммуноглобулина или часть легкой цепи), может быть получен путем введения одной или более нуклеотидных замен, добавлений или делеций в нуклеотидную последовательность иммуноглобулина так, что в кодируемый белок вводят одну или более замен, вставок или делеций аминокислот. Мутации могут быть введены с помощью стандартных методик, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Предпочтительно консервативные аминокислотные замены осуществляют на одном или более остатках заменимых аминокислот.

Как хорошо известно, РНК может быть выделена из исходных В-клеток, клеток гибридомы или из других трансформированных клеток с помощью стандартных методик, таких как экстракция гуанидинизотиоцианатом и осаждение с последующим центрифугированием или хроматографией. При необходимости мРНК может быть выделена из общей РНК с помощью стандартных методик, таких как хроматография на олиго-дТ целлюлозе. Подходящие методики известны в данной области техники. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кДНК, которые кодируют легкие и тяжелые цепи антитела, могут быть получены, одновременно или по отдельности, с использованием обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы в соответствии с хорошо известными способами. ПЦР может быть инициирован консенсусными праймерами для константной области или более специфичными праймерами на основе опубликованных аминокислотных последовательностей ДНК тяжелой и легкой цепей. Как уже говорилось выше, ПЦР также можно использовать для выделения клонов ДНК, кодирующих легкую и тяжелую цепи антитела. В этом случае библиотеки могут быть подвергнуты скринингу с использованием консенсусных праймеров или более крупных гомологичных зондов, таких как зонды для константной области человека.

ДНК, как правило, плазмидная ДНК, может быть выделена из клеток с использованием методик, известных в данной области техники, подвергнута картированию сайтов рестрикции и секвенирована в

соответствии со стандартными, хорошо известными методиками, подробно изложенными, например, в приведенных выше ссылках, касающихся методик рекомбинантных ДНК. Очевидно, что ДНК может быть синтетической в соответствии с настоящим изобретением в любой момент в течение процесса выделения или последующего исследования.

Ввиду вышеизложенного в настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий, по меньшей мере, связывающий домен или вариабельную область цепи иммуноглобулина антитела согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), в которой по меньшей мере один из CDR вариабельной области тяжелой цепи или по меньшей мере два из V_H -CDR вариабельной области тяжелой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны эталонным аминокислотным последовательностям V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3 тяжелой цепи антител, описанных в настоящем документе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения области V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3 из V_H по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны эталонным аминокислотным последовательностям V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 тяжелой цепи антител, описанных в настоящем документе. Следовательно, согласно указанному варианту вариабельная область тяжелой цепи согласно настоящему изобретению содержит полипептидные последовательности V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3, родственные полипептидным последовательностям, представленным на фиг. 1.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), в которой по меньшей мере один из V_L -CDR вариабельной области легкой цепи или по меньшей мере два из V_L -CDR вариабельной области легкой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны эталонным аминокислотным последовательностям V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3 легкой цепи антител, описанных в настоящем документе. Согласно другому варианту реализации области V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3 из V_L по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичны эталонным аминокислотным последовательностям V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 легкой цепи антител, описанных в настоящем документе. Следовательно, согласно указанному варианту вариабельная область легкой цепи согласно настоящему изобретению содержит полипептидные последовательности V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3, родственные полипептидным последовательностям, представленным на любой из фиг. 1A-L.

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

Как известно в данной области техники, "идентичность последовательностей" двух полипептидов или двух полинуклеотидов определяют путем сравнения аминокислотной или нуклеиновой последовательности одного полипептида или полинуклеотида с последовательностью второго полипептида или полинуклеотида. Как обсуждалось в настоящем документе, является ли какой-либо конкретный полипептид по меньшей мере приблизительно на 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% идентичным другому полипептиду, можно определить с помощью способов и компьютерных программ/программного обеспечения, известного в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, программу Best-fit (Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин, США 53711). BESTFIT использует алгоритм поиска локальной гомологии, описанный в Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, чтобы найти наилучший сегмент гомологии между двумя последовательностями. При использовании BESTFIT или любой другой программы выравнивания последовательностей, чтобы определить, является ли конкретная последовательность, например, на 95% идентичной эталонной последовательности в соответствии с настоящим изобретением, параметры устанавливают так, что процент идентичности вычисляется по полной длине эталонной последовательности полипептида, и допускаются пропуски в гомологии вплоть до 5% от общего числа аминокислот в эталонной последовательности.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения полинуклеотид содержит, по существу состоит или состоит из нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотидную последовательность области V_H или V_L антитела к DPR, представленную в табл. II. В связи с этим специалист в данной области техники поймет, что полинуклеотиды, кодирующие, по меньшей мере, вариабельную область легкой и/или тяжелой цепей, могут кодировать вариабельную область обеих цепей иммуноглобулина или только одной цепи. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, следовательно, полинуклеотид содержит, по существу состоит или состоит из нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотидную последовательность области V_H и V_L антитела к DPR и/или его фрагментов, указанную в табл. II.

Таблица II
Нуклеотидные последовательности области V_H и V_L антител,
распознающих DPR, предпочтительно C9ORF72-DPR

Антитело	Нуклеотидные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (V _H) и вариабельной области легкой цепи (V _L) цепи
NI-308.18F7 V _H	TGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTCGGAGACCTGTCTCCTCAGCTGCAGCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAATGATTACTACTGGAACTGGATCCGGCAGCCCGCGGGAAGGACTGGAGTGGATTGGGCTATATATGCCAGTGGGACCATCAATTACAACCTTCCTCCAGAGTCGAGTCACCATGTCAATTGACAGCTCCAAGAACAGTTCTCCCTAGACCTCATCTCTGTCTCCGCCGCGGACACGGCCGTCTACTATTGTGGAGATGGGGCCAGGTGGTGGGGACTACTACTACGGGATGGAAGCTCTGGGGCCAGGGGACACGGTCAACCTCTCCTCG SEQ ID NO: 1
NI-308.18F7 V _K	TGCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGTCCGTCAACCTCGGAGAGCCGGCTCCATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTCCAACATACAAATGGATACAAATTACTTGGATTGGTACCTGCTGAAGCCAGGGCAGTCTCCCAACTCTTAATCTTCTGACTTCTAATCGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGAGTGGATCAGGACAAATTTACACTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTCTATTATTGCATGGAAGGTATACAATTGTGGACCTTCGGCCAAAGGACCAAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 3
NI-308.18F7 V _K - P1MC	TGCGACATCGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGTCCGTCAACCTCGGAGAGCCGGCTCCATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTCCAACATACAAATGGATACAAATTACTTGGATTGGTACCTGCTGAAGCCAGGGCAGTCTCCCAACTCTTAATCTTCTGACTTCTAATCGGGCTCCGGGGTCCCTGCAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGACAAATTTACACTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTCTATTATTGCATGGAAGGTATACAATTGTGGACCTTCGGCCAAAGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 5
NI-308.1507 V _H	TGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTAGTCCAGCCTGGGAGTCCCTGAGACTGTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAGTAATCATGCTATGCACTGGGTCCGGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGCGAGAACACATATTATGCAGACTCCATTGAGGGCCGATTCAACATTTCCAGAGACAATTTCAAGAACACACTCTTTCTACAAATGTACAGCCTGCAGCTGATGACACGGCTATGTACTTCTGTGCGAGAGGGGGCCGTGGGGGCACTTCACTCATACTACCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACCTCTCCTCG SEQ ID NO: 7
NI-308.1507 V _K	TGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTCGGGGCAAGCCAGAAACATAGACAAGTACTTAAATGGTATCAGCAGATACCGGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATGAGTTTGACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTCTCTCAACCATCAGCAGTCTGCAACTGAAGATTTGCAATTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTTCCTTCGGACGTTCGGCCAAAGGACCAAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 9
NI-308.1507 V _K - P1MC	TGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCCTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTCGGGGCAAGCCAGAAACATAGACAAGTACTTAAATGGTATCAGCAGATACCGGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATGAGTTTGACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTCTCTCAACCATCAGCAGTCTGCAACTGAAGATTTGCAATTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTTCCTTCGGACGTTCGGCCAAAGGACCAAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 11
NI-308.562 V _H	TGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGACTTGCAGAACCTGGGGCTCAGTGACGGTTTCTGCACGGCTTCTGGATACCATTTGCTGACAAATGCTATAAAGTGGTGGGCCAGGCCCGGACAAAGGCTTGAAGTGGATGGGGTGGATCAACATTTACAGTGGTAACACAAAATATTCACAGAACTTCAGGGCAGAGTCACTTTACAGAAACACATCCGCGAGCACAGCCTTCATGCACCTGCGGACCTGAGATCAGAAGACACGGCTGTGTTTCTGTGCGAGAGACCTGATAGCAGTGGATATTACTTGCCCTATTTTGACTACTGGGGCCAGGAACCTGGTCAACCTCTCCTCG SEQ ID NO: 13
NI-308.562 V _K	TGCGACATCCAGTTCAGCCAGTCTCCAGACTCCCTGACTTGTCTGTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTCTTCTACAACTCCAAACATTAAGAACTACTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACAGGACAGCCTCTAAGTTGCTCATGTACTGGGCATCTACCCGGGAGTCCGGGGTCACTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGTCTGGACAGATTTTACTCTCAACATTACCACTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTCTATTATTGTCAAGCAATTTATAGTTCTCTCTCACTTTCGGCGGAGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 15
NI-308.562 V _H - P1MC	TGCCAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGGGCTGACTTGCAGAACCTGGGGCTCAGTGACGGTTTCTGCACGGCTTCTGGATACCATTTGCTGACAAATGCTATAAAGTGGTGGGCCAGGCCCGGACAAAGGCTTGAAGTGGATGGGGTGGATCAACATTTACAGTGGTAACACAAAATATTCACAGAACTTCAGGGCAGAGTCACTTTACAGAAACACATCCGCGAGCACAGCCTTCATGCACCTGCGGACCTGAGATCAGAAGACACGGCTGTGTTTCTGTGCGAGAGACCTGATAGCAGTGGATATTACTTGCCCTATTTTGACTACTGGGGCCAGGAACCTGGTCAACCTCTCCTCG SEQ ID NO: 17
NI-308.562 V _H - P1MC	TGCGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGACTTGTCTGTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTCTTCTACAACTCCAAACATTAAGAACTACTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACAGGACAGCCTCTAAGTTGCTCATGTACTGGGCATCTACCCGGGAGTCCGGGGTCACTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGTCTGGACAGATTTTACTCTCAACATTACCACTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTCTATTATTGTCAAGCAATTTATAGTTCTCTCTCACTTTCGGCGGAGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 19
NI-308.28G1 V _H	TGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAAAGCTGGTGAAGCCCTCGGAGACCTGTCTGCTCAGCTGCACTGTCTGGCGGCTCCGTCAATAGTTACTATTGGACCTGGATCCAGAGTCCCGGGAAGGACTGGAGTGGCTTGGGCTATCTATATCGCTGGGAGGACCAAC

	TATAACCCCTCCCTCAGAGTCGAATCGCCCTGTGAGTGACAGCTCCAGGAACAGTT GTCCCTGAAGCTGACGTCTGTGACCGCGCGGACACGGCCATATATTATTGTGCGAGAT GGGGAGCGGAGAGTGGTACTACTACTATGGAGTGGACGTCTGGGGCCAGGCACCCCTG GTCAACCTCTCCTCG SEQ ID NO: 21
NI-308.28G1 V _K	TGCGAAATTTGTGATGACGAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCAACCTGGAGAGCCGGC CTCCATCTCCTGCAAGTCTAGTGAGGGACTCCTGCATAGTAATGTTACACCTATTGG ATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGGCTCCGAGCTCCTGATCTTTCTGGCTTCTAAT CGGGCCCGGGGTCCCTGACAGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACT GAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGCGTTTATTACTGCATGACAGCTATAC AAAGTCCCTTGGACGTTCCGGCCAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA SEQ ID NO: 23
NI-308.28G1 V _H - FIMC	TGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAAGACTGGTGAAGCCCTGGAGAGCCCTGTC GCTCAGCTGCATCTGCTGCGGCTCCGTCAATAGTTACTATTGGACCTGGATCCAGC AGTCCCCCGGAAGGAGCTGGAGTGGCTTGGCGTATCTATATCGCTGGAGGACCAAC TATAACCCCTCCCTCAGAGTCGAATCGCCCTGTGAGTGACAGCTCCAGGAACAGTT GTCCCTGAAGCTGACGTCTGTGACCGCGCGGACACGGCCATATATTATTGTGCGAGAT GGGGAGCGGAGAGTGGTACTACTACTATGGAGTGGACGTCTGGGGCCAGGGCCAGG GTCAACCTCTCCTCA SEQ ID NO: 25
NI-308.28G1 V _H - FIMC	TGCGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCAACCTGGAGAGCCGGC CTCCATCTCCTGCAAGTCTAGTGAGGGACTCCTGCATAGTAATGTTACACCTATTGG ATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGGCTCCGAGCTCCTGATCTTTCTGGCTTCTAAT CGGGCCCGGGGTCCCTGACAGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACT GAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGCGTTTATTACTGCATGACAGCTATAC AAAGTCCCTTGGACGTTCCGGCCAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA SEQ ID NO: 27
NI-308.45C2 V _H	TGCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTGCAGATCCTCTC ACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTTCAGCAACAGTGTCTTGGAACTGGA TCAGGCACTCCCATCTCGAGAGGCCCTTGAAGTGGTGGGAAGGACATACACAGTCCAAG TGGGATAATGATTATGCAACATCTGTGAAAGTCAATAGTATCAACCCAGACACATC CAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGTTGAATTCGTGACTCCGAGGACACGGCTGTGTAAT ATTGTGCAAGAGAGTGGCATATTGTGGTGGTGAAGTCTATTCTGTTCTCTTGACTAC TGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGTCTC CTCG SEQ ID NO: 29
NI-308.45C2 V _H	TGCGAATTTGTGATGACACAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCAACCTGGAGAGCCGGC CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCTCCTCCAGAGTAATGGATACACCTATTGG ATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCTGATCTATTGGGTTCTAAT CGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACT GAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTAC AAACTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 31
NI-308.45C2 V _H - FIMC	TGCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTGCAGATCCTCTC ACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTTCAGCAACAGTGTCTTGGAACTGGA TCAGGCACTCCCATCTCGAGAGGCCCTTGAAGTGGTGGGAAGGACATACACAGTCCAAG TGGGATAATGATTATGCAACATCTGTGAAAGTCAATAGTATCAACCCAGACACATC CAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGTTGAATTCGTGACTCCGAGGACACGGCTGTGTAAT ATTGTGCAAGAGAGTGGCATATTGTGGTGGTGAAGTCTATTCTGTTCTCTTGACTAC TGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGTCTC CTCG SEQ ID NO: 33
NI-308.45C2 V _H - FIMC	TGCGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCAACCTGGAGAGCCGGC CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCTCCTCCAGAGTAATGGATACACCTATTGG ATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCTGATCTATTGGGTTCTAAT CGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACT GAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTAC AAACTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 35
NI-308.24E11 V _H	TGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAAGACTGGTGAAGCCCTGGAGAGCCCTGTC CCTCACCTGCATCTCTCTACTACTCCCTCAGAAATTAATTTCTGGAGTGGATCCGGC AGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGTATGCTATTACAGTGGAGTACCATC TACAATCGTCCCTCAAGATCAGATCACCATATCATAGACAGTCCAAGAACAGTT CTCCCTGAACCTGCGCTCTGTGACCGCTGCGGATACGGCCATGTAATTTCTGTGCGAGAG GCTCCCGCTGAGACTGATGCGCGGGACTTCCGCGCTACTACTTTGATCACTGGGGC CAGGGAAACCTTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 37
NI-308.24E11 V _K	TGCGACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCGTCAGTAGGAAACAGAAT CACCTTCACTTGCAGGCGAGTCAGGACATTAGATATTATTAAATTTGGTATCAGCAGA AAACAGGGAAGCCCTAAACTCCTGATCTACGATGTGCCAATTTGGATACAGGGGTG CCACCAAGGTTCAAGTGAAGTGGATCTGGGACAAATTTCACTTTCACCATCAGCAGCCT GCAGCCTGAAGATATTGCAAGTTTATTACTGTCAACAGTATGAAGGACTCCCTGTGACCT TCGGCGGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 39
NI-308.24E11 V _K - FIMC	TGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCGTCAGTAGGAAACAGAAT CACCTTCACTTGCAGGCGAGTCAGGACATTAGATATTATTAAATTTGGTATCAGCAGA AAACAGGGAAGCCCTAAACTCCTGATCTACGATGTGCCAATTTGGATACAGGGGTG CCACCAAGGTTCAAGTGAAGTGGATCTGGGACAAATTTCACTTTCACCATCAGCAGCCT GCAGCCTGAAGATATTGCAAGTTTATTACTGTCAACAGTATGAAGGACTCCCTGTGACCT TCGGCGGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 41
NI-308.46E9 V _H	TGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAAGACTGGTGAAGCCCTGGAGAGCCCTGTC CCTCACTTGCATCTGTCTGTGTGCTCCATCAGCGGTAGTACTACTACTGGGGCTGGA TCGCGCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTATATTGGGAGATCTACTACTAGTGGGAGC ACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTGCAGGCCACCATATCTGTAGACAGTCCAAGAA CCAGCTCTCCCTGACACTGAGTTCTGTGACCGCGCAGATACGGCTGTGTAATTTGTG

	TGAGACCCCTTTTACGCTGTTGGGGAACTCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACC CTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 43
NI-308.46E9 V_H	TGCGAAATTGTGTGACTCAGTCTCCAGCCACCGTGTCTGTCTCCAGGGGAGAGAGC CACCCCTCTCTGCAGGGCCAGCCAGAGTTGTAGCACCACTTAGCTGGTACCAGCAGA AACCTGGCCAGCCTCCAGGCTCCTCATTATGTTGTCATCCACAGGGCCACTGGTATC CCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGGCAGAGTTACCCCTCACCATCAGCAGCCT GCAGTCTGAAGATTTGTTGTTTATTACTGTGAGCAATATAATAACTGGCTCCGGCTT TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAATCAAA SEQ ID NO: 45
NI-308.46E9 V_H - PIMC	TGCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCTGTG CCTCACTTGCACTGTCTCTGGTGCCCTCCATCAGCGGTAGTACCTACTACTGGGGCTGGA TCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGCTGGAGTATATTTGGGAGAATCTACTATAGTGGGAGC ACCTACTACAACCCGTCCTCGAAGATCGAGCCACCATATCTGTAGACACGTCGAAGAA CCAGCTCTCCCTGACACTGAGTTCTGTGACCGCCGAGATACGGCTGTGTATTATTGTG TGAGACCCCTTTTACGCTGTTGGGGAACTCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACC CTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 47
NI-308.46E9 V_H - PIMC	TGCGAAATAGTGATGACGCACTCTCCAGCCACCGTGTCTGTCTCCAGGGGAGAGAGC CACCCCTCTCTGCAGGGCCAGCCAGAGTTGTAGCACCACTTAGCTGGTACCAGCAGA AACCTGGCCAGCCTCCAGGCTCCTCATTATGTTGTCATCCACAGGGCCACTGGTATC CCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGGCAGAGTTACCCCTCACCATCAGCAGCCT GCAGTCTGAAGATTTGTTGTTTATTACTGTGAGCAATATAATAACTGGCTCCGGCTT TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 49
NI-308.6B11 V_H	TGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAGGCCTGGGGCTCAGTGAA GGTCTCTCTGAAGGTTTCCGGATACACCCTCACTGAATTATCCATGCATGGGTGGGAC AGGCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTGATCCTGAAGATGGTGAACAA GTCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACAC AGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCTTGATCACTGTGCAA CATACGGCAGCAGCTGGCACTGGAATGAGGGAAATGAGGGGTCTACTACTTTGACTAC TGGGGCCAGGGAAACCCTGGTCACC GTCTCCTCG SEQ ID NO: 51
NI-308.6B11 V_H	TGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT CACCATCACTTGCCAGGGCAGTCCAGGACATTAGCATTATTTAAATGGTATCAGCAAA AACAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCATCCAATTGGAAACAGGGGTCT CCATCAAGGTTCACTGGAAAGTGATCTGGGACAGATTTACTTTACCATCAGCGGCCT GCAGCCTGAAGATGTTGCAAGATATTTATGTCAACAGTATGATGATCTCCCATCACCT TCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA SEQ ID NO: 53
NI-308.6B11 V_H - PIMC	TGCCAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAGGCCTGGGGCTCAGTGAA GGTCTCTCTGAAGGTTTCCGGATACACCCTCACTGAATTATCCATGCATGGGTGGGAC
	AGGCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTGATCCTGAAGATGGTGAACAA GTCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACAC AGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCTTGATCACTGTGCAA CATACGGCAGCAGCTGGCACTGGAATGAGGGAAATGAGGGGTCTACTACTTTGACTAC TGGGGCCAGGGAAACCCTGGTCACCCTCTCCTCG SEQ ID NO: 55
NI-308.46F8 V_H	TGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGTCTCCTGAG ACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACTTTGATGAATATGGCATGAGCTGGGTCCGCC AAGTTCAGGGAAAGGGCTGAGGTGGGTCTCTGGCATTAATTGGAATGGAGCAACCA CGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAAGCCAGAACTC CCTCTATCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGATCACTGTGCGA GAGATGGGTGTAGGAATACCACTGCTATATCTGGGACTGGTTCGATCCCTGGGGCCAG GGAAACCCTGGTCACTGCTCCTCG SEQ ID NO: 57
NI-308.46F8 V_L	TGCCAGTCTGTGTTGACGACGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTAC CATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCACATTGGAATTAATTATGTATGCTGGTACCA ACCTCCAGGAACAGCCCCCAACTCCTCATTTATGACGATAATAAGCGACCTCAGGG ATTCTGACCGATTCTCTGGCTCAAGTCTGGCAGTCAAGCAOCTGGGCATCAACGG ACTCCAGACTGGGGCAGAGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGACAGAGCCTGAGTG TTGTGATATTCGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCTA SEQ ID NO: 59
NI-308.46F8 V_H - PIMC	TGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGTCTCCTGAG ACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACTTTGATGAATATGGCATGAGCTGGGTCCGCC AAGTTCAGGGAAAGGGCTGAGGTGGGTCTCTGGCATTAATTGGAATGGAGCAACCA CGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAAGCCAGAACTC CCTCTATCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGATCACTGTGCGA GAGATGGGTGTAGGAATACCACTGCTATATCTGGGACTGGTTCGATCCCTGGGGCCAG GGAAACCCTGGTCACTGCTCCTCG SEQ ID NO: 61
NI-308.4M1 V_H	TGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGGGTCTCCTGCG ACTCTCCTGTGAAGCCTCTGGATTCACTATCGGCACCTATGOCATGCATGGGTCCGCC AGTTTCAGGCAAGGGCTGGATTGGGTGGCAGTAATATGTTGATGGAACTACTGAG TACTACAGAGCCGCTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAAGCCAGAAACAC ACTGTATCTGCAAAATGAACACTTGAAGAGGTGACGACACGGCTATATATTCTGTGCGC GAGATTTCACCTCCTCGGGGGAGACCGGTTCTGGACACAAGTACCTGATCTCTGGGGC CAGGGCACCTGTGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 63
NI-308.4M1 V_E	TGCGAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCAACCTGTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGC CAGGCTCTCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTACTAAATCTTAGCTGGTACCAGACAGA AACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGTATCTACAGGGCCGCTGGCACC CCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGCTTCACTCTACCATCAGCAGCCT AGAGCCTGAAGATTTGCAGTTTATTACTGTCAACACGTAGCAGTGGCCTCCGGTCA

	CTTTCGGCGGAGGACCAAGTGAGATCAAA SEQ ID NO: 65
NI-308.4M1 V _H - PIMC	TGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCGGGGGGTCCCTGCG ACTCTCCTGTGAAGCCTCTGGATTACCATCGGCACCTATGCCATGCATGGGTCCGCC AGTTTCAGGCAAGGGCCTGGATTGGGTGGCAGTAATATCGTTTCGATGGAACTACTGAG TACTACACAGACGCGGTGAAGGGCGATTACCATCTCCAGAGCAATGCCAAGAACAC ACTGATATCGAAATGAACACTTGAAGAGTGACGACACGGCTATATATTTCTGTGCGC GAGATTTCACCTCTCTGGGGGAGACGGTTCGTGGACACAAGTACCTGATCTCTGGGGC CAGGGCACCTGGTACCCTCTCTCG SEQ ID NO: 67
NI-308.4M1 V _K - PIMC	TGCGAAATTGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGC CACGCTCTCTCGAGGGCCAGTCAGAGTGTACTAAATACTTAGCCTGGTACCAACAGA AACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGATCTTACAGGGCCTGGCACC CCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCT AGAGCCTGAAGATTTCAGTTTATTACTGTACCAACGTAGCAGCTGGCTCCGGTCA CTTTCGGCGGAGGACCAAGTGAGATCAAA SEQ ID NO: 69
NI-308.12A3 V _H	TGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGCTCCCTGAG ACTCTCCTGCGTAGGCTCTGGATTCTCTTCAGTGATTTTGAATGGACTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTCATATATTAGTGGTACGGTAATATCATA TATCAGACAGACTCTGTGAAGGGCGATTACCATCTCCAGAGCAAGGCCAAGAAATTC ACTGTTTCTACAAATGGACAGCCTGACCGTCGAGGACAGCGCTGTATATTACTGTGGA GAGACGCCCTGAAAACCTGTGTGTGACTGCTATTCCACGTCCTTTGATTTTGGGGC CAGGGCACCTGGTACCCTCTCTCG SEQ ID NO: 71
NI-308.12A3 V _K	TGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGCGAGAGGGC CACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTCTTTTATACACTGCCAACAATAGGAATCTCT TAGCCTGGTACCAGAAAAAGCAGGACAGCCTCCTAAGCTCCTCATTCACTGGGCATCT ACCCGGGCATCCGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGTCTGGGACAGATTTCAT TCTCACCATCAGCAGCCTGCGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTTTGTCAACATTATT ATAATTCTCCCGGACGTTCCGGCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 73
NI-308.12A3 V _H - PIMC	TGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGCTCCCTGAG ACTCTCCTGCGTAGGCTCTGGATTCTCTTCAGTGATTTTGAATGGACTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTCATATATTAGTGGTACGGTAATATCATA TATCAGACAGACTCTGTGAAGGGCGATTACCATCTCCAGAGCAACGCCAAGAAATTC ACTGTTTCTACAAATGGACAGCCTGACCGTCGAGGACAGCGCTGTATATTACTGTGGA GAGACGCCCTGAAAACCTGTGTGTGACTGCTATTCCACGTCCTTTGATTTTGGGGC CAGGGCACCTGGTACCCTCTCTCG SEQ ID NO: 75
NI-308.12A3 V _K - PIMC	TGCGACATCTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGCGAGAGGGC CACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTCTTTTATACACTGCCAACAATAGGAATCTCT
	TAGCCTGGTACCAGAAAAAGCAGGACAGCCTCCTAAGCTCCTCATTCACTGGGCATCT ACCCGGGCATCCGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGTCTGGGACAGATTTCAT TCTCACCATCAGCAGCCTGCGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTTTGTCAACATTATT ATAATTCTCCCGGACGTTCCGGCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 77
NI-308.16C10 V _H	TGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGATGCTCCCTGAG CCTCTCCTGTGCAGCAGTACTGGATTACCTTCAGCAGTTATGGCATGCATGGGTCCGCC AAGGTCCAGGCAAGGGGCGGAGTGGTGGCGGGTATATGGTACGATGGAACAAATAG TATTATGGAGACTCCGTGACGGGACAGTACCATCTCCAGAGCAACTCCAAGAACAC GCTGTTTCTGCAATGATCAACGTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGGA AGGATGACAGCGGCTCCAGAAATGGGCTAGTTACATTATGGACGTGTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCTCG SEQ ID NO: 79
NI-308.16C10 V _K	TGCGAAATTGTGTGACTCAGTCTCCAGGCATCCTGTCTTTGTCTCGAGGGAATCGGGT CGCCTCTCCTCGAGGGCCAGTCGGAGTGTAAATAGCAGTACTTAAATTGGTACAGC AAAAACAGGCGCAGGCTCCAGACTCCTCATCTATGGTGATCTAAAAGGGCCACTGGC ATCTCAGACAGGTTCGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCGTCGCCAG ACTGGAGCCTGAAGATATTCCGGTTTACTACTGTACGACATATGTGCTTCCGGCCAAG GGACCAAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 81
NI-308.16C10 V _H - PIMC	TGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGATGCTCCCTGAG CCTCTCCTGTGCAGCAGTACTGGATTACCTTCAGCAGTTATGGCATGCATGGGTCCGCC AAGGTCCAGGCAAGGGGCGGAGTGGTGGCGGGTATATGGTACGATGGAACAAATAG TATTATGGAGACTCCGTGACGGGACAGTACCATCTCCAGAGCAACTCCAAGAACAC GCTGTTTCTGCAAAATGATCAACGTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGGA AGGATGACAGCGGCTCCAGAAATGGGCTAGTTACATTATGGACGTGTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCTCG SEQ ID NO: 83
NI-308.16C10 V _K - PIMC	TGCGAAATTGTGTGACGAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCGAGGGAATCGGGT CGCCTCTCCTCGAGGGCCAGTCGGAGTGTAAATAGCAGTACTTAAATTGGTACAGC AAAAACAGGCGCAGGCTCCAGACTCCTCATCTATGGTGATCTAAAAGGGCCACTGGC ATCTCAGACAGGTTCGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCGTCGCCAG ACTGGAGCCTGAAGATATTCCGGTTTACTACTGTACGACATATGTGCTTCCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 85

В область настоящего изобретения также включены фрагменты полинуклеотидов согласно настоящему изобретению, описанные в настоящем документе. В область настоящего изобретения также дополнительно включены полинуклеотиды, которые кодируют гибридные полинуклеотиды, фрагменты Fab и другие биотехнологические производные, описанные выше.

Полинуклеотиды могут быть получены или изготовлены любым способом, известным в данной области техники. Например, если нуклеотидная последовательность антитела известна, то полинуклеотид,

кодирующий антитело, может быть собран из химически синтезированных олигонуклеотидов, например, как описано в Kutmeier et al., *BioTechniques* 17 (1994), 242, в общих чертах, указанный способ включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование полученных олигонуклеотидов, а затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов с помощью ПЦР.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, может быть получен из нуклеиновой кислоты из подходящего источника. Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, не доступен, но известна последовательность молекулы антитела, то нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, может быть химически синтезирована или получена из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антитела или библиотеки кДНК, полученной из нуклеиновой кислоты, предпочтительно полиА+РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих DPR-специфичное антитело, таких как клетки гибридомы, выбранные для экспрессии антитела) с помощью ПЦР-амплификации с использованием синтетических праймеров, которые гибридизуются с 3'- и 5'-концами последовательности или путем клонирования с использованием олигонуклеотидного зонда, специфичного в отношении последовательности конкретного гена, который подлежит идентификации, например клона кДНК из библиотеки кДНК, кодирующей антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные с помощью ПЦР, могут быть затем клонированы в реплицируемые векторы для клонирования с использованием любого способа, хорошо известного в данной области техники.

После определения нуклеотидной последовательности и соответствующей аминокислотной последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, его нуклеотидную последовательность можно подвергать манипуляциям с помощью способов, хорошо известных в данной области техники для манипулирования нуклеотидными последовательностями, например, методик рекомбинантных ДНК, сайт-направленного мутагенеза, ПЦР и т.д. (см., например, методы, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) и Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, NY (1998), оба руководства полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки), чтобы получить антитела, содержащие различные аминокислотные последовательности, например, чтобы создать замены, делеции и/или вставки аминокислот.

IV. Экспрессия полипептидов антител.

После проведения манипуляций с выделенным генетическим материалом, чтобы получить антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению, полинуклеотиды, кодирующие антитела, как правило, вставляют в вектор экспрессии для введения в клетки-хозяева, которые можно применять для получения желаемого количества антител. Рекомбинантная экспрессия антитела или его фрагмента, производного или аналога, например тяжелой или легкой цепей антитела, которое связывается с молекулой-мишенью, описана в настоящем документе. После получения полинуклеотида, кодирующего молекулу антитела или тяжелую или легкую цепь антитела или часть молекулы (предпочтительно содержащую вариабельную область тяжелой или легкой цепи) согласно настоящему изобретению, вектор для получения молекулы антитела может быть получен с помощью технологии рекомбинантных ДНК с использованием методик, хорошо известных в данной области техники. Следовательно, способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описаны в настоящем документе. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, можно применять для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие антитела и соответствующие сигналы для контроля транскрипции и трансляции. Указанные способы включают, например, методики рекомбинантных ДНК в условиях *in vitro*, синтетические методики и генетическую рекомбинацию в условиях *in vivo*. В настоящем изобретении, следовательно, предложены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела согласно настоящему изобретению или ее тяжелую цепь или легкую цепь, или вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи, функционально связанную с промотором. Указанные векторы могут содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, международные заявки WO 86/05807 и WO 89/01036 и патент США № 5122464), и вариабельная область антитела может быть клонирована в указанный вектор для экспрессии полноразмерной тяжелой цепи или легкой цепи.

В настоящей заявке термин "вектор" или "вектор экспрессии" используется для обозначения векторов, используемых в соответствии с настоящим изобретением в качестве носителя для введения и экспрессии желаемого гена в клетке-хозяине. Как известно специалистам в данной области техники, указанные векторы могут быть легко выбраны из группы, состоящей из плазмид, фагов, вирусов и ретровирусов. В целом векторы, подходящие в соответствии с настоящим изобретением, будут содержать селективный маркер, соответствующие сайты рестрикции для облегчения клонирования желаемого гена и возможности ввода и/или репликации в эукариотических или прокариотических клетках. Для целей настоящего изобретения можно применять многочисленные векторные системы экспрессии. Например, в

одном классе векторов применяют элементы ДНК, которые получены из вирусов животных, таких как бычий вирус папилломы, вирус полиомы, аденовирус, вирус коревой оспы, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV) или вирус SV40. Другие классы векторов основаны на применении полицистронных систем с внутренними сайтами связывания рибосом. Помимо этого клетки, которые интегрировали ДНК в свои хромосомы, могут быть выбраны путем введения одного или более маркеров, которые позволяют отбирать трансфицированные клетки-хозяева. Маркер может обеспечить прототрофию ауксотрофному хозяину, резистентность к биоцидным агентам (например, антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Ген селективного маркера может быть непосредственно связан с последовательностями ДНК, которые будут экспрессированы, или введен в ту же клетку путем совместной трансформации. Для оптимального синтеза мРНК также могут быть необходимы дополнительные элементы. Подходящие элементы могут включать сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, а также транскрипционные промоторы, энхансеры и сигналы терминации.

В особенно предпочтительных вариантах реализации клонированные гены переменных областей встроены в вектор экспрессии вместе с генами константных областей тяжелой и легкой цепей (предпочтительно человека), как обсуждалось выше. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения введение клонированных генов осуществляют с помощью запатентованного вектора экспрессии, доступного у Biogen IDEC, Inc., называемого NEOSPLA, и раскрытого в патенте США № 6159730. Указанный вектор содержит промотор/энхансер цитомегаловируса, главный промотор бета-глобина мыши, сайт начала репликации SV40, последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста, экзон 1 и экзон 2 неомидифосфотрансферазы, ген дигидрофолатредуктазы и лидерную последовательность. Было обнаружено, что указанный вектор позволяет получить очень высокий уровень экспрессии антител при встраивании генов переменной и константной областей с последующей трансфекцией в клетках CHO, селекцией в среде, содержащей G418, и амплификацией под действием метотрексата. Очевидно, что любой вектор экспрессии, который способен индуцировать экспрессию в эукариотических клетках, может быть использован в настоящем изобретении. Примеры подходящих векторов включают, но не ограничиваются ими, плазмиды pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 и pZeoSV2 (доступные от Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния, США) и плазмиду pCI (доступную от Promega, Мэдисон, Висконсин, США). В целом скрининг большого количества трансформированных клеток для отбора тех клеток, которые экспрессируют подходящие высокие уровни тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, является стандартным экспериментальным способом, который можно осуществлять, например, с помощью роботизированных систем. Векторные системы также раскрыты в патентах США №№ 5736137 и 5658570, каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Указанная система обеспечивает высокие уровни экспрессии, например, >30 пг/клетку/сутки. Другие примеры векторных систем описаны, например, в патенте США № 6413777.

В других предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть экспрессированы с помощью полицистронных конструкций, таких как те, которые описаны в публикации заявки на патент США № 2003-0157641 A1 и полностью включены в настоящий документ. В указанных системах экспрессии несколько генных продуктов, представляющих интерес, таких как тяжелые и легкие цепи антител, могут быть получены из одной полицистронной конструкции. В указанных системах предпочтительно применяют сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), чтобы обеспечить относительно высокие уровни антител. Совместимые последовательности IRES описаны в патенте США № 6193980, который также включен в настоящий документ. Специалисты в данной области техники поймут, что указанные системы экспрессии можно применять для эффективного получения полного спектра антител, описанных в настоящей заявке. Следовательно, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий, по меньшей мере, связывающий домен или переменную область цепи иммуноглобулина антитела, необязательно в комбинации с полинуклеотидом, который кодирует переменную область другой цепи иммуноглобулина указанной связывающей молекулы.

В более общем смысле, после получения вектора или последовательности ДНК, кодирующей мономерную субъединицу антитела, вектор экспрессии может быть введен в соответствующую клетку-хозяина. Введение плазмиды в клетку-хозяина можно осуществлять с помощью различных методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Подходящие методики включают, но не ограничиваются ими, трансфекцию, включая липофекцию, с использованием, например, Fugene® или липофектамина®, слияние протопластов, осаждение фосфатом кальция, слияние клеток с упакованной ДНК, микроинъекции и инфицирование интактным вирусом. Как правило, введение плазмиды в хозяина осуществляют с помощью стандартного способа совместного осаждения с фосфатом кальция. Клетки-хозяева, несущие конструкцию для экспрессии, размножают в условиях, подходящих для получения легких цепей и тяжелых цепей и количественно исследуют для оценки синтеза белка тяжелой и/или легкой цепей. Типичные методики количественных исследований включают твердофазный иммуноферментный

анализ (ИФА), радиоиммунный анализ (РИА) или сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), иммуногистохимические способы и т.п.

Вектор экспрессии переносят в клетку-хозяина с помощью стандартных методик, и трансфицированные клетки затем культивируют с помощью стандартных методик, чтобы получить антитела для применения в способах, описанных в настоящем документе. Следовательно, в область настоящего изобретения включены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело согласно настоящему изобретению или его тяжелую цепь или легкую цепь, или по меньшей мере связывающий домен или вариабельную область иммуноглобулина, которые предпочтительно функционально связаны с гетерологичным промотором. Помимо этого или согласно другому варианту реализации в область настоящего изобретения также включены клетки-хозяева, содержащие вектор, определенный выше, содержащий полинуклеотид, кодирующий, по меньшей мере, связывающий домен или вариабельную область цепи иммуноглобулина антитела, необязательно в комбинации с полинуклеотидом, который кодирует вариабельную область другой цепи иммуноглобулина указанной связывающей молекулы. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения для экспрессии антител с двойной цепью отдельный вектор или векторы, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть совместно экспрессированы в клетке-хозяине для экспрессии полной молекулы иммуноглобулина, как описано ниже.

Клетка-хозяин может быть совместно трансфицирована двумя векторами экспрессии согласно настоящему изобретению, при этом первый вектор кодирует полипептид тяжелой цепи и второй вектор кодирует полипептид легкой цепи. Оба вектора могут содержать идентичные селективные маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепей. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения может быть использован один вектор, кодирующий полипептиды обеих тяжелой и легкой цепей. В таких случаях легкую цепь предпочтительно помещают перед тяжелой цепью, чтобы избежать избытка токсичной свободной тяжелой цепи; см. Proudfoot, *Nature* 322 (1986), 52; Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), 2197. Кодирующие последовательности для тяжелых и легких цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК.

В настоящей заявке термин "клетки-хозяева" относится к клеткам, которые несут векторы, сконструированные с использованием технологий рекомбинантных ДНК и кодирующие по меньшей мере один гетерологичный ген. В описаниях способов выделения антител из рекомбинантных хозяев термины "клетка" и "культура клеток" используются взаимозаменяемо для обозначения источника антитела, если явно не указано иное. Другими словами, выделение полипептида из "клеток" может означать выделение из центрифугированных целых клеток или из клеточной культуры, содержащей среду и суспендированные клетки.

Различные системы вектор экспрессии-хозяин можно применять для экспрессии молекул антител для применения в способах, описанных в настоящей заявке. Подходящие системы вектор экспрессии-хозяин представляют носители, с помощью которых кодирующие последовательности, представляющие интерес, могут быть получены и впоследствии очищены, но также представляют клетки, которые могут, если они трансформированы или трансфицированы соответствующими кодирующими нуклеотидными последовательностями, экспрессировать молекулу антитела согласно настоящему изобретению в условиях *in situ*. Подходящие системы включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), трансформированные рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или векторами экспрессии на основе космидной ДНК, содержащими кодирующие антитело последовательности; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии в дрожжах, содержащими кодирующие антитела последовательности; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом), содержащими последовательности, кодирующие антитела; системы растительных клеток, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, ВТМ) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, Ti-плазмидой), содержащими последовательности, кодирующие антитела; или системы клеток млекопитающих (например, клетки линий COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3), несущие рекомбинантные конструкции для экспрессии, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина) или из вирусов млекопитающих (например, промотор поздних генов аденовируса и промотор вируса оспы-вакцины 7.5K). Предпочтительно для экспрессии рекомбинантной молекулы антитела используют бактериальные клетки, такие как *E. coli*, и более предпочтительно эукариотические клетки, в частности для экспрессии полноразмерной молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO) в комбинации с вектором, таким как основной ранний промоторный элемент генов промежуточных факторов транскрипции цитомегаловируса человека, являются эффективной системой экспрессии антител; см., например, Foecking et al., *Gene* 45 (1986), 101; Cockett et al., *Bio/Technology* 8 (1990), 2.

Линия клеток-хозяев, используемая для экспрессии белка, часто представляет собой клетки млекопитающих; специалисты в данной области техники могут предпочтительно определить конкретные линии клеток-хозяев, которые наилучшим образом подходят для экспрессии в них желаемого продукта ге-

на. Типичные линии клеток-хозяев включают, но не ограничиваются ими, CHO (клетки яичника китайского хомяка), DG44 и DUXB11 (линии клеток яичника китайского хомяка, DHFR⁺), HeLa (клетки карциномы шейки матки человека), CV1 (линия клеток почки обезьяны), COS (производная линия CV1, несущая Т-антиген SV40), VERY, BHK (клетки почки новорожденного хомяка), MDCK, WI38, R1610 (фибробласты китайского хомяка), BALBC/3T3 (фибробласты мыши), HAK (линия клеток почки хомяка), SP2/0 (клетки миеломы мыши), P3×63-Ag3.653 (клетки миеломы мыши), BFA-1c1BPT (бычий эндотелиальные клетки), RAJI (лимфоциты человека) и 293 (клетки почки человека). Клетки линий CHO и 293 являются особенно предпочтительными. Линии клеток-хозяев, как правило, доступны коммерчески из Американской коллекции типовых культур или опубликованной литературы.

Помимо этого может быть выбран штамм клеток-хозяев, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и подвергает процессингу генный продукт желаемым способом. Указанные модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важными для функции белка. Различные клетки-хозяева имеют характерные и специфичные механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Соответствующие клеточные линии или системы клеток-хозяев могут быть выбраны так, чтобы обеспечить правильную модификацию и процессинг экспрессированного чужеродного белка. С этой целью можно применять эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным молекулярным аппаратом для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта.

Для длительного высокопроизводительного получения рекомбинантных белков предпочтительной является стабильная экспрессия. Например, могут быть сконструированы клеточные линии, которые стабильно экспрессируют молекулы антител. Вместо использования векторов экспрессии, содержащих точки начала репликации вирусов, клетки-хозяева могут быть трансформированы ДНК, которая контролируется соответствующими элементами для управления экспрессией (например, промотором, энхансером, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.д.), и селективным маркером. После введения чужеродной ДНК модифицированные клетки можно культивировать в течение 1-2 дней в обогащенной среде и затем продолжить культивирование в селективных средах. Селективный маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к отбору и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в свои хромосомы и размножаться с образованием очагов, которые, в свою очередь, могут быть клонированы и размножены с получением клеточных линий. Указанный способ может быть успешно использован для конструирования линий клеток, которые стабильно экспрессируют молекулу антитела.

Может быть использован ряд систем отбора, включая, но не ограничиваясь ими, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., Cell 11 (1977), 223), гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (Szybalska and Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1992), 202), аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy et al., Cell 22 (1980), 817), которые можно применять в tk-, hprt- или aprt-клетках соответственно. Помимо этого устойчивость к антиметаболитам можно применять в качестве основы для отбора следующих генов: dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 357; O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527); gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan and Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12 (1993), 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 (1993), 573-596; Mulligan, Science 260 (1993), 926-932 и Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62 (1993), 191-217; TIB TECH 11 (1993), 155-215); и hyg, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre et al., Gene 30 (1984), 147). Подходящие способы, обычно известные в области технологии рекомбинантных ДНК, описаны в Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990) и в главах 12 и 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley&Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981), которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Уровни экспрессии молекулы антитела можно повысить путем амплификации вектора, для обзора см. Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987). В том случае, если маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, может быть амплифицирован, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клеток-хозяев, будет увеличивать количество копий маркерного гена. Поскольку амплифицированный участок связан с геном антитела, количество вырабатываемых антител также повысится; см. Crouse et al, Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257.

Способы получения в условиях *in vitro* позволяют увеличивать масштабы производства с получением большого количества нужных полипептидов. Методики культивирования клеток млекопитающих в условиях поддержания культур тканей известны в данной области техники и включают однородную суспензионную культуру, например, в реакторе с аэролитом или в реакторе с непрерывным перемешиванием, или иммобилизованную или захваченную культуру клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микрогранулах или керамических картриджах. При необходимости и/или если желательно, растворы полипептидов могут быть очищены обычными хроматографическими способами,

например с помощью гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе или (иммуно-) аффинной хроматографии, например, после предпочтительного биосинтеза синтетической шарнирной области полипептида или перед или после этапов гидрофобной интерактивной хроматографии, описанной в настоящем документе.

Гены, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению, также можно экспрессировать в клетках, отличных от клеток млекопитающих, таких как бактерии или клетки насекомых, дрожжей или растений. Бактерии, которые легко поглощают нуклеиновые кислоты, включают членов семейства *Enterobacteriaceae*, таких как штаммы *E. coli* или *Salmonella*; *Bacillaceae*, таких как *B. subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* и *Haemophilus influenzae*. Следует также иметь в виду, что при экспрессии в бактериях гетерологичные полипептиды, как правило, становятся частью телец включения. Гетерологичные полипептиды должны быть выделены, очищены и затем собраны в функциональные молекулы. В тех случаях, когда желательными являются теравалентные формы антител, субъединицы самостоятельно собираются в четырехвалентные антитела; см., например, международную заявку WO 02/096948.

В бактериальных системах ряд векторов экспрессии может быть преимущественно выбран в зависимости от предполагаемого способа применения экспрессируемой молекулы антитела. Например, в том случае, если для создания фармацевтических композиций молекулы антитела необходимо получить большое количество указанного белка, желательными могут быть векторы, которые направляют экспрессию высоких уровней гибридных белковых продуктов, которые могут быть легко очищены. Указанные векторы включают, но не ограничиваются ими, вектор экспрессии *E. coli* pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2 (1983), 1791), в котором последовательность, кодирующая антитело, может быть индивидуально лигирована в одной открытой рамке считывания с областью, кодирующей LacZ, с получением гибридного белка; векторы pIN (Inouye and Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke and Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509) и т.п. Векторы pGEX также можно применять для экспрессии чужеродных полипептидов в виде гибридных белков с глутатион-S-трансферазой (GST). В целом указанные гибридные белки являются растворимыми и могут быть легко очищены из лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матриксом гранул глутатион-агароза с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX сконструированы для включения сайтов расщепления для протеаз тромбина или фактора Ха так, чтобы клонированный продукт гена-мишени мог быть отщеплен от GST части.

Помимо клеток прокариот также могут быть использованы эукариотические микроорганизмы. *Saccharomyces cerevisiae* или обычные пекарские дрожжи являются наиболее часто используемыми среди эукариотических микроорганизмов, также обычно доступен ряд других штаммов, например *Pichia pastoris*. Для экспрессии в *Saccharomyces* обычно применяют плазмиду YRp7, например Stinchcomb et al., Nature 282 (1979), 39; Kingsman et al., Gene 7 (1979), 141; Tschemper et al., Gene 10 (1980), 157. Указанная плазида уже содержит ген TRP1, который обеспечивает селективный маркер для мутированного штамма дрожжей, лишенного способности размножаться в присутствии триптофана, например ATCC 44076 или PEP4-1 (Jones, Genetics 85 (1977), 12). Присутствие повреждения *trp1*, как отличительной черты генома дрожжевых клеток-хозяев, затем обеспечивает эффективную среду для детектирования трансформации на основании размножения в отсутствие триптофана.

В системе экспрессии в клетках насекомых в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов, как правило, используют вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV). Вирус размножается в клетках *Spodoptera frugiperda*. Последовательность, кодирующая антитело, может быть клонирована индивидуально в несущественные области (например, гена полиэдрина) вируса и помещена под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина).

После рекомбинантной экспрессии молекулы антитела согласно настоящему изобретению полно-размерные антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи или другие формы иммуноглобулина согласно настоящему изобретению могут быть очищены в соответствии со стандартными методиками, известными в данной области техники, включая, например, хроматографию (например, ионообменную, аффинную, в частности, на основании аффинности в отношении конкретного антигена после очистки на белке А, и эксклюзионную хроматографию на колонке), центрифугирование, дифференциальную растворимость, например осаждение сульфатом аммония, или любую другую стандартную методику очистки белков; см., например, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). Согласно другому варианту реализации предпочтительный способ увеличения аффинности антител согласно настоящему изобретению раскрыт в публикации патента США 2002-0123057 A1. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, следовательно, в настоящем изобретении также предложен способ получения антитела к DPR или антитела, распознающего мутированные и/или агрегированные молекулы C9ORF72-DPR и/или их фрагменты или цепи (цепи) иммуноглобулина, причем указанный способ включает:

- a) культивирование клетки-хозяина, определенной выше, причем указанная клетка содержит полинуклеотид или вектор, определенный выше; и
- b) выделение указанного антитела или цепи(цепей) иммуноглобулина из культуры.

Помимо этого в настоящем изобретении также предложено антитело или цепь(и) указанного иммуноглобулина, кодируемого полинуклеотидом, определенным выше, или полинуклеотидом, который может быть получен с помощью указанного способа для получения антитела к DPR или антитела, распознающего мутированные и/или агрегированные молекулы C9ORF72-DPR, и/или их фрагменты, или цепи(цепей) иммуноглобулина.

V. Гибридные белки и конъюгаты.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид антитела содержит аминокислотную последовательность или один или более фрагментов, которые обычно не связаны с антителом. Примеры модификаций описаны ниже более подробно. Например, одноцепочечный фрагмент Fv антитела согласно настоящему изобретению может содержать гибкую линкерную последовательность или может быть модифицирован для включения функционального фрагмента (например, ПЭГ, лекарственного препарата, токсина или метки, такой как флуоресцентная, радиоактивная, ферментная метка, метка для ЯМР, тяжелого металла и т.п.).

Полипептид антитела согласно настоящему изобретению может содержать, состоять по существу или состоять из гибридного белка. Гибридные белки представляют собой химерные молекулы, которые содержат, например, DPR-связывающий домен иммуноглобулина по меньшей мере с одним целевым сайтом связывания и по меньшей мере один гетерологичный участок, т.е. участок, с которым домен не связан в природных условиях. Аминокислотные последовательности обычно могут существовать в отдельных белках, которые объединены в гибридном полипептиде, или они могут присутствовать в одном и том же белке в природных условиях, но находятся в другом положении в гибридном полипептиде. Гибридные белки могут быть созданы, например, путем химического синтеза или путем создания и трансляции полинуклеотида, в котором пептидные области кодируются в желаемых соотношениях.

Термин "гетерологичный" применительно к полинуклеотиду или полипептиду означает, что полинуклеотид или полипептид получен из фрагмента, отличного от такового остальной части молекулы, с которой его сравнивают. Например, в настоящей заявке "гетерологичный полипептид", который будет гибридизован с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, вариантом или аналогом, получен из полипептида, не являющегося иммуноглобулином, из того же самого вида, или получен из иммуноглобулина или полипептида, не являющегося иммуноглобулином, другого вида.

Как рассмотрено более подробно в настоящем документе, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть дополнительно рекомбинантно гибридизованы с гетерологичным полипептидом на N- или C-конце или химически конъюгированы (включая ковалентные и нековалентные конъюгации) с полипептидами или другими композициями. Например, антитела могут быть рекомбинантно гибридизованы или конъюгированы с молекулами, пригодными в качестве меток в количественных исследованиях с детектированием меток, и эффекторными молекулами, такими как гетерологичные полипептиды, лекарственные препараты, радионуклиды или токсины; см., например, международные заявки WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; патент США № 5314995 и заявку на патент ЕС EP 0396387.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут состоять из аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями или модифицированными пептидными связями, т.е. пептидных изостер, и могут содержать аминокислоты, отличные от 20 аминокислот, кодируемых генами. Антитела могут быть модифицированы в результате природных процессов, таких как посттрансляционные модификации, или с помощью химических методов модификации, которые хорошо известны в данной области техники. Указанные модификации подробно описаны в основных руководствах и в более подробных монографиях, а также в многочисленной научной литературе. Модификации могут возникнуть в любом месте в антителе, включая пептидный остов, боковые цепи аминокислот и амино- или карбоксильные концы, или на фрагментах, таких как углеводы. Следует иметь в виду, что один и тот же тип модификации может присутствовать в одной и той же или в различной степени в нескольких участках в конкретном антителе. Помимо этого конкретное антитело может содержать много типов модификаций. Антитела могут быть разветвленными, например, в результате убиквитинирования, и они могут быть циклическими, с разветвлениями или без них. Циклические, разветвленные и разветвленные циклические антитела могут быть получены в результате посттрансляционных природных процессов или могут быть получены синтетическими способами. Модификации включают ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование, протеолитическое расщепление, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, tPHK-опосредованное добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование и убиквитинирование; см., например, *Proteins -Structure And Molecular Properties*, T.E. Creighton, W.H. Freeman

and Company, New York 2nd Ed., (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, (1983) 1-12; Seifter et al., Meth. Enzymol. 182 (1990), 626-646; Rattan et al., Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992), 48-62).

В настоящем изобретении также предложены гибридные белки, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, и гетерологичный полипептид. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок согласно настоящему изобретению содержит, состоит по существу или состоит из полипептида, содержащего аминокислотную последовательность любой одной или более из областей V_H антитела согласно настоящему изобретению или аминокислотную последовательность любой одной или более из областей V_L антитела согласно настоящему изобретению или его фрагментов или вариантов, и гетерологичной полипептидной последовательности. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок для применения в диагностических и терапевтических способах, описанных в настоящем документе, содержит, состоит по существу или состоит из полипептида, содержащего аминокислотную последовательность любого одного, двух, трех из V_H -CDR антитела или его фрагментов, вариантов или производных, или аминокислотную последовательность любого одного, двух, трех из V_L -CDR антитела или его фрагментов, вариантов или производных, и гетерологичной полипептидной последовательности. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность V_H -CDR3 антитела согласно настоящему изобретению или его фрагмента, производного или варианта, и гетерологичную полипептидную последовательность, при этом указанный гибридный белок специфично связывается с DPR-белками или пептидами. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере одной области V_H антитела согласно настоящему изобретению и аминокислотную последовательность по меньшей мере одной области V_L антитела согласно настоящему изобретению или его фрагментов, производных или вариантов, и гетерологичную полипептидную последовательность. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения области V_H и V_L гибридного белка соответствуют одному исходному антителу (или фрагменту scFv или Fab), которое специфично связывается с DPR. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок для применения в диагностических и терапевтических способах, описанных в настоящем документе, содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность любого одного, двух, трех или более из CDR V_H антитела и аминокислотную последовательность любого одного, двух, трех или более из CDR V_L антитела или его фрагментов или вариантов, и гетерологичную полипептидную последовательность. Предпочтительно два, три, четыре, пять, шесть или более из V_H -CDR или V_L -CDR соответствуют одному исходному антителу (или фрагменту scFv или Fab) согласно настоящему изобретению. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие указанные гибридные белки, также включены в область настоящего изобретения.

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

Как описано в настоящем документе, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть гибридизованы с гетерологичными полипептидами, чтобы увеличить период полувыведения полипептидов в условиях *in vivo* или для применения в иммунологических количественных исследованиях с использованием способов, известных в данной области техники. Например, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ПЭГ может быть конъюгирован с антителами согласно настоящему изобретению для увеличения периода их полувыведения в условиях *in vivo*, см., например, Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531 или Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

Помимо этого антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, синтетические варианты или биотехнологические производные согласно настоящему изобретению могут быть гибридизованы с маркерными последовательностями, такими как пептид, чтобы облегчить их очистку или детектирование. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения маркерная аминокислотная последовательность представляет собой пептид гексагистидина (HIS), такой как метка, обеспеченная в векторе pQE (Qiagen, Inc., 9259 Итон Авеню, Чатсворт, Калифорния, США, 91311), помимо всех прочих, многие из которых являются коммерчески доступными. Как описано в Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824, например, гексагистидин обеспечивает удобную очистку гибридного белка. Другие пептидные метки, пригодные для очистки, включают, но не ограничиваются ими, метку "НА", которая соот-

ветствует эпитопу, полученному из белка гемагглютинина вируса гриппа (Wilson et al., Cell 37 (1984), 767), GST, с-тус и метку "FLAG"; см., например, работу Bill Brizzard, BioTechniques 44 (2008) 693-695 для обзора методик включения эпитопных меток и табл. 1 на с. 694 там же, где перечислены наиболее распространенные эпитопные метки, пригодные согласно настоящему изобретению, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Гибридные белки могут быть получены с использованием способов, которые хорошо известны в данной области техники; см., например, патенты США №№ 5116964 и 5225538. Точный сайт, в котором происходит гибридизация, может быть выбран опытным путем для оптимизации секреции или характеристик связывания гибридного белка. Клетку-хозяина затем трансфецируют ДНК, кодирующей гибридный белок, для экспрессии, используя способы, описанные выше в настоящем изобретении.

Антитела согласно настоящему изобретению можно применять в конъюгированной форме или они могут быть конъюгированы по меньшей мере с одной из множества молекул, например, чтобы улучшить терапевтические свойства молекулы, облегчить детектирование мишени или для целей визуализации или лечения пациента. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть помечены или конъюгированы перед или после очистки в тех случаях, когда проводят очистку. В частности, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть конъюгированы с терапевтическими агентами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа, фармацевтическими агентами или ПЭГ.

Конъюгаты, которые представляют собой иммунотоксины, включая обычные антитела, были широко описаны в данной области техники. Токсины могут быть присоединены к антителам с помощью обычных методик присоединения, или иммунотоксины, содержащие части белковых токсинов, могут быть получены в виде гибридных белков. Антитела согласно настоящему изобретению можно применять соответствующим образом, чтобы получить указанные иммунотоксины. Примеры подходящих иммунотоксинов включают те, которые описаны Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 и Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

Специалисты в данной области техники поймут, что конъюгаты также могут быть собраны с использованием разнообразных методик в зависимости от выбранного агента, подлежащего конъюгации. Например, конъюгаты с биотином получают, например, путем взаимодействия DPR-связывающего полипептида с активированным эфиром биотина, таким как N-гидроксисукцинимидный эфир биотина. Аналогичным образом, конъюгаты с флуоресцентным маркером могут быть получены в присутствии связывающего агента, например, тех, которые перечислены в настоящем документе, или путем реакции с изотиоцианатом, предпочтительно флуоресцеинизотиоцианатом. Конъюгаты антител или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению получают аналогичным способом.

В область настоящего изобретения дополнительно включены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению, конъюгированные с диагностическим или терапевтическим агентом. Антитела можно применять для диагностических целей, например для выявления присутствия DPR, чтобы указать на риск развития заболевания или расстройства, связанного с DPR, предпочтительно связанного с мутированным C9ORF72, образующим DPR, т.е. C9ORF72-DPR, для мониторинга развития или прогрессирования указанного заболевания, т.е. заболевания, вызванного присутствием DPR или связанного с агрегированными DPR, или в качестве части клинической процедуры тестирования, например, чтобы определить эффективность данного способа лечения и/или профилактики. Согласно одному варианту реализации, следовательно, в настоящем изобретении предложено антитело, содержащее детектируемую метку. Помимо этого согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложено антитело, которое прикреплено к лекарственному препарату. Детектирование может быть облегчено путем присоединения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного к детектируемому веществу. Детектируемые вещества или метки обычно представляют собой фермент; тяжелый металл, предпочтительно золото; краситель, предпочтительно флуоресцентный или люминесцентный краситель; или радиоактивную метку. Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные материалы, испускающие позитроны металлы с использованием различных типов томографии и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов; см., например, патент США № 4741900, в котором описаны ионы металлов, которые могут быть конъюгированы с антителами, для применения в качестве диагностических средств в соответствии с настоящим изобретением. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортрианилином флуоресцеина, дансил хлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного материала включает люминол; примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин и экворин; и примеры подходящих радиоактивных материалов включают I^{125} , I^{131} , In^{111} или Tc^{99} . Следовательно,

согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложено детектируемо меченое антитело, в котором детектируемая метка выбрана из группы, состоящей из фермента, радиоактивного изотопа, флуорофора и тяжелого металла.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное также могут быть помечены детектируемой меткой путем связывания с хемилюминесцентным соединением. Присутствие хемилюминесцентно-меченого антитела затем определяют путем детектирования люминесценции, которая возникает в процессе химической реакции. Примеры особенно подходящих соединений для включения хемилюминесцентной метки включают люминол, изолюминол, тероматический сложный эфир акридина, имидазол, соль акридина и эфир щавелевой кислоты.

Один из способов введения детектируемых меток в антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное включает связывание с ферментом и использование связанного продукта в иммуноферментном анализе (ИФА) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, et al., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kigaku Shoin, Tokyo (1981). Фермент, который связан с антителом, будет вступать в реакцию с соответствующим субстратом, предпочтительно хромогенным субстратом, так, чтобы образовался химический радикал, который можно детектировать, например, спектрофотометрическим, флуориметрическим способом или визуально. Ферменты, которые можно применять для детектируемого мечения антител, включают, но не ограничиваются ими, малатдегидрогеназу, нуклеазу стафилококков, дельта⁵-стероидизомеразу, алкогольдегидрогеназу дрожжей, альфа-глицерофосфатдегидрогеназу, триозофосфатизомеразу, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, аспарагиназу, глюкозооксидазу, бета-галактозидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, глюкоамилазы и ацетилхолинэстеразы. Помимо этого детектирование может быть достигнуто с помощью колориметрических способов, в которых применяют хромогенный субстрат для фермента. Детектирование также может быть достигнуто путем визуального сравнения степени ферментативной реакции субстрата с таковой для стандартов, полученных аналогичным способом.

Детектирование также можно осуществлять с использованием любого из множества других иммунологических количественных способов. Например, с помощью радиоактивного мечения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного антитело можно детектировать методом радиоиммуноанализа (РИА) (см., например, работы Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (March, 1986)), которая включена в настоящую заявку посредством ссылки). Радиоактивный изотоп можно детектировать с помощью, но не ограничиваясь ими, гамма-счетчика, сцинтилляционного счетчика или автордиографии.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное можно также пометить детектируемой меткой с использованием металлов, испускающих флуоресценцию, таких как Eu¹⁵² или других лантаноидов. Указанные металлы могут быть присоединены к антителу с использованием таких хелатирующих металл групп, как диэтилтриаминпентауксусная кислота (ДТПА) или этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА).

Методики конъюгации различных фрагментов с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, вариантом или производным хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", в Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1987) 623-53; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), (1985) 475-506; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press (1985) 303-16 и Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62 (1982), 119-158.

Как уже упоминалось, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагмент, который повышает стабильность или эффективность связывающей молекулы, например связывающего полипептида, например антитела или его иммуноспецифичного фрагмента, может быть конъюгирован. Например, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ПЭГ может быть конъюгирован со связывающими молекулами согласно настоящему изобретению для увеличения их периода полувыведения в условиях *in vivo*. Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531 или Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

VI. Композиции и способы применения.

В настоящем изобретении предложены композиции, содержащие вышеуказанную DPR-связывающую молекулу согласно настоящему изобретению, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или биотехнологическое производное, или полинуклеотид, вектор или клетку согласно настоящему изобретению, как определено выше. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиция согласно настоящему изобретению представляет собой фармацевти-

ческую композицию и дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. Помимо этого фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать дополнительные агенты, такие как интерлейкины или интерфероны, в зависимости от предполагаемого способа применения фармацевтической композиции. Для применения в лечении заболевания или расстройства, вызванного присутствием DPR или связанного с агрегированными DPR, в частности C9ORF72-DPR, такого как FTLT, дополнительный агент может быть выбран из группы, состоящей из небольших органических молекул, антител к DPR, а также их комбинаций. Следовательно, в особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено применение DPR-связывающей молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению или связывающей молекулы, специфичность связывания которой по существу аналогична специфичности связывания любого из указанных антител, полинуклеотида, вектора или клетки согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической или диагностической композиции для профилактического и терапевтического лечения заболевания или расстройства, связанного с DPR-белками, контроля прогрессирования заболевания или расстройства, связанного с DPR-белком и/или агрегированным C9ORF72, или ответа на лечение DPR у субъекта или для определения риска развития заболевания или расстройства, связанного с DPR-белком и/или агрегированным C9ORF72-DPR, у субъекта.

Следовательно, согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ лечения заболевания или расстройства, характеризующегося аномальным накоплением и/или осаждением DPR и DPR-белков, таких как агрегированный C9ORF72, обусловленный C9ORF72-DPR, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества любой из описанных выше DPR-связывающих молекул, антител, полинуклеотидов, векторов или клеток согласно настоящему изобретению.

Конкретное преимущество терапевтического подхода согласно настоящему изобретению заключается в том, что рекомбинантные антитела согласно настоящему изобретению получены из В-клеток или В-клеток памяти здоровых субъектов-людей, не имеющих признаков или симптомов заболевания, например, несущих бессимптомную мутацию и/или мутации, которые приводят к возникновению или связанные с агрегированным DPR, и, следовательно, с некоторой вероятностью, способны предотвратить клиническое проявление заболевания, связанного с DPR, например мутированным C9ORF72 с удлинёнными гексануклеотидными повторами, приводящими к образованию дипептидных повторов (DPR) в белке C9ORF72, агрегированным C9ORF72, вследствие накопления C9ORF72-DPR, или снижать риск возникновения клинически выраженного заболевания или расстройства, или задерживать начало развития или прогрессирования клинически выраженного заболевания или расстройства. Как правило, антитела согласно настоящему изобретению также успешно прошли соматическое созревание, т.е. оптимизацию в отношении селективности и эффективности высокоаффинного связывания с молекулой-мишенью DPR посредством соматического изменения переменных областей антитела.

Понимание того, что указанные клетки в условиях *in vivo*, например, в организме человека, не были активированы с помощью родственных или других физиологических белков или клеточных структур в отношении аутоиммунной или аллергической реакции, также имеет большое медицинское значение, поскольку это означает существенно увеличенный шанс успешного прохождения фаз клинических исследований. Иными словами, эффективность, приемлемость и переносимость уже были показаны перед доклинической и клинической разработкой профилактического или терапевтического антитела по меньшей мере у одного человека-субъекта. Следовательно, можно ожидать, что происходящие от человека антитела к DPR согласно настоящему изобретению, их высокая аффинность в отношении структуры-мишени в качестве терапевтического агента и сниженная вероятность побочных эффектов существенно повышают клиническую вероятность успеха указанных антител.

В настоящем изобретении также предложен фармацевтический и диагностический соответственно комплект или набор, включающий один или более контейнеров, наполненных одним или более из описанных выше ингредиентов, например антителом к DPR, его связывающим фрагментом, биотехнологическим производным или вариантом, полинуклеотидом, вектором или клеткой согласно настоящему изобретению. Указанный контейнер(контейнеры) может поставляться с уведомлением в форме, предписанной правительственным органом, регулирующим получение, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, причем указанное уведомление свидетельствует об одобрении указанным органом изготовления, применения или продажи для применения у человека. Помимо этого или согласно другому варианту реализации настоящего изобретения набор содержит реагенты и/или инструкции для применения в соответствующих диагностических количественных исследованиях. Композиция, например набор согласно настоящему изобретению, несомненно, особенно подходит для оценки риска, диагностики, предотвращения и лечения заболевания или расстройства, которое сопровождается присутствием DPR, и, в частности, может быть использована для лечения заболеваний, как правило, характеризующихся присутствием DPR. В частности, композиция пригодна для лечения расстройств, которые связаны с агрегацией DPR, например, мутированного C9ORF72 с удлинёнными гексануклеотидными повторами, которые приводят к образованию агрегированного C9ORF72 вследствие накопления C9ORF72-DPR. Заболевания и/или расстройства, связанные с DPR, включают, но не ограничиваются

ими, лобно-височную долеую дегенерацию (FTLD), латеральный амиотрофический склероз (ALS), FTLD-ALS и/или спиноцеребеллярную атаксию типа 36.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть изготовлены в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники; см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как масляные/водные эмульсии, различные виды смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д. Композиции, содержащие указанные носители, могут быть изготовлены с использованием хорошо известных стандартных способов. Указанные фармацевтические композиции могут быть введены субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций можно осуществлять различными способами, например путем внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутримышечного, интраназального, местного или внутрикожного введения или доставки в спинной или головной мозг. Аэрозольные составы, такие как аэрозольные назальные составы, содержат очищенные водные или другие растворы активного агента с консервирующими агентами и изотоническими агентами. Указанные составы предпочтительно доводят до величины показателя pH и изотонического состояния, совместимого со слизистыми оболочками носа. Составы для ректального или вагинального введения могут быть обеспечены в виде суппозитория с подходящим носителем.

Схема введения будет определена лечащим врачом и клиническими факторами. Как известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение, которое вводят, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные препараты, которые вводят одновременно. Типичная доза может находиться, например, в диапазоне от 0,001 до 1000 мкг (или нуклеиновой кислоты для экспрессии или для ингибирования экспрессии в указанном диапазоне); однако в область настоящего изобретения включены дозы, которые ниже или выше указанного примерного диапазона, в частности, принимая во внимание вышеупомянутые факторы. Обычно доза может варьироваться, например, от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и более обычно от 0,01 до 5 мг/кг (например, 0,02, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 мг/кг и т.д.) массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или находиться в пределах 1-10 мг/кг, предпочтительно по меньшей мере 1 мг/кг. Дозы, величина которых находится в пределах вышеуказанных диапазонов, также включены в объем настоящего изобретения. Указанные дозы могут быть введены субъектам ежедневно, через день, еженедельно или в соответствии с любой другой схемой, определенной эмпирически. Типичная схема лечения включает введение в виде многократных доз в течение длительного периода времени, например по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные типичные схемы лечения включают введение один раз в каждые две недели или один раз в месяц или один раз каждые 3-6 месяцев. Типичные схемы дозирования включают 1-10 мг/кг или 15 мг/кг в течение последовательных дней, 30 мг/кг через день или 60 мг/кг в неделю. В некоторых способах два или более моноклональных антител с различной специфичностью связывания вводят одновременно, в этом случае доза каждого вводимого антитела находится в пределах указанных диапазонов. Прогресс можно контролировать с помощью периодической оценки. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примеры неводных растворителей включают пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевой раствор и буферные среды. Носители для парентерального введения включают раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или летучие масла. Носители для внутривенного введения включают жидкие и питательные восполнители, восполнители электролитов (такие как раствор Рингера с декстрозой) и т.п. Консерванты и другие добавки также могут присутствовать, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы и т.п. Помимо этого фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать дополнительные агенты, такие как допамин или психофармакологические лекарственные препараты, в зависимости от предполагаемого способа применения фармацевтической композиции.

Помимо этого согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция может быть изготовлена в виде вакцины, например, если фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит антитело к DPR или его DPR-связывающий фрагмент, или синтетический или биотехнологический вариант или производное для пассивной иммунизации. Как уже упоминалось в разделе предшествующего уровня техники, агрегированные молекулы DPR являются основным иницирующим фактором заболеваний и/или расстройств, таких как FTLD и ALS. Соответственно можно ожидать, что пассивная иммунизация с использованием происходящих от человека антител к DPR и эквивалентных DPR-связывающих молекул согласно настоящему изобретению поможет преодолеть ряд нежелательных эффектов, возникающих при лечении с использованием активной иммунизации, и приведет к сниженной агрегации DPR. Следовательно, антитела к DPR и их эквиваленты согласно настоящему изобретению будут особенно подходящими в качестве вакцины для предупреждения или облегчения заболеваний или расстройств, связанных с присутствием или вызванных аг-

регированными DPR, в частности C9ORF72-DPR, таких как FTLD.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения применение рекомбинантных фрагментов Fab (rFab) и одноцепочечных фрагментов (scFv) антитела согласно настоящему изобретению, которые могут более легко проникать через клеточную мембрану, может быть предпочтительным. Например, в работе Robert et al., Protein Eng. Des. Sel. (2008); S1741-0134, опубликованной в Интернете перед выпуском печатной версии, описано использование химерного рекомбинантного фрагмента Fab (rFab) и одноцепочечных фрагментов (scFv) моноклонального антитела WO-2, которое распознает эпитоп в N-концевой области бета-амилоида. Указанные модифицированные фрагменты (i) предотвращали образование фибрилл амилоида, (ii) вызывали дезагрегацию уже сформированных фибрилл A β 1-42, и (iii) ингибировали нейротоксичность, опосредованную олигомерами A β 1-42, в условиях *in vitro* также эффективно, как и полноразмерная молекула IgG. Предполагаемые преимущества использования небольших модифицированных фрагментов Fab и scFv антител, которые лишены эффекторной функции, включают эффективное прохождение через гематоэнцефалический барьер и сведение к минимуму риска развития воспалительных побочных реакций. Также помимо этого scFv и однодоменные антитела сохраняют специфичность связывания полноразмерных антител, они могут быть экспрессированы в виде отдельных генов и внутриклеточно в клетках млекопитающих в виде интрател, при этом параметры сворачивания, взаимодействия, модификаций или субклеточной локализации их мишеней, потенциально, могут быть изменены; см. для обзора, например, Miller and Messer, Molecular Therapy 12 (2005), 394-401.

В соответствии с другим подходом в работе Muller et al., Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241 описана технологическая платформа, так называемая "SuperAntibody Technology", которая обеспечивает перемещение антител в живые клетки, не повреждая их. Указанные антитела, способные проникать в клетки, открывают новые диагностические и терапевтические перспективы. Для указанных антител был введен термин "TransMabs".

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения совместное введение или последовательное введение других антител, пригодных для лечения заболевания, расстройства или симптомов, связанных с возникновением DPR, в частности агрегированными DPR, такими как C9ORF72-DPR, может быть желательным. В одном варианте дополнительные антитела входят в состав фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры антител, которые можно применять для лечения субъекта, включают, но не ограничиваются ими, антитела к CD33, SGLT2, ИЛ-6 и ИЛ-1.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения может быть желательным совместное введение или последовательное введение других агентов, пригодных для лечения заболевания, расстройства или симптомов, связанных с DPR, в частности агрегированными DPR, такими как мутированные C9ORF72, т.е. C9ORF72-DPR. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения дополнительный агент входит в состав фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры агентов, которые можно применять для лечения субъекта, включают, но не ограничиваются ими: ингибиторы VMAT2, воздействующие на произвольные мышечные движения, такие как противовоспалительные агенты, такие как дифлусинал, кортикостероиды, 2-(2,6-дихлоранилин)фенилуксусная кислота (диклофенак), изобутилфенилпропионовая кислота (ибупрофен); диуретики, эпигаллокатехина галлат, мелфалана гидрохлорид, дексаметазон, бортезомиб, бортезомиб-мелфалан, бортезомиб-дексаметазон, мелфалан-дексаметазон, бортезомиб-мелфалан-дексаметазон; антидепрессанты, антипсихотические лекарственные средства, нейролептики, препараты для лечения деменции (например, антагонист NMDA-рецепторов мемантин), ингибиторы ацетилхолинэстеразы (например, донепезил, HCl, ривастигмин, галантамин), антагонисты глутамата и другие ноотропные препараты, модифицирующие кровоток (например, дигидралазин, метилдопа), цитостатики, глюкокортикоиды, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ); противовоспалительные агенты или любая их комбинация.

Терапевтически эффективная доза или количество относятся к количеству активного ингредиента, достаточному для ослабления симптомов или состояния. Терапевтическая эффективность и токсичность указанных соединений может быть определена с помощью стандартных фармацевтических методик на клеточных культурах или экспериментальных животных, например ЭД₅₀ (доза, терапевтически эффективная в 50% популяции) и ЛД₅₀ (доза, летальная для 50% популяции). Соотношение доз, вызывающих терапевтическое действие, и доз, вызывающих токсическое действие, представляет собой терапевтический индекс, который может быть выражен как соотношение ЛД₅₀/ЭД₅₀.

Исходя из вышеизложенного очевидно, что в область настоящего изобретения включено любое применение DPR-связывающей молекулы, содержащей по меньшей мере один CDR из описанного выше антитела, в частности для диагностики и/или лечения заболевания или расстройства, связанного с DPR, в частности агрегированными молекулами DPR, такими как C9ORF72-DPR, такого заболевания как FTLD. Предпочтительно указанная связывающая молекула представляет собой антитело согласно настоящему изобретению или его биотехнологическое производное. Помимо этого в настоящем изобретении предложены антиидиотипические антитела любого одного из указанных антител, описанных выше. Указанные антитела или другие связывающие молекулы связываются с уникальной антигенной пептидной по-

следовательностью, расположенной на вариабельной области антитела возле антигенсвязывающего сайта, и пригодны, например, для детектирования антител к DPR в образце, полученном от субъекта. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, следовательно, в настоящем изобретении предложено антитело, определенное выше и ниже, или DPR-связывающая молекула, специфичность связывания которой по существу аналогична таковой любого из указанных антител, полинуклеотид, вектор или клетка, определенная в настоящем документе, или фармацевтическая или диагностическая композиция, содержащая любой из указанных компонентов для применения в профилактическом лечении, терапевтическом лечении и/или мониторинге прогрессирования или ответа на лечение заболевания или расстройства, связанного с DPR. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения заболевание и/или расстройство связано с агрегированными DPR. В особенно предпочтительном варианте реализации заболевание и/или расстройство связано с C9ORF72-DPR, например, при FTLD и ALS.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложена диагностическая композиция, содержащая любую из описанных выше DPR-связывающих молекул, антител, антигенсвязывающих фрагментов, полинуклеотидов, векторов или клеток согласно настоящему изобретению и необязательно подходящие средства для детектирования, такие как реагенты, обычно используемые в иммунологических диагностических способах или способах диагностики на основе нуклеиновых кислот. Антитела согласно настоящему изобретению, например, пригодны для применения в иммунологических количественных способах исследований, в которых их можно применять в жидкой фазе или в связанной с твердой подложкой форме. Примеры иммунологических количественных способов исследований, в которых можно применять антитела согласно настоящему изобретению, включают конкурентные и неконкурентные иммунологические количественные способы исследований в прямом или непрямом формате. Примеры подходящих иммунологических количественных способов исследований включают радиоиммунологические количественные способы исследований (РИА), ИФА в формате "сэндвич" (иммунометрический количественный способ исследований), проточную цитометрию и вестерн-блоттинг. Антигены и антитела согласно настоящему изобретению могут быть связаны со многими различными носителями и использованы для выделения клеток, специфично связанных с ними. Примеры хорошо известных носителей включают стекло, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозы, природные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, агарозы и магнетит. Носитель может быть растворимым или нерастворимым применительно к целям настоящего изобретения. Существует много различных меток и способов введения меток, известных специалистам в данной области техники. Примеры типов меток, которые можно применять согласно настоящему изобретению, включают ферменты, радиоизотопы, коллоидные металлы, флуоресцентные соединения, хемилюминесцентные соединения и биолюминесцентные соединения; см. также варианты реализации, описанные выше.

Согласно другому варианту реализации DPR-связывающие молекулы, в частности антитела, согласно настоящему изобретению также можно применять в способе диагностики заболевания или нарушения у индивидуума путем получения образца жидкости организма от индивидуума, которого исследуют, который может представлять собой образец крови, образец плазмы крови, образец сыворотки крови, образец лимфы или образец любой другой жидкости организма, такой как образец слюны или мочи, и приведения образца жидкости организма в контакт с антителом согласно настоящему изобретению в условиях, которые обеспечивают образование комплексов антитело-антиген. Уровень указанных комплексов затем определяют способами, известными в данной области техники, при этом уровень, который значительно выше, чем уровень в контрольном образце, указывает на заболевание или расстройство у индивидуума, которого исследуют. Аналогичным образом может быть использован специфичный антиген, связанный с антителами согласно настоящему изобретению. Следовательно, в настоящем изобретении предложен иммунологический количественный способ исследований в условиях *in vitro*, включающий связывающую молекулу, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения DPR-связывающие молекулы, в частности антитела согласно настоящему изобретению, также можно применять в способе диагностики заболевания или расстройства у индивидуума путем получения биопсии у индивидуума, которого исследуют.

Ввиду вышеизложенного в настоящем изобретении также предложены средства, специально предназначенные для осуществления указанной цели. Например, может быть использован массив на основе антител, который, например, загружен антителами или эквивалентными антигенсвязывающими молекулами согласно настоящему изобретению, которые специфично распознают DPR. Дизайн иммунологических количественных способов исследований на основе микрочипов описан в Kusnezow et al., *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Соответственно в настоящем изобретении также предложены микрочипы, нагруженные DPR-связывающими молекулами, выявленными в соответствии с настоящим изобретением.

Согласно одному из вариантов реализации в настоящем изобретении предложен способ диагности-

ки заболевания или расстройства, связанного с DPR, в частности с агрегированными молекулами DPR, такими как C9ORF72-DPR, у субъекта, включающий определение присутствия DPR и агрегированных DPR соответственно, в образце субъекта, которому ставят диагноз, с использованием по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению, его DPR-связывающего фрагмента или DPR-связывающей молекулы, специфичность связывания которой аналогична таковой для любого из указанных антител, причем присутствие патологически агрегированных DPR, предпочтительно C9ORF72-DPR, указывает на FTLN и/или ALS, а также увеличение уровня патологически агрегированных DPR, в частности C9ORF72-DPR, по сравнению с уровнем физиологической формы C9ORF72, т.е. в которой не происходит трансляция области повторов в DPR-белки, является показателем прогрессирования FTLN и/или ALS у указанного субъекта.

Субъект, которому ставят диагноз, возможно, имеет бессимптомную или доклиническую форму заболевания. Предпочтительно контрольный субъект имеет заболевание, связанное с DPR, агрегированными DPR и предпочтительно C9ORF72-DPR, например FTLN, ALS и FTLN-ALS, и другие, описанные выше, при этом сходство между уровнем DPR, например агрегированных C9ORF72-DPR, и эталонным стандартом указывает на то, что субъект, которому ставят диагноз, имеет FTLN, ALS и/или FTLN-ALS или подвержен риску развития заболевания и/или расстройства, связанного с агрегацией DPR. Согласно другому варианту реализации или дополнительно в качестве второго контроля контрольный субъект не имеет агрегации DPR, при этом разность между уровнем физиологической формы C9ORF72 или другого белка, который склонен содержать DPR, вставленные в результате мутации в гене, сходном с мутированным геном C9ORF72, и/или агрегированные C9ORF72-DPR, и эталонным стандартом свидетельствует о том, что субъект, которому ставят диагноз, имеет заболевание и/или расстройство, связанное с DPR, такое как FTLN, ALS и/или FTLN-ALS, или подвержен риску развития заболевания и/или расстройства, связанного с DPR. Предпочтительно субъект, которому ставят диагноз, и контрольный субъект соотнесены по возрасту. Анализируемый образец может представлять собой любую жидкость тела, которая, как предполагают, содержит патологические DPR-белки, такие как агрегированные C9ORF72-DPR, например кровь, плазму крови, сыворотку крови, мочу, перитонеальную жидкость, слюну или спинномозговую жидкость (СМЖ).

Уровень физиологического белка C9ORF72 или аналогичного белка и/или агрегированных DPR, таких как C9ORF72-DPR, можно оценить любым подходящим способом, известным в данной области техники, включая, например, исследование DPR и/или белка, содержащего DPR, такого как C9ORF72, одним или более способами, выбранными из вестерн-блоттинга, иммунопреципитации, иммуноферментного анализа (ИФА), радиоиммунологических количественных способов (РИА), флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS), двумерного гель-электрофореза, масс-спектрометрии (MS), время-пролетной ионизации лазерной десорбцией с использованием матрицы (MALDI-TOF), время-пролетной поверхностно-расширенной ионизации лазерной десорбцией (SELDI-TOF), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC), многомерной жидкостной хроматографии (ЖХ) с последующей тандемной масс-спектрометрией (MC/MC) и лазерной денситометрии. Предпочтительно указанная визуализация DPR в условиях *in vivo* включает сканиграфию, позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭКТ), визуализацию в ближней инфракрасной области (NIR) или магнитно-резонансную томографию (МРТ).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, следовательно, антитело согласно настоящему изобретению или DPR-связывающая молекула, специфичность связывания которой по существу аналогична специфичности связывания любого из указанных антител, полинуклеотид, вектор или клетка, определенные выше, или их фармацевтическая или диагностическая композиция, содержащая любые из указанных компонентов, предназначены для применения в профилактическом лечении, терапевтическом лечении и/или контроле прогрессирования или ответа на лечение заболевания или расстройства, связанного с агрегированным DPR-белком. Следовательно, в настоящем изобретении также предложен способ диагностики или мониторинга прогрессирования заболевания или расстройства, связанного с DPR-белками (такими как FTLN и ALS), у субъекта, причем указанный способ включает этапы определения присутствия DPR-белков в образце субъекта, которому ставят диагноз, с использованием по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению или DPR-связывающей молекулы, специфичность связывания которой по существу аналогична специфичности связывания любого из указанных антител, причем присутствие DPR, например, в мутированном C9ORF72 и агрегированных молекулах C9ORF72-DPR, указывает на заболевание или расстройство. Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен указанный способ диагностики или мониторинга прогрессирования DPR-связанных заболеваний и/или расстройств у субъекта, включающий определение присутствия DPR, например, их мутированных C9ORF72 и агрегированных форм в образце субъекта, которому ставят диагноз, с использованием по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению или DPR-связывающей молекулы, специфичность связывания которой по существу аналогична специфичности связывания любого из указанных антител, причем присутствие DPR, таких как мутированные C9ORF72 и/или агрегированные C9ORF72-DPR, указывает на бессимптомные, продромальные или кли-

нические формы заболеваний и/или расстройств, связанных с DPR, увеличение уровня агрегатов DPR, в частности C9ORF72-DPR, по сравнению с уровнем физиологического C9ORF72, не содержащего DPR, или по сравнению с эталонным образцом, полученным от здорового контрольного субъекта или из контрольного образца от того же субъекта, указывает на прогрессирование бессимптомных, продромальных или клинических форм заболеваний и/или расстройств, связанных с DPR, таких как FTLD и ALS. Специалист в данной области техники поймет, что согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанный способ также применяют для диагностики или мониторинга прогрессирования любого другого заболевания или расстройства из группы расстройств, связанных с DPR и белками, которые содержат DPR, соответственно определенных выше.

Как было указано выше, антитела согласно настоящему изобретению и молекулы, специфичность связывания которых аналогична таковой для указанных антител, можно применять не только в условиях *in vitro*, но в условиях *in vivo*, при этом, помимо диагностического способа применения, в настоящем изобретении предложено терапевтическое применение. Согласно одному варианту реализации, следовательно, в настоящем изобретении также предложена DPR-связывающая молекула, содержащая по меньшей мере один CDR антитела согласно настоящему изобретению, для получения композиции для детектирования или нацеленного воздействия терапевтического и/или диагностического агента на DPR в условиях *in vivo*, предпочтительно C9ORF72-DPR в организме человека или животного. Подходящие терапевтические и/или диагностические агенты могут быть выбраны из многочисленных неограничивающих терапевтических агентов, пригодных для лечения заболеваний и/или расстройств, связанных с DPR и потенциальными метками, как указано выше. В отношении способа визуализации в условиях *in vivo*, согласно одному предпочтительному варианту реализации, в настоящем изобретении предложена указанная DPR-связывающая молекула, содержащая по меньшей мере один CDR антитела согласно настоящему изобретению, при этом указанный способ визуализации в условиях *in vivo* включает сцинтиграфию, позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную томографию (ОФЭКТ), визуализацию в ближней инфракрасной области (NIR) или магнитно-резонансную томографию (МРТ). Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении также предложена указанная DPR-связывающая молекула, содержащая по меньшей мере один CDR антитела согласно настоящему изобретению, или указанная молекула для получения композиции для осуществления вышеупомянутых способов визуализации в условиях *in vivo* для применения в способе диагностики или мониторинга прогрессирования заболевания или расстройства, связанного с DPR-белком у субъекта, как определено выше.

Ввиду вышеизложенного в настоящем изобретении также предложен набор, пригодный для диагностики или мониторинга прогрессирования заболеваний и/или расстройств, связанных с DPR и DPR-содержащими белками, причем указанный набор содержит по меньшей мере одно антитело согласно настоящему изобретению или DPR-связывающую молекулу, специфичность связывания которой по существу аналогична специфичности связывания любого из указанных антител, полинуклеотид, вектор или клетку и/или пептид, определенные выше, соответственно необязательно с реагентами и/или инструкциями по применению.

Вышеизложенное описание в общих чертах описывает настоящее изобретение. Если не указано иное, то в настоящей заявке дается определение терминов, предусмотренное в Оксфордском словаре по биохимии и молекулярной биологии, Oxford University Press, 1997, переработанном в 2000 г. и повторно изданном в 2003 г., ISBN 0198506732. Некоторые документы цитируются по всему тексту данного описания. Полные библиографические цитаты могут быть найдены в конце описания, непосредственно перед формулой изобретения. Содержание всех цитируемых ссылок (включая ссылки на литературу, выданные патенты, опубликованные заявки на патенты, процитированные в настоящем описании, включая раздел уровня техники, и спецификации производителя, инструкции и т.д.) тем самым в явной форме включено посредством ссылки; тем не менее, не допускается, что любой процитированный документ действительно является предшествующим уровнем техники в отношении настоящего изобретения.

Более полное понимание может быть получено со ссылкой на следующие конкретные примеры, которые приведены в настоящем документе исключительно в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Примеры

Пример 1. Выделение и идентификация антител к белку, содержащему дипептидные повторы (DPR).

Происходящие от человека антитела к белкам, содержащим дипептидные повторы (DPR), их фрагментам, C9ORF72-DPR и/или их фрагментам, были идентифицированы с использованием способа, описанного в международной заявке WO 2008/081008, содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки, с модификациями. В частности, белки, содержащие дипептидные повторы, синтезировали и очищали в компании Schafer-N (Копенгаген, Дания): GA₁₅: H-CHHHHHH(GA)₁₅-OH; GP₁₅: H-C(GP)₁₅-OH; GR₁₅: H-C(GR)₁₅-OH; (PA)₁₅: H-C(PA)₁₅-OH; (PR)₁₅: H-C(PR)₁₅-OH. Белки, содержащие дипептидные повторы, затем конъюгировали с помощью бифункционального линкера (SMCC) с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Далее прямой ИФА осуществляли с использованием 96-луночных микропланшетов (Corning), покрытых неконъюгированными или BSA-конъюгированными белками, со-

держащими дипептидные повторы, или БСА (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария) в концентрации 5 мкг/мл в покрывающем буфере (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,42). Неспецифичные сайты связывания блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием ФСБ/0,1% твин®-20, содержащего 2% БСА (ФСБТ) (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария). Среду, кондиционированную В-клетками, переносили из культуральных планшетов в В-клетками памяти в планшеты для ИФА и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей инкубацией с антителом ослы к Fcγ IgG человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (ПХ) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест-Грув, США), и антителом козы к IgA человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест-Грув, США). Связывание определяли путем измерения активности ПХ с помощью стандартного колориметрического количественного способа исследований. Только культуры В-клеток, которые проявляли связывание антител, содержащихся в среде, с DPR, но не с БСА, подвергали клонированию для получения антител.

Пример 2. Определение последовательности антитела.

Аминокислотные последовательности переменных областей выявленных антител к DPR определяли на основании последовательностей их мРНК, см. фиг. 1А-Ж. В общих чертах, собирали живые В-клетки из отобранных не иммортализованных культур В-клеток памяти. Затем мРНК из клеток, вырабатывающих выбранные антитела к DPR, выделяли и превращали в кДНК, и последовательности, кодирующие переменные области антитела, амплифицировали с помощью ПЦР, клонировали в плазмидные векторы и секвенировали. В общих чертах, комбинация праймеров, представляющих все семейства последовательностей репертуара иммуноглобулинов зародышевой линии человека, использовали для амплификации лидерных пептидов, V-сегментов и J-сегментов. Первый цикл амплификации проводили с использованием праймеров, специфичных в отношении лидерного пептида, на 5'-конце и праймеров, специфичных в отношении константных областей, на 3'-конце (Smith et al., Nat Protoc. 4 (2009), 372-384). Для тяжелых цепей и легких каппа-цепей второй цикл амплификации проводили с использованием праймеров, специфичных в отношении V-сегмента, на 5'-конце и праймеров, специфичных в отношении J-сегмента, на 3'-конце. Для легких лямбда-цепей второй цикл амплификации проводили с использованием праймеров, специфичных в отношении V-сегмента, на 5'-конце и праймеров, специфичных в отношении C-участка, на 3'-конце (Marks et al., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597; de Haard et al., J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230).

Клон антитела с желаемой специфичностью выявляли путем повторного скрининга методом ИФА после рекомбинантной экспрессии полноразмерных антител. Рекомбинантную экспрессию полноразмерных антител IgG1 человека получали при введении последовательностей переменной области тяжелой и легкой цепей "в правильной рамке считывания" в векторы экспрессии, которые дополняют последовательность переменной области последовательностью, кодирующей лидерный пептид, на 5'-конце и последовательностью, кодирующей соответствующую константную область(и) на 3'-конце. С этой целью конструировали праймеры, содержащие сайты рестрикции, предназначенные для облегчения клонирования последовательностей переменных областей тяжелых и легких цепей в векторы экспрессии антител. Тяжелые цепи иммуноглобулинов экспрессировали путем вставки продукта ОТ-ПЦР тяжелой цепи иммуноглобулина в пределах открытой рамки считывания в вектор экспрессии тяжелой цепи, несущий сигнальный пептид и константные области иммуноглобулина IgG1 человека или мыши. Иммуноглобулины легкой каппа-цепи экспрессировали путем введения продукта ОТ-ПЦР легкой каппа-цепи в пределах открытой рамки считывания в вектор экспрессии легкой цепи, обеспечивающий сигнальный пептид и константную область легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека. Иммуноглобулины легкой лямбда-цепи экспрессировали путем введения продукта ОТ-ПЦР легкой лямбда-цепи в пределах открытой рамки считывания в вектор экспрессии легкой лямбда-цепи, обеспечивающий сигнальный пептид и константную область легкой лямбда-цепи иммуноглобулина человека или мыши.

Функциональные рекомбинантные моноклональные антитела получали путем совместной трансфекции клеток НЕК293 или клеток СНО (или любой другой подходящей реципиентной линии клеток человека или мыши) вектором экспрессии тяжелой цепи Ig и вектором экспрессии легкой каппа-цепи или лямбда-цепи Ig. Рекомбинантное моноклональное антитело человека затем очищали из кондиционированной среды с использованием стандартной очистки на колонке с белком А. Рекомбинантное моноклональное антитело человека может быть получено в неограниченных количествах с использованием кратковременно или стабильно трансфицированных клеток. Клеточные линии, вырабатывающие рекомбинантные моноклональные антитела человека, могут быть получены с помощью векторов экспрессии Ig непосредственно или путем повторного клонирования переменных областей Ig в различные векторы экспрессии. Из указанных переменных областей Ig также могут быть получены производные, такие как F(ab), F(ab)₂ и scFv.

Последовательности участков каркаса определяющих комплементарность участков определяли путем сравнения с эталонными последовательностями антител, доступными в базах данных, таких как Abysys (<http://www.bioinf.org.uk/abysis/>), и аннотировали с использованием системы нумерации Kabat (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

Пример 3. Определение ЭК₅₀ C9ORF72-DPR-белков с помощью ИФА.

Чтобы определить специфичность связывания и полумаксимальную эффективную концентрацию (ЭК₅₀) рекомбинантных происходящих от человека антител к C9ORF72, NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 и NI-308.16C10, в отношении C9ORF72-DPR-белков, проводили определение величины ЭК₅₀ с помощью ИФА. В общих чертах, белки, содержащие дипептидные повторы, синтезировали и очищали в компании Schafer-N (Копенгаген, Дания): (GA)₁₅: H-СНННННН(GA)₁₅-ОН; (GP)₁₅: H-С(GP)₁₅-ОН; (GR)₁₅: H-С(GR)₁₅-ОН; (PA)₁₅: H-С(PA)₁₅-ОН; (PR)₁₅: H-С(PR)₁₅-ОН. 96-луночные микропланшеты (Corning Incorporated, Корнинг, США) покрывали пептидами белков, содержащих дипептидные повторы, в концентрации 5 или 20 мкг/мл в покрывающем буфере (15 Na₂CO₃, 35 NaHCO₃, pH 9,42). Неспецифичные сайты связывания блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием ФСБ/0,1% твин®-20, содержащего 2% БСА (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария). Первичные антитела разбавляли до указанных концентраций и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей инкубацией с антителом осли к IgG Fcγ человека, конъюгированным с ПХ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест-Грув, США). Связывание определяли путем измерения активности ПХ с помощью стандартного колориметрического количественного способа исследований. Значения ЭК₅₀ оценивали с помощью нелинейной регрессии, используя программное обеспечение GraphPad Prism (Сан-Диего, США). Специфичность связывания и ЭК₅₀ происходящих от человека антител к пептидам C9ORF72-DPR-белков, (GA)₁₅, (GP)₁₅, (GR)₁₅, (PA)₁₅ и (PR)₁₅, определяли путем непрямого ИФА. Антитела NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2 и NI-308.18F7 распознавали исключительно поли-GA DPR-белок с величиной аффинности связывания, которая находилась в субнанолярном или низком нанолярном диапазоне (фиг. 2А-Е). Антитело NI-308.24E11 специфично связывалось с поли-PR DPR-белком с низкой величиной ЭК₅₀, которая находилась в нанолярном диапазоне (фиг. 2А и F), тогда как антитело NI-308.16C10 преимущественно распознавало поли-PR DPR-белок с величиной ЭК₅₀, которая находилась в низком нанолярном диапазоне, а также связывалось с более низкой аффинностью с поли-GA DPR-белком (фиг. 2А и М). Антитела NI-308.5G2, NI-308.12A3 и NI-308.46E9 преимущественно распознавали поли-GP DPR-белок с величинами ЭК₅₀, которые находились в субнанолярном и низком нанолярном диапазоне соответственно, а также связывались с меньшей аффинностью с поли-GA DPR (фиг. 2А, G, L и Н). Антитело NI-308.6B11 связывалось со многими DPR-белками, его мишенями являлись поли-GR, поли-GA и поли-PR, при этом с самой высокой аффинностью указанное антитело связывалось с поли-GR DPR-белка (фиг. 2А и I).

Аналогичный характер связывания наблюдали для NI-308.46F8, но с более низкой аффинностью (фиг. 2А и J). Антитело NI-308.4M1 преимущественно распознавало поли-PA DPR-белок с величинами ЭК₅₀ в субнанолярном диапазоне, а также связывалось с более низкой аффинностью с поли-GA DPR-белком (фиг. 2А и K). В заключение следует отметить, что высокопроизводительные исследования иммунного репертуара популяций здоровых доноров пожилого возраста с помощью скрининга RTM™ привели к успешному клонированию и рекомбинантному получению высокоаффинных моноклональных антител человека, нацеленных на DPR, присоединенные к удлиненным гексануклеотидными повторами C9ORF72. Рекомбинантные антитела человека являются селективными в отношении одного DPR или нацелены ко многим молекулам, возможно, вследствие общей одинаковой аминокислоты в повторах.

Пример 4. Определение аффинности связывания с БСА-присоединенными пептидами DPR.

Чтобы определить специфичность связывания и полумаксимальную эффективную концентрацию (ЭК₅₀) рекомбинантных происходящих от человека антител к C9ORF72, NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 и NI-308.16C10, в отношении C9ORF72-DPR-белков, связанных с БСА, проводили определение величины ЭК₅₀ с помощью ИФА. В общих чертах, белки, содержащие дипептидные повторы, синтезировали и очищали в компании Schafer-N (Копенгаген, Дания): (GA)₁₅: H-СНННННН(GA)₁₅-ОН; (GP)₁₅: H-С(GP)₁₅-ОН; (GR)₁₅: H-С(GR)₁₅-ОН; (PA)₁₅: H-С(PA)₁₅-ОН; (PR)₁₅: H-С(PR)₁₅-ОН. Белки, содержащие дипептидные повторы, затем конъюгировали с помощью бифункционального линкера (SMCC) с бычьим сывороточным альбумином (БСА). 96-луночные микропланшеты (Corning Incorporated, Корнинг, США) покрывали БСА-присоединенными или не присоединенными с БСА пептидами белков, содержащих дипептидные повторы, в концентрации 5 или 20 мкг/мл в покрывающем буфере (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,42). Неспецифичные сайты связывания блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием ФСБ/0,1% твин®-20, содержащего 2% БСА (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария). Первичные антитела разбавляли до указанных концентраций и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей инкубацией с антителами осли к IgG Fcγ человека, конъюгированными с ПХ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест-Грув, США). Связывание определяли путем измерения активности ПХ с помощью стандартного колориметрического количественного способа исследований. Значения ЭК₅₀ оценивали с помощью нелинейной регрессии, используя программное обеспечение GraphPad Prism (Сан-Диего, США). Сравнимые величины аффинности связывания определяли для БСА-связанных и несвязанных DPR-белков для антител NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.28G1,

NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.4M1 и NI-308.12A3 (фиг. 3 A-D, G, H, K, L). Антитела NI-308.45C2, NI-308.24E11 и NI-308.16C10 связывались со сниженной аффинностью в отношении соответствующих БСА-связанных DPR-пептидов (фиг. 3A, E, F и M), тогда как антитела NI-308.6B11 и NI-308.46F8 не связывались с БСА-присоединенными DPR-белками в экспериментальных условиях (фиг. 3A, I и J). В заключение следует отметить, что большинство антител человека к DPR могут распознавать DPR-пептиды, связанные с белком-носителем БСА, с сопоставимыми величинами аффинности в отношении пептидов с гидрофобным покрытием. Более низкие величины аффинности связывания, наблюдаемые для отдельных кандидатов, могут быть обусловлены низкой эффективностью связывания отдельных DPR-пептидов с БСА, различной конформацией при связывании с БСА или стерической недоступностью эпитопа после сайт-направленного химического связывания с носителем.

Пример 5. Определение специфичности связывания с неродственными амилоидогенными белками.

Чтобы определить целевую специфичность рекомбинантных антител NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11 и NI-308.46F8, непрямым ИФА проводили следующим образом. 96-луночные микропланшеты (Корнинг) покрывали различными белками-мишенями в концентрации 1-10 мкг/мл в покрывающем буфере (15 мМ Na₂CO₃, 35 мМ NaHCO₃, pH 9,42). Неспецифичные сайты связывания блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием ФСБ/0,1% твин®-20, содержащего 2% БСА (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария). Антитела NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11 и NI-308.46F8 разбавляли до концентрации 20 нМ и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Связывание определяли с использованием антитела осли к IgG Fcγ человека, конъюгированного с ПХ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест-Грув, США), с последующим измерением активности ПХ с помощью стандартного колориметрического количественного способа исследований. Сигналы для белка-мишени рассчитывали в виде относительного увеличения по сравнению с медианой. Целевую специфичность происходящих от человека антител NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11 и NI-308.46F8 определяли путем непрямого ИФА, в котором оценивали связывание антитела с C9ORF72-DPR-белками и шестью неродственными амилоид-образующими белками (PHF-Tau, Tau, TDP-43, TTR, fAPP и HTT). Как показано на фиг. 4, происходящие от человека антитела NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.6B11 и NI-308.46F8 проявили высокую специфичность связывания с DPR-пептидами с минимальной или отсутствующей перекрестной реактивностью в отношении неродственных амилоидогенных белков для большинства кандидатов (фиг. 4A-F, H и I). Для антитела NI-308.46E9 детектировали повышенный неспецифичный сигнал в отношении нескольких аналитов (фиг. 4 G).

Пример 6. Исследование C9ORF72-DPR-белков методом вестерн-блоттинга.

Для определения специфичности связывания рекомбинантных происходящих от человека антител к C9ORF72, NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 и NI-308.16C10, в отношении C9ORF72-DPR-белков, проводили исследование методом иммуноблоттинга. В общих чертах, белки, содержащие дипептидные повторы, синтезировали и очищали в компании Schafer-N (Копенгаген, Дания): (GA)₁₅: H-SNNNNNNH(GA)₁₅-OH; (GP)₁₅: H-C(GP)₁₅-OH; (GR)₁₅: H-C(GR)₁₅-OH; (PA)₁₅: H-C(PA)₁₅-OH; (PR)₁₅: H-C(PR)₁₅-OH. Белки, содержащие дипептидные повторы, затем конъюгировали с помощью бифункционального линкера (SMCC) с бычьим сывороточным альбумином (БСА). В общих чертах, БСА-конъюгированные пептиды белков, содержащих дипептидные повторы, (0,5 мкг), разделяли методом градиентного электрофореза в ДСН-ПААГ (4-12% бис-трис гели Novex® NuPAGE®; Life Technologies Europe B.V., Цуг, Швейцария) с помощью подвижного буфера MES-ДСН Novex® NuPAGE®, дополненного антиоксидантом (Life Technologies Europe B.V., Цуг, Швейцария). Разделенные белки подвергали электроблоттингу (Novex® полусухой аппарат для блоттинга, 1 ч, 25 В) на метанол-активированной мембране ПВДФ (Immobilon®-P Transfer Membrane, Merck&Cie, Шаффхаузен, Швейцария) с использованием 2× буфера для переноса Novex® NuPAGE® (Life Technologies Europe B.V., Цуг, Швейцария). Неспецифичные сайты связывания блокировали в течение ночи при 4°C (или согласно другому варианту реализации 1 ч при комнатной температуре) с использованием ФСБ/0,1% твин®-20, содержащего 2% БСА (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария) (ФСБТ). Антитела NI-308 разбавляли до концентрации 10 или 100 нМ и инкубировали 1 ч при комнатной температуре (или согласно другому варианту реализации в течение ночи при 4°C). Мембраны промывали три раза в ФСБТ в течение 15 мин при комнатной температуре и затем инкубировали с антителом осли к IgG Fcγ человека, конъюгированным с ПХ (разбавленным в соотношении 1:20000 или 1:10000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест-Грув, США), в течение 1 ч при комнатной температуре. Связывание антител определяли с помощью проявления мембран, используя ECL и детектирование на ImageQuant 350 (GE Healthcare, Отельфинген, Швейцария).

Специфичность связывания происходящих от человека антител с БСА-присоединенными C9ORF72-OP11-белками (GA)₁₅, (GP)₁₅, (GR)₁₅, (PA)₁₅ и (PR)₁₅ определяли с помощью вестерн-блоттинга. Антитела NI-308.15O7, NI-308.18F7, NI-308.28G1 и NI-308.45C2 распознавали исключительно поли-GA DPR-белок (фиг. 5A-D). Антитела NI-308.24E11 и NI-308.16C10 специфично связывались только с поли-PR DPR-

белком (фиг. 5Е и J), при этом антитело NI-308.16C10 дополнительно распознавало поли-GA DPR (фиг. 5J). Антитела NI-308.5G2, NI-308.12A3 и NI-308.46E9 специфично связывались с поли-GP (фиг. 5F, G и I), и антитело NI-308.5G2 дополнительно распознавало поли-GA DPR (фиг. 5F). Антитело NI-308.4M1 распознавало исключительно поли-PA DPR-белок (фиг. 5H). Для антител NI-308.6B11 и NI-308.46F8 не было обнаружено связывания с БСА-присоединенными DPR согласно результатам вестерн-блоттинга в соответствии с выбранными условиями эксперимента (данные не приведены). В заключении следует отметить, что большинство происходящих от человека антител к C9ORF72-DPR могут распознавать БСА-связанные DPR-пептиды после электрофореза в ДСН-ПААГ и вестерн-блоттинга. Наблюдаемые характеристики связывания согласуются с результатами, полученными с помощью ИФА.

Пример 7. Исследование связывания с C9ORF72-DPR-белками методом иммунопреципитации в растворе.

Связывание в растворе рекомбинантных происходящих от человека антител к C9ORF72-DPR, NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11 и NI-308.6B11, оценивали методом иммунопреципитации. В общих чертах, белки, содержащие дипептидные повторы, синтезировали и очищали в компании Schafer-N (Копенгаген, Дания): (GA)₁₅: H-CHNNNNH(GA)₁₅-OH; (GP)₁₅: H-C(GP)₁₅-OH; (GR)₁₅: H-C(GR)₁₅-OH; (PA)₁₅: H-C(PA)₁₅-OH; (PR)₁₅: H-C(PR)₁₅-OH. По 5 мкг БСА-несвязанных пептидов белков, содержащих дипептидные повторы, разводили в 500 мкл ФСБ, pH 7,4 (Gibco®, Life Technologies Europe BV, Цуг, Швейцария) до конечной концентрации 10 мкг/мл. Образцы пептидов DPR-белков предварительно адсорбировали с 25 мкл Dynabeads®-белок А (Novex®, Life Technologies Europe BV, Цуг, Швейцария) путем инкубации при 4°C в течение 30 мин на вращающейся платформе. По 1 или 10 мкг отобранных антител добавляли к предварительно адсорбированным образцам и инкубировали в течение ночи при 4°C на вращающейся платформе. Иммуные комплексы захватывали путем добавления 25 мкл Dynabeads®-белок А и инкубировали при 4°C в течение 2 ч на вращающейся платформе. Гранулы промывали в соответствии с инструкциями производителя, суспендировали в буфере для образцов и нагревали при 95°C в течение 3 мин. Для вестерн-блоттинга иммуные комплексы и несвязанные пептиды DPR-белков (500 нг) разделяли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ (12% бис-трис гель Novex® NuPAGE®; Life Technologies Europe B.V., Цуг, Швейцария) с помощью подвижного буфера MES-ДСН Novex® NuPAGE® (Life Technologies Europe BV, Цуг, Швейцария) в невозобновляющих условиях. Разделенные белки подвергали электроблоттингу (Novex® полусухой аппарат для блоттинга, 1 ч, 25 В) на метанол-активированной мембране ПВДФ (Immobilon®-P Transfer Membrane, Merck&Cie, Шаффхаузен, Швейцария) с использованием буфера для переноса Novex® NuPAGE® (Life Technologies Europe B.V., Цуг, Швейцария). Неспецифичные сайты связывания блокировали в течение ночи при 4°C с использованием ФСБ/0,1% твин®-20, содержащего 2% БСА (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария) (ФСБТ). DPR-белки выявляли путем инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре со следующими детектирующими антителами: (GA)₁₅: NI-308.28G1, 10 нМ; (PR)₁₅: NI-308.24E11, 100 нМ; (GR)₁₅: анти-C9ORF72/C9RANT клон 5A5, разведение 1:5000 (MABN778, Merck&Cie, Шаффхаузен, Швейцария). Мембраны промывали три раза в ФСБТ в течение 15 мин при комнатной температуре и инкубировали с антителом осли к IgG Fcγ человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (разбавление 1:10000, ImmunoResearch Laboratories Джексона, Inc., Вест-Грув, США), или мышинным антителом к каппа-цепи крысы, конъюгированным с ПХ (разбавление 1:10000, SouthernBiotech, Бирмингем, США), в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембраны проявляли с помощью ECL и детектировали на устройстве ImageQuant+350 (GE Healthcare, Отельфинген, Швейцария). Антитела NI-308.15O7, NI-308.18F7, NI-308.45C2 и NI-308.28G1 захватывали в растворе пептиды поли-GA DPR-белка (фиг. 6А), тогда как антитела NI-308.24E11 и NI-308.6B11 осаждали поли-PR и поли-GR соответственно (фиг. 6В и С). Антитело NI-43A11 для контроля изотипа осаждало любой из исследованных пептидов DPR-белков (фиг. 6А-С). В заключение следует отметить, что происходящие от человека антитела к C9ORF72-DPR могут связываться и осаждают пептиды DPR-белков в растворе.

Пример 8. Определение характеристик связывания в зависимости от длины повторов с помощью непрямого ИФА.

Чтобы определить аффинность связывания рекомбинантных происходящих от человека антител, NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11 и NI-302.4M1, с C9ORF72-DPR с различной длиной повторов, проводили определение величины ЭК₅₀ с помощью ИФА. В общих чертах, белки, содержащие дипептидные повторы, синтезировали и очищали в компании Schafer-N (Копенгаген, Дания): GA₂₀: H-(GA)₂₀HHNNNNH-NH₂; GA₁₀: H-(GA)₁₀HHNNNNH-NH₂; GA₆: H-(GA)₆HHNNNNH-NH₂; GA₅: H-(GA)₅HHNNNNH-NH₂; GA₄: H-(GA)₄HHNNNNH-NH₂; GA₃: H-(GA)₃HHNNNNH-NH₂; GA₂: H-(GA)₂HHNNNNH-NH₂; GP₂₀: H-(GP)₂₀HHNNNNH-NH₂; GP₁₀: H-(GP)₁₀HHNNNNH-NH₂; GP₆: H-(GP)₆HHNNNNH-NH₂; GP₅: H-(GP)₅HHNNNNH-NH₂; GP₄: H-(GP)₄HHNNNNH-NH₂; GP₃: H-(GP)₃HHNNNNH-NH₂; GP₂: H-(GP)₂HHNNNNH-NH₂; GR₂₀: H-(GR)₂₀HHNNNNH-NH₂; GR₁₀: H-(GR)₁₀HHNNNNH-NH₂; GR₆: H-(GR)₆HHNNNNH-NH₂; GR₅: H-(GR)₅HHNNNNH-NH₂; GR₄: H-(GR)₄HHNNNNH-NH₂; GR₃: H-(GR)₃HHNNNNH-NH₂; GR₂: H-(GR)₂HHNNNNH-NH₂; PA₂₀: H-(PA)₂₀HHNNNNH-NH₂; PA₁₀: H-(PA)₁₀HHNNNNH-NH₂; PA₆: H-(PA)₆HHNNNNH-NH₂; PA₅: H-

(PA)₅НННННННН-NH₂; PA₄: H-(PA)₄НННННННН-NH₂; PA₃: H-(PA)₃НННННННН-NH₂; PA₂: H-(PA)₂НННННННН-NH₂; PR₂₀: H-(PR)₂₀НННННННН-NH₂; PR₁₀: H-(PR)₁₀НННННННН-NH₂; PR₆: H-(PR)₆НННННННН-NH₂; PR₅: H-(PR)₅НННННННН-NH₂; PR₄: H-(PR)₄НННННННН-NH₂; PR₃: H-(PR)₃НННННННН-NH₂; PR₂: H-(PR)₂НННННННН-NH₂. 96-луночные микропланшеты (Corning Incorporated, Корнинг, США) покрывали пептидами белков, содержащих дипептидные повторы, в концентрации 50 мкг/мл в покрывающем буфере (15 мМ Na₂CO₃, 35 мМ NaHCO₃, pH 9,42). Неспецифичные сайты связывания блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием ФСБ/0,1% твин®-20, содержащего 2% БСА (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария). Первичные антитела разбавляли до указанных концентраций и инкубировали 1 ч при комнатной температуре с последующей инкубацией с антителом осли к IgG Fcγ человека, конъюгированным с ПХ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест-Грув, США). Связывание определяли путем измерения активности ПХ с помощью стандартного колориметрического количественного способа исследований. Значения ЭК₅₀ оценивали с помощью нелинейной регрессии, используя программное обеспечение GraphPad Prism (Сан-Диего, США).

Аффинность связывания выбранных антител NI-308 в отношении C9ORF72-DPR-белков с различными длинами повторов определяли методом непрямого ИФА после нанесения гидрофобного покрытия на пептиды. Антитела NI-308.15O7 и NI-308.28G1 нуждались не менее чем в пяти повторах дипептидов GA, тогда как антитела NI-308.18F7 и NI-308.45C2 нуждались по меньшей мере в 6 повторах GA для первого детектируемого связывания с низкой аффинностью связывания при ЭК₅₀ >100 нМ (фиг. 7A, F-I). Высокоаффинное связывание детектировали для поли-GA DPR, несущих 10 или 20 (GA)-повторов, о чем свидетельствует величина ЭК₅₀, которая находилась в субнанолярном или низком нанолярном диапазоне (фиг. 7A, C-I). Антитела NI-308.5G2 и NI-308.46E9 нуждались по меньшей мере в 5 и 10 GP-повторах соответственно (фиг. 7B, J и N). Высокоаффинное связывание для последних 2 антител детектировали только для удлинённых повторов пептидов поли-GP DPR-белков, несущих 10 и 20 повторов. Помимо этого антитело NI-308.5G2 нуждалось по меньшей мере в 6 GA-дипептидных повторах для первого детектируемого связывания с низкой аффинностью связывания при ЭК₅₀ >100 нМ (фиг. 7A и K). Высокоаффинное связывание детектировали для поли-GA DPR, несущих 10 или 20 повторов GA, о чем свидетельствовала величина ЭК₅₀, которая находилась в низком нанолярном диапазоне (фиг. 7A и K). Антитело NI-308.6B11 нуждалось по меньшей мере в 3 повторах GR (фиг. 7C и L). Высокоаффинное связывание для указанного антитела детектировали для пептидов поли-GR DPR-белков, несущих по меньшей мере 5 дипептидных повторов GR (фиг. 7C и L). Помимо этого антитело NI-308.6B11 нуждалось по меньшей мере в 6 дипептидных повторах GA для первого детектируемого связывания с низкой аффинностью при ЭК₅₀ >100 нМ (фиг. 7A и M). Высокоаффинное связывание детектировали для поли-GA DPR, несущих 10 или 20 повторов GA, о чем свидетельствовала величина ЭК₅₀, которая находилась в низком нанолярном диапазоне (фиг. 7A и M). Антитело NI-308.24E11 нуждалось по меньшей мере в 6 дипептидных повторах PR (фиг. 7D и O), тогда как антитело NI-308.4M1 нуждалось по меньшей мере в пяти повторах PA (фиг. 7E и P) для первого детектируемого связывания с низкой аффинностью при ЭК₅₀ >100 нМ или с двузначной величиной аффинности связывания в нанолярном диапазоне соответственно. Высокоаффинное связывание для последних 2 антител детектировали только при большой длине повторов поли-PR и поли-PA DPR, несущих 10 или 20 повторов соответственно, о чем свидетельствовала величина ЭК₅₀, которая находилась в низком нанолярном или субнанолярном диапазоне (фиг. 7D, E, O и P). В заключение следует отметить, что связывание происходящих от человека антител к C9ORF72-DPR с DPR пептидами зависело от длины повтора, при этом отсутствовало связывание с короткими повторами, и предпочтительная высокая аффинность связывания была обнаружена для удлинённых дипептидных повторов.

Пример 9. Определение характеристик связывания в зависимости от длины повтора методом ИФА в формате "сэндвич".

Проводили определение аффинности связывания рекомбинантных происходящих от человека антител NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.18F7 и NI-308.5G2 с C9ORF72-DPR-белками различных размеров. В общих чертах, His-меченые пептиды белков, содержащих дипептидные повторы, синтезировали и очищали в компании Schafer-N (Копенгаген, Дания): GA₂₀: H-(GA)₂₀НННННННН-NH₂; GA₁₀: H-(GA)₁₀НННННННН-NH₂; GA₆: H-(GA)₆НННННННН-NH₂; GA₅: H-(GA)₅НННННННН-NH₂; GA₄: H-(GA)₄НННННННН-NH₂; GA₃: H-(GA)₃НННННННН-NH₂; GA₂: H-(GA)₂НННННННН-NH₂; GP₂₀: H-(GP)₂₀НННННННН-NH₂; GP₁₀: H-(GP)₁₀НННННННН-NH₂; GP₆: H-(GP)₆НННННННН-NH₂; GP₅: H-(GP)₅НННННННН-NH₂; GP₄: H-(GP)₄НННННННН-NH₂; GP₃: H-(GP)₃НННННННН-NH₂; GP₂: H-(GP)₂НННННННН-NH₂. 96-луночные микропланшеты (Corning Incorporated, Корнинг, США) покрывали моноклональным антителом мыши к His-метке (Takara Bio Europe/Clontech, Сен-Жермен-ан-Ле, Франция) в концентрации 10 мкг/мл в покрывающем буфере (15 мМ Na₂CO₃, 35 мМ NaHCO₃, pH 9,42) в течение ночи при 4°C. Неспецифичные сайты связывания блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием ФСБ/0,1% твин®-20, содержащего 2% БСА (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария). После этапа промывки His-меченые пептиды C9ORF72-DPR-белков в равной концентрации 1 или 5 мкМ в ФСБ (pH 7,4) вносили для захвата мишени с помощью антитела к His-метке в течение 1 ч при комнатной температуре. После дополнительного эта-

па промывки антитела NI-308 разводили в ФСБ/0,1% твин®-20, содержащем 2% БСА (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария), до указанных концентраций и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Связывание антител с пептидами DPR-белков детектировали с помощью антитела ослы к IgG Fcγ человека, конъюгированного с пероксидазой хрена, использованного в разведении 1:5000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест-Грув, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Связывание определяли путем измерения активности ПХ с помощью стандартного колориметрического количественного способа исследований. Значения ЭК₅₀ оценивали с помощью нелинейной регрессии, используя программное обеспечение GraphPad Prism (Сан-Диего, США). Аффинность связывания выбранных антител NI-308 в отношении C9ORF72-DPR-белков с различной длиной повторов определяли после захвата His-метки DPR-белков методом ИФА в формате "сэндвич". Антитела NI-308.15O7, NI-308.18F7, NI-308.28G1 нуждались по меньшей мере в 10 GA-повторах для связывания в растворе с пептидами поли-GA DPR-белков (фиг. 8А, С-Е). Величины аффинности связывания антител NI-308.18F7 и NI-308.28G1 находились в субнаномолярном диапазоне и были эквивалентны для пептидов (GA)₁₀ и (GA)₂₀ DPR-белков (фиг. 8А, D и E). Антитело NI-308.15O7 проявило высокую аффинность связывания только для удлиненного пептида (GA)₂₀ DPR-белка (фиг. 8А и С). Антитело NI-308.5G2 проявило сходные величины аффинности связывания в зависимости от длины удлиненных повторов поли-GP DPR-белков, при этом достоверное связывание наблюдали только при 20 GP-повторах (фиг. 8В и F). В заключение следует отметить, что связывание происходило от человека антител к C9ORF72-DPR с DPR-белками существенно зависело от длины повтора, при этом связывание с короткими повторами отсутствовало, и предпочтительная высокая аффинность связывания была обнаружена для удлиненных дипептидных повторов.

Наблюдаемая селективность в отношении удлиненных DPR была еще более выраженной после захвата антигена по сравнению с пептидами с гидрофобным покрытием (пример 9).

Пример 10. Исследование связывания с мономерными и агрегированными C9ORF72-DPR.

Проводили определение специфичности связывания и полумаксимальной эффективной концентрации (ЭК₅₀) рекомбинантных происходящих от человека антител NI-308.18F7 и NI-308.15O7 с мономерными и агрегированными GA C9ORF72-DPR-белками.

Способы.

Пептид C9ORF72-DPR-белка.

Белок, содержащий дипептидный повтор (GA)₂₀ (H-(GA)₂₀NNNNNNH-NH₂), синтезировали и очищали в компании Schafer-N (Копенгаген, Дания). Лиофилизированный пептид растворяли в ДМСО до концентрации 10 мг/мл (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария).

Получение мономерных и фибриллярных агрегированных препаратов пептида (GA)₂₀ DPR-белка.

Для того чтобы получить препарат мономерного DPR-белка, пептиды (GA)₂₀ растворяли до конечной концентрации 200 мкг/мл в карбонатном буфере (15 мМ Na₂CO₃, 35 мМ NaHCO₃, pH 9,42) и немедленно замораживали при -80°C. Чтобы получить агрегаты DPR, пептиды (GA)₂₀ растворяли до конечной концентрации 200 мкг/мл в буфере на основе ацетата натрия (50 мМ C₂H₃O₂Na, 100 мМ KCl и 1 мМ ЭДТА, pH 3,0) и инкубировали в течение 72 ч при комнатной температуре при встряхивании (600 об/мин). Препараты пептидов хранили при -80°C до использования.

Просвечивающая электронная микроскопия.

Образцы адсорбировали на обработанных тлеющим разрядом медных решетках с углеродным покрытием. Избыток образца удаляли с помощью промокания фильтровальной бумагой. Решетки окрашивали 2% (мас./об.) ацетатом уранила в течение 1 мин и избыток ацетата уранила промывали дистиллированной деионизированной водой. Решетки сушили на воздухе и визуализировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Philips CM100 с ускоряющим напряжением 100 кВ.

Непрямой ИФА.

96-луночные микропланшеты (Corning Incorporated, Корнинг, США) покрывали препаратами мономерных и агрегированных пептидов (GA)₂₀ DPR-белков в концентрации 5 мкг/мл в покрывающем буфере (15 мМ Na₂CO₃, 35 мМ NaHCO₃, pH 9,42). Неспецифичные сайты связывания блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием ФСБ/0,1% твин®-20, содержащего 2% БСА (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария). Первичные антитела разбавляли до указанных концентраций и инкубировали 1 ч при комнатной температур, и затем инкубировали с антителом ослы к IgG Fcγ человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест-Грув, США). Связывание определяли путем измерения активности ПХ с помощью стандартного колориметрического количественного способа исследований. Значения ЭК₅₀ оценивали с помощью нелинейной регрессии, используя программное обеспечение GraphPad Prism (Сан-Диего, США).

ИФА в формате "сэндвич".

96-луночные микропланшеты (Corning Incorporated, Корнинг, США) покрывали моноклональным антителом мыши к His-метке (Takara Bio Europe/Clontech, Сен-Жермен-ан-Ле, Франция) в концентрации 10 мкг/мл в покрывающем буфере (15 мМ Na₂CO₃, 35 мМ NaHCO₃, pH 9,42) в течение ночи при 4°C. Неспецифичные сайты связывания блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре в ФСБ/0,1% твин®-20, содержащем 2% БСА (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария). После этапа промывки препараты His-

меченых пептидов (GA)₂₀ DPR-белка в равной концентрации 5 мкМ в ФСБ (рН 7,4) добавляли для целевого захвата с помощью антитела к His-метке в течение 1 ч при комнатной температуре. После дополнительного этапа промывки антитела NI-308 разводили в ФСБ/0,1% твин®-20, содержащем 2% БСА (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария), до указанных концентраций и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Связывание антител с пептидами DPR-белков детектировали с помощью антитела осли к IgG Fcy человека, конъюгированного с пероксидазой хрена, использованного в разведении 1:5000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест-Грув, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Связывание определяли путем измерения активности ПХ с помощью стандартного колориметрического количественного способа исследований. Значения ЭК₅₀ оценивали с помощью нелинейной регрессии, используя программное обеспечение GraphPad Prism (Сан-Диего, США).

Полученные результаты выявили, что (GA)₂₀ C9ORF72-DPR-белки легко агрегируют при старении в кислых условиях с образованием структур, сходных с таковыми для амилоидных фибрилл, согласно данным просвечивающей электронной микроскопии (фиг. 10B). В отличие от этого в щелочных условиях пептид (GA)₂₀ DPR-белка не образовывал фибриллярные агрегаты и, вероятно, оставался в мономерном состоянии (фиг. 10A). Специфичность связывания и аффинность связывания (ЭК₅₀) происходящих от человека антител, NI-308.18F7 и NI-308.15O7, в отношении препаратов мономерного и агрегированного пептида (GA)₂₀ C9ORF72-DPR-белка определяли с помощью исследования связывания методом прямого ИФА и ИФА в формате "сэндвич". Оба антитела распознавали препараты мономерного и агрегированного пептида (GA)₂₀ DPR-белка (фиг. 9, 11 и 12) с сопоставимыми величинами аффинности связывания. Как сообщалось, поли-(GA) DPR-белок является наиболее распространенной разновидностью пептидов при C9ORF72-FTLD (Mori et al., Acta Neuropathol. 2013). (GA)₂₀ белки, содержащие дипептидные повторы, легко агрегируют с образованием амилоидоподобных фибриллярных структур при старении в кислых, но не в основных условиях. Происходящие от человека антитела NI-308.18F7 и NI-308.15O7 распознают с сопоставимыми величинами аффинности связывания препараты мономерных и агрегированных (GA)₂₀ DPR в двух независимых исследованиях связывания. Указанные антитела, следовательно, являются подходящими кандидатами для нацеленного воздействия на патологические белки GA DPR в растворимой, а также нерастворимой конформации.

Пример 11. Исследования целостности антител с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ.

Проводили оценку чистоты и целостности рекомбинантных антител человека NI-308. В общих чертах, антитела человека NI-308 экспрессировали с помощью кратковременной трансфекции клеток CHO-S и очищали с помощью аффинной очистки на белке А на системе FPLC (АКТАpurifier; GE Healthcare Life Sciences). После обессоливания колонки PD-10 (GE Healthcare Life Sciences) антитела растворяли в ФСБ. По пять мкг очищенных рекомбинантных антител человека NI-308 разделяли в восстанавливающих условиях с помощью градиентного электрофореза в ДСН-ПААГ (4-12% бис-трис гели Novex® NuPAGE®; Life Technologies Europe B.V., Цуг, Швейцария) с помощью подвижного буфера MES-ДСН Novex® NuPAGE®, дополненного антиоксидантом (Life Technologies Europe B.V., Цуг, Швейцария), с последующим окрашиванием кумасси синим (Novex® SimplyBlue™ SafeStain, Life Technologies Europe B.V., Цуг, Швейцария). Результаты исследования рекомбинантных антител человека NI-308 методом электрофореза в ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях выявили две основные полосы, соответствующие тяжелым и легким цепям антитела с ожидаемым размером. Не было обнаружено существенных загрязнений или продуктов протеолитического разрушения (фиг. 13).

Пример 12. Исследование связывания с патологическими агрегатами DPR в посмертных образцах ткани человека с C9ORF72-FTLD и неврологических контрольных тканях мозга.

Проводили оценку связывания антител NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.5G2 и NI-308.4M1 с C9ORF72 DPR-белками в посмертных тканях мозжечка, полученных от пациентов с C9ORF72-FTLD, а также в неврологических контрольных тканях. В общих чертах, фиксированные формалином и залитые парафином срезы толщиной 5 мкм участков мозжечка 3-х пациентов с FTLD, имевших удлиненные гексануклеотидные повторы C9ORF72, и 1 неврологического контрольного пациента (BiOBANC HCB-IDIBAPS, Барселона, Испания) предварительно обрабатывали для извлечения антигена путем нагрева в 1 мМ ЭДТА-буфере, рН 8,3, и обработки микроволновым излучением в течение 12 мин (600 Вт). Тушение эндогенной активности пероксидаз достигали путем обработки 3% H₂O₂ в метаноле в течение 10 мин при комнатной температуре. Неспецифичные сайты связывания блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием ФСБ/5% сыворотки (лошади/козы)/4% БСА. После этапа блокирования срезы инкубировали с происходящими от человека антителами NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.5G2 и NI-308.4M1 в концентрации 5 нМ или контрольным антителом C9RANT в разведении 1:5000 (Novus Biologicals, Литтлтон, США) в течение ночи при 4°C. Детектирование проводили с использованием биотинилированного антитела осли к IgG человека (H+L) (разведение 1:350, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест-Грув, США) или вторичного антитела кролика (разведение 1:250, Vector Laboratories; Burlingame, США), сигнал антител амплифицировали с использованием набора Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Берлингем, США) и детектировали с использованием диаминобензидина (DAB, Thermo Scientific, Рокфорд, США). Срезы закрепляли с помощью среды для закрепления Eukitt® (O. Kindler

GmbH; Фрейбург, Германия). Визуализацию в светлом фоне проводили с помощью слайд-сканера Dotslide VS120 (Olympus Schweiz AG, Швейцария). Связывание NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.5G2 и NI-308.4M1 с патологическими C9ORF72-DPR-белками количественно оценивали с помощью иммуногистохимического исследования срезов мозжечка пациентов с FTLD и не неврологических контрольных субъектов. Как показано на фиг. 14А и В, происходящие от человека антитела NI-308.18F7, NI-308.15O7 и NI-308.5G2 выявили выраженные нейрональные цитоплазматические включения, нейрональные внутриядерные включения и дистрофические нейриты в слое гранулярных клеток мозжечка всех трех испытанных случаев C9ORF72-FTLD, напротив, не неврологический контрольный мозжечок был отрицательным для всех испытанных антител (фиг. 14А). Как показано на фиг. 14С, антитело NI-308.4M1 выявило нейрональные цитоплазматические включения и нейрональные внутриядерные включения в слое гранулярных клетках мозжечка пациента с C9ORF72-FTLD, но не в не неврологическом контрольном случае. В заключение следует отметить, что происходящие от человека антитела NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.5G2 и NI-308.4M1 специфично детектируют агрегаты C9ORF72-DPR-белка в слое гранулярных клеток мозжечка пациентов с C9ORF72-FTLD, в то время как в контрольном мозжечке не наблюдали окрашивания, что указывает на высокую специфичность антител в отношении мишени.

Пример 13. Связывание антител человека с коагрегированными молекулами DPR при FTLD.

Проводили оценку локализации различных молекул C9ORF72-DPR-белков в посмертных образцах тканей мозжечка пациентов-людей с FTLD, несущих удлиненные гексануклеотидные повторы C9ORF72. В общих чертах, антитело NI-308.18F7 непосредственно конъюгировали с флуоресцентным красителем Атто488, используя набор для мечения белков Атто488 (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария) согласно инструкциям изготовителя. Антитело NI-308.5G2 непосредственно конъюгировали с Атто550, используя набор для мечения белков Атто550 (Sigma-Aldrich, Бух, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя. Для проведения иммунофлуоресцентных гистохимических экспериментов фиксированные формалином и залитые парафином срезы толщиной 5 мкм участков мозжечка пациента с FTLD, несущего удлиненные гексануклеотидные повторы C9ORF72 (BiOBANC HCB-IDIBAPS, Барселона, Испания), предварительно обрабатывали для извлечения антигена путем нагревания в 1 мМ ЭДТА=буфере, pH 8,3 и обработки микроволновым излучением в течение 12 мин (600 Вт). Неспецифичные сайты связывания блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием ФСБ/5% сыворотки (лошади/козы)/4% БСА. После этапа блокирования срезы инкубировали с антителами человека NI-308.18F7-Атто 488 и NI-308.5G2-Атто 550 в концентрации 5 нМ в течение 2 ч при комнатной температуре. После иммунного окрашивания срезы тканей инкубировали с 0,1%-ным раствором Судана черного в течение 10 мин при комнатной температуре для уменьшения флуоресценции тканей. Ядерное контрастирование проводили путем окрашивания нуклеиновых кислот DAPI (разведение 1:1000 5 мг/мл исходного раствора, Molecular Probes®, Life Technologies Europe BV, Цуг, Швейцария). Срезы закрепляли с использованием среды для закрепления Hydromount (National Diagnostics, Атланта, США). Визуализацию флуоресценции проводили с помощью слайд-сканера Dotslide VS120 (Olympus Schweiz AG, Швейцария).

Локализацию C9ORF72 поли-GA и поли-GP DPR-белков в слое гранулярных клеток мозжечка пациента с FTLD, несущего удлиненный гексануклеотидный повтор C9ORF72, оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. Как показано на фиг. 15, антитело NI-308.18F7 распознавало широко распространенные нейрональные цитоплазматические и внутриядерные включения C9ORF72 поли-GA (левая панель, сигнал для зеленого окрашивания). В выбранных экспериментальных условиях антитело NI-308.5G2 детектировало более редкие патологии цитоплазматических и внутриядерных включений поли-GP (центральная панель, сигнал для красного окрашивания). Значительная доля агрегатов поли-GP DPR-белков была колокализирована с агрегатами поли-GA DPR-белков (левая панель, сигнал для желтого окрашивания), это указывает на то, что оба DPR-белка могут совместно агрегировать с образованием патологических включений.

Пример 14. Клеточные модели для исследования патогенных механизмов C9ORF2-DPR-белков.

Последние сообщения, полученные на новых культурах клеток и животных моделях, представили доказательства токсичности aberrантных C9ORF72-DPR-белков. Например, было обнаружено, что у мух и в некоторых модельных культурах клеток особенно богатые аргинином DPR-белки (поли-GR и поли-PR) являются токсичными (Kwon et al., Science 345 (2014), 1139-1145; Mizielinska et al., Science 345 (2014), 1192-1194; Tao et al., Hum. Mol. Genet. 24 (2015), 2426-2441; Wen et al., Neuron 84 (2014), 1213-1225; Yang et al., Acta Neuropathol. 130 (2015), 525-535) вследствие индукции образования ядерных включений и ядерного стресса, в то время как другие авторы сообщали о токсичности цитоплазматических агрегатов поли-GA в культурах клеток (May et al., Acta Neuropathol. 128 (2014), 485-503; Zhang et al., Acta Neuropathol. 128 (2014), 505-524).

Для того чтобы определить, можно ли, как показано для белков тау (Yanamandra et al., Ann. Clin. Transl. Neurol. 2 (2013), 278-288) и α -синуклеина (Tran et al., Cell Rep. 7 (2014), 2054-2065), предотвратить распространение DPR-патологии путем обработки антителами согласно настоящему изобретению, проводили аналогичные количественные исследования токсичности C9ORF72-DPR в условиях *in vitro*. В частности, синтетические последовательности ДНК получали для контроля экспрессии отдельных DPR-

белков, несущих 150 дипептидных повторов при ATG-зависимой трансляции. Стратегию рандомизированных кодонов использовали, чтобы обеспечить экспрессию только выбранной индивидуальной последовательности DPR-белка. Для того чтобы контролировать экспрессию DPR-белков в нервных клетках, таких как SH-SY5Y, NSC-34, нейро-2а, нейроны, полученные из иПСК, и первичные нейроны, синтетические последовательности ДНК клонировали в вектор экспрессии, регулируемый нейронспецифичным промотором Thy-1.2. Для получения высокого уровня экспрессии в широком диапазоне эукариотических клеток, таких как HEK293T U-2 OS, HeLa и клетки COS, синтетические последовательности ДНК клонировали в векторы экспрессии, регулируемые промотором CMV. Нейроны, полученные из иПСК человека, и трансдифференцированные нейроны (iNeurons), полученные из фибробластов пациента с C9ORF72, представляют собой дополнительные модели культур клеток, несущих C9ORF72-DPR белки.

Указанные клеточные модели можно применять для испытания терапевтического применения антител согласно настоящему изобретению. Оценку и подтверждение терапевтического действия антител согласно настоящему изобретению можно выполнять путем мониторинга жизнеспособности клеток с помощью количественного исследования митохондрий и/или активности каспаз, токсичности клеток путем количественного исследования цитолиза и/или текучести мембран и ингибирования распространения клеточных DPR-белков с помощью иммуногистохимических количественных способов.

Пример 15. Трансгенные мышинные модели для исследования патогенетических механизмов C9ORF72-DPR-белков.

Иммунотерапевтические подходы, разработанные в отношении склонных к агрегации и/или неправильно свернутых белков, дали многообещающие результаты в доклинических и клинических исследованиях ряда нейродегенеративных заболеваний. В последнее время были разработаны трансгенные мышинные модели, которые воспроизводят патологические особенности ALS/FTLD, опосредованных удлинёнными гексануклеотидными повторами C9ORF72 (Chew et al., Science 348 (2015), 1151-1154 и международная заявка WO 2014/159247 A1). Чтобы получить указанные мышинные модели, использовали конструкции бактериальных искусственных хромосом, несущих полноразмерный или укороченный ген C9ORF72, содержащий удлинённые гексануклеотидные повторы (от ~450 до 500 гексануклеотидных повторов), или аденоассоциированный вирусный вектор, несущий последовательность 66 гексануклеотидных повторов C9ORF72. В указанных моделях в центральной нервной системе мышей детектировали очаговые скопления ядерных РНК и DPR-белков, опосредованные удлинёнными гексануклеотидными повторами C9ORF72. Помимо этого в различных трансгенных мышинных моделях наблюдали патологические признаки C9ORF72-опосредованных заболеваний, такие как потеря нейронов, поведенческие нарушения, двигательные дефекты и пониженная выживаемость. Указанные мышинные модели можно применять для исследования терапевтической пригодности антител согласно настоящему изобретению. В частности, антитела, которые подвергают скринингу, можно вводить животным различными путями, такими как внутрибрюшинная инъекция антител, внутримозговая инъекция, внутримозговая инъекция, внутримозговая инъекция в мозг, и исследовать их терапевтическую эффективность.

Благодаря эволюционной оптимизации и созреванию аффинности в иммунной системе человека антитела человека согласно настоящему изобретению обеспечивают важный терапевтический инструмент, поскольку они выделены у здоровых субъектов-людей и с высокой вероятностью обеспечат превосходный профиль безопасности и отсутствие иммуногенности. Ожидаемое терапевтическое действие может быть подтверждено результатами исследований, описанных в вышеупомянутых публикациях, с использованием антител человека вместо мышинных антител.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, которые связываются с белком, содержащим дипептидный повтор (DPR-белок) поли-глицин-аланин (GA)₁₅, транслируемый с открытой рамки считывания 72 (C9ORF72) хромосомы 9, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области, определяющие комплементарность VH (CDR) 1, 2 и 3, при этом указанные CDR VH 1, 2 и 3 содержат аминокислотные последовательности, приведенные в положениях аминокислот 32-36 SEQ ID NO:8, положениях аминокислот 51-67 SEQ ID NO:8 и положениях аминокислот 100-113 SEQ ID NO:8 соответственно, и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую области, определяющие комплементарность VL (CDR) 1, 2 и 3, при этом указанные CDR VL 1, 2 и 3 содержат аминокислотные последовательности, приведенные в положениях аминокислот 25-35 SEQ ID NO: 10, положениях аминокислот 51-57 SEQ ID NO: 10 и положениях аминокислот 90-98 SEQ ID NO: 10 соответственно.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанная VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанная VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или вариант аминокис-

лотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержащий делецию одной аминокислоты.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанная VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанная VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, содержащий делецию одной аминокислоты.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанная VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанная VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержащий делецию одной аминокислоты, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, содержащий делецию одной аминокислоты.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-7, отличающиеся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина, при этом указанная тяжелая цепь иммуноглобулина содержит константную область IgG1 человека, и при этом указанная легкая цепь содержит константную область каппа человека.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-8, отличающиеся тем, что указанное антитело или фрагмент содержат детектируемую метку.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по п.9, отличающиеся тем, что указанная детектируемая метка выбрана из группы, состоящей из фермента, радиоактивного изотопа, флуорофора и тяжелого металла.

11. Фармацевтическая композиция для диагностики заболевания или расстройства, связанного с DPR-белками и/или агрегатами C9ORF72, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, отличающаяся тем, что указанное заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из лобно-височной долевого дегенерации (FTLD), латерального амиотрофического склероза (ALS) и FTLD-ALS.

13. Фармацевтическая композиция по п.11 или 12, отличающаяся тем, что указанная композиция приготовлена в форме для интратекальной, внутривенной или подкожной доставки.

14. Полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий VH антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-8.

15. Полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий VL антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-8.

16. Полинуклеотид, кодирующий первый полипептид, содержащий VH антитела или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-8, и второй полипептид, содержащий VL антитела или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-8.

17. Полинуклеотид по п.14 или 15, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид дополнительно содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую обеспечивающий секрецию сигнальный пептид.

18. Экспрессионный вектор для экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-8, содержащий промотор, функционально связанный с полинуклеотидом по любому из пп.14-16.

19. Экспрессионный вектор для экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-8, содержащий

первый промотор, функционально связанный с первым полинуклеотидом, кодирующим первый полипептид, содержащий VH антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-8, и

второй промотор, функционально связанный со вторым полинуклеотидом, кодирующим второй полипептид, содержащий VL антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-8.

20. Клетка-хозяин для экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-8, содержащая экспрессионный вектор по любому из п.18 или 19.

21. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-8, указанный способ включает

культивирование клетки-хозяина, содержащей экспрессионный вектор или экспрессионные векторы, кодирующие антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-8, в культуре клеток;

и выделение указанного антитела или фрагмента из указанной культуры клеток.

22. Способ диагностики расстройства, связанного с белком, содержащим дипептидные повторы (DPR-белком), у субъекта, представляющего собой человека, при этом указанный способ включает получение образца от указанного субъекта,

определение присутствия молекул DPR-белка или его фрагментов в указанном образце от указанного субъекта,

при этом присутствие в указанном образце молекул DPR-белка или его фрагментов определяют с использованием антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-10, при этом присутствие молекул DPR-белка или его фрагментов в указанном образце указывает на наличие лобно-височной долевого дегенерации (FTLD) и/или латерального амиотрофического склероза (ALS).

23. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-10 для *in vivo* детекции белка, содержащего дипептидный повтор (DPR) поли-глицин-аланин (GA) у субъекта, представляющего собой человека, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент соединены с детектируемой меткой.

24. Применение по п.23, которое включает введение указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела по любому из пп.1-10 субъекту, который представляет собой человека.

25. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-10 для получения композиции для профилактического или терапевтического лечения заболевания, связанного с белком, содержащим дипептидные повторы (DPR), или его агрегированными формами.

26. Применение по п.25, где указанный белок, содержащий DPR, содержит повтор полиглицин-аланин (GA).

27. Применение по п.25 или 26, отличающееся тем, что указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из лобно-височной долевого дегенерации (FTLD), латерального амиотрофического склероза (ALS) и FTLD-ALS.

28. Применение по любому из пп.25-27, отличающееся тем, что указанная композиция приготовлена в форме для интратекальной, внутривенной или подкожной доставки.

29. Фармацевтическая композиция для профилактического или терапевтического лечения заболевания, связанного с белком, содержащим дипептидные повторы (DPR), или его агрегированными формами, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

30. Фармацевтическая композиция по п.29, где указанный белок, содержащий DPR, содержит повтор полиглицин-аланин (GA).

31. Фармацевтическая композиция по п.29 или 30, отличающаяся тем, что указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из лобно-височной долевого дегенерации (FTLD), латерального амиотрофического склероза (ALS) и FTLD-ALS.

32. Фармацевтическая композиция по любому из пп.29-31, отличающаяся тем, что указанная композиция приготовлена в форме для интратекальной, внутривенной и подкожной доставки.

33. Способ детекции *in vivo* белка, содержащего дипептидный повтор (DPR) поли-глицин-аланин (GA) у субъекта, представляющего собой человека, включающее введение указанному субъекту, представляющему собой человека, антитела или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-10, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент соединены с детектируемой меткой; и детекцию указанного антитела или его фрагмента.

34. Способ профилактического или терапевтического лечения заболевания, связанного с белком, содержащим дипептидные повторы (DPR), или его агрегированными формами, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества антитела по любому из пп.1-10 или фармацевтической композиции по любому из пп.11-13 или 29-32.

35. Способ по п.34, согласно которому указанный белок, содержащий DPR, содержит повтор поли-глицин-аланин (GA).

36. Способ по п.34 или 35, отличающийся тем, что указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из лобно-височной долевого дегенерации (FTLD), латерального амиотрофического склероза (ALS) и FTLD-ALS.

37. Способ по любому из пп.34-36, отличающийся тем, что указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела или указанную фармацевтическую композицию вводят указанному субъекту посредством интратекального, внутривенного и подкожного введения.

(A) NI-308.18F7 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH) (NI-308.A VH)

```
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
CQVQLQESGPGLVKPSSETLSVCTCTVSGGSINDYYNNWIRQAPKGLEWIGRIYASGTINYNP
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
SLQSRVTMSIDTSKNQFSLDLISVSAADTAVYYCARWGQVVGDDYYGMDVWGQGTITVTVSS
```

NI-308.18F7 Vk (последовательность вариательной области легкой цепи Vk) (NI-308.A Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CEIVLTQSPPLSLVTPGEPASISCKSSQSLQHTNGYNYLDWYLLKPGQSPQLLIFLTSNRRAS
FR3-----CDR3--FR4-----
GVPDFRFGSGSGTNTFLKISRVEAEDVGYYCMEGIQLWTFGQGTKLEIK
```

NI-308.18F7 Vk - PIMC (последовательность вариательной области легкой цепи Vk) (NI-308.A Vk-PIMC)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CDIVMTQSPPLSLVTPGEPASISCKSSQSLQHTNGYNYLDWYLLKPGQSPQLLIFLTSNRRAS
FR3-----CDR3--FR4-----
GVPDFRFGSGSGTNTFLKISRVEAEDVGYYCMEGIQLWTFGQGTKLEIK
```

(B) NI-308.1507 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH) (NI-308.B VH)

```
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
CQVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSNHAMHWVRQAPKGLEWVAVISYDGENTYYA
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
DSIEGRFTISRDNFKNTFLQMYSLTADDTAMVFCARGGRGHFTSYYLDYWGQGTITVTVSS
```

NI-308.1507 Vk (последовательность вариательной области легкой цепи Vk) (NI-308.B Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3--
CDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQNIDKYLNWYQQIPGKAPKLLIYAASSLHSGVPSR
-----CDR3-----FR4-----
FSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFAIYYCQQSYSSFRTFGQGTKLEIK
```

NI-308.1507 Vk-PIMC (последовательность вариательной области легкой цепи Vk) (NI-308.B Vk-PIMC)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3--
CDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQNIDKYLNWYQQIPGKAPKLLIYAASSLHSGVPSR
-----CDR3-----FR4-----
FSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFAIYYCQQSYSSFRTFGQGTKLEIK
```

(C) NI-308.28G1 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLQESGPRLVKPSSETLSLTCTVAGGSVNSYYWTWIQQSPGKGLEWLGRIYIAGRTNYPN
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
SLTSRIALSVDTSRNQLSLKLTSVTAADTAIYYCARWGAESGDYYGVVDWGPGLTVTVSS
```

NI-308.28G1 Vk (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CEIVMTQSPPLSLPVTGEPASISCKSSEGLLHSGYTYLDWYLLKPGQAPQLLIFLASNRAA
FR3-----CDR3-----FR3-----
GVPDFRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQAIQSPWTFGPGTKVEIK
```

NI-308.28G1 VH - PIMC (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLQESGPRLVKPSSETLSLTCTVAGGSVNSYYWTWIQQSPGKGLEWLGRIYIAGRTNYPN
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
SLTSRIALSVDTSRNQLSLKLTSVTAADTAIYYCARWGAESGDYYGVVDWGPGLTVTVSS
```

NI-308.28G1 Vk - PIMC (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CDIVMTQSPPLSLPVTGEPASISCKSSEGLLHSGYTYLDWYLLKPGQAPQLLIFLASNRAA
FR3-----CDR3-----FR3-----
GVPDFRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQAIQSPWTFGPGTKVEIK
```

(D) NI-308.45C2 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQLQLQESGPGLVKPSQILSLTCAISGDSVFSNSAANNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWDN
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
DYAPSVKSRISINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVAYCGGDCYSVSFDYWGQGTI
-----
VTVSS
```

NI-308.45C2 Vk (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CEIVMTQSPPLSLPVTGEPASISCRSSQSLQSNGYTYLDWYLLKPGQSPQLLIVLGSNRRAS
FR3-----CDR3-----FR4-----
GVPDFRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQALQTPLTFGGGTKLEIK
```

NI-308.45C2 VH - PIMC (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQLQLQESGPGLVKPSQILSLTCAISGDSVFSNSAANNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWDN
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
DYAPSVKSRISINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVAYCGGDCYSVSFDYWGQGTI
-----
VTVSS
```

Фиг. 1

NI-308.45C2 Vk - PIMC (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
CDIVMTQSPSLPVPTEPASPISCRSSQSLQNGYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS
FR3-----CDR3-----FR4-----
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQALQTLTFGGGTKVEIK
```

(E) NI-308.24E11 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSTTSLRSEYFWSWIRQPPGKGLEWIGVYVYSGSTIYNP
FR3-----CDR3-----FR3-----
SLKNRVTIISIDTSKNQFSLNLRSVTAADTAMVFCARGVPAETDARDFFPPYFDHWGQGLT
VSS
```

NI-308.24E11 Vk (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
CDIQLTQSPSSLSASVGNRITFTCQASQDIRYYLNWYQQKPGKAPKLLIYDVSNLDTGVPPR
FR3-----CDR3-----FR4-----
FSGSGSGTNFTFTISSLQPEDIAVYVCQQYEGLPVTFGGGTKVEIK
```

NI-308.24E11 Vk - PIMC (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
CDIQLTQSPSSLSASVGNRITFTCQASQDIRYYLNWYQQKPGKAPKLLIYDVSNLDTGVPPR
FR3-----CDR3-----FR4-----
FSGSGSGTNFTFTISSLQPEDIAVYVCQQYEGLPVTFGGGTKVEIK
```

(F) NI-308.5G2 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CEVQLVQSGADLRNPGASVTVSCTASGYHFDNATINWLRQAPGQRLWMMGWINIYSGNTKYS
FR3-----CDR3-----FR4-----
QNFQGRVTFTRNTSASTAFMHLRLSRSEDTAVYFCARDPDSGGYLLPYFDYWGQGLT
VSS
```

NI-308.5G2 Vk (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
CDIQLTQSPDSLTLTLGERATINCKSSQSVFYNSNNKNYLAWYQQKPGQPKLLMYWASTRE
FR3-----CDR3-----FR4-----
SGVTDRFSGSGSGTDFTLTITNLQAEDVAVYCCQFYSSPLTFGGGTKVEIK
```

NI-308.5G2 VH-PIMC (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLVQSGADLRNPGASVTVSCTASGYHFDNATINWLRQAPGQRLWMMGWINIYSGNTKYS
FR3-----CDR3-----FR4-----
QNFQGRVTFTRNTSASTAFMHLRLSRSEDTAVYFCARDPDSGGYLLPYFDYWGQGLT
VSS
```

NI-308.5G2 Vk-PIMC (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
CDIVMTQSPDSLTLTLGERATINCKSSQSVFYNSNNKNYLAWYQQKPGQPKLLMYWASTRE
FR3-----CDR3-----FR4-----
SGVTDRFSGSGSGTDFTLTITNLQAEDVAVYCCQFYSSPLTFGGGTKVEIK
```

(G) NI-308.46E9 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISGSTYYWGWIRQPPGKLEYIGRIYYSGSTYY
FR3-----CDR3-----FR4-----
NPSLKRATISVDTSKNQLSLTSSVTAADTAVYCVRPFYAGSGNSPFDYWGQGLT
VSS
```

NI-308.46E9 Vk (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
CEIVLTQSPATVSVPGERATLSCRASQSVSTNLAWYQQKPGQPRLLIYGASTRATGIPAR
FR3-----CDR3-----FR4-----
FSGSGSGAEFTLTISSLQSEDFVYVYCCQYNNWPPAFGGGTKVEIK
```

NI-308.46E9 VH - PIMC (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISGSTYYWGWIRQPPGKLEYIGRIYYSGSTYY
FR3-----CDR3-----FR4-----
NPSLKRATISVDTSKNQLSLTSSVTAADTAVYCVRPFYAGSGNSPFDYWGQGLT
VSS
```

NI-308.46E9Vk - PIMC (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
CEIVMTQSPATVSVPGERATLSCRASQSVSTNLAWYQQKPGQPRLLIYGASTRATGIPAR
FR3-----CDR3-----FR4-----
FSGSGSGAEFTLTISSLQSEDFVYVYCCQYNNWPPAFGGGTKVEIK
```

(H) NI-308.6B11 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CEVQLVQSGAEVKRPGASVKVCKVSGYTLTSLSMHWVRQAPGKGLEWMMGGFDPEDGETVYA
FR3-----CDR3-----FR4-----
QKFGQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSRLSEDTALYHCATYGSSSHWNENEGSYFFDYWGQGLT
VSS
```

NI-308.6B11 Vk (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
CDIQLTQSPSSLSASVGNRITFTCQASQDISIYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSR
FR3-----CDR3-----FR4-----
FSGSGSGTDFTFTISGLQPEDVARYVCQQYDDLPTTFGQGLTLEIK
```

Фиг. 1 (продолжение)

NI-308.6B11 VH - PIMC (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGDFPEDGETVYA
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
QKFGGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDALYHCATYGSSWHNWNEGNEGSYYFDYWGQGTLL
-----
VTVSS
```

(I) NI-308.46F8 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCTASGFTFDEYGMSWVRQVPGKLEWVSGINWNGATTYYA
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
DSVKGGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDALYHCARDGCRNTSCYIWDWFDWQGTLLTVV
--
SS
```

NI-308.46F8 VL (последовательность вариательной области легкой цепи VL)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
CQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCGSSSNIGNNYVCWYQNLPGTAPKLLIYDNNKRPSPGIPD
-----CDR3-----FR4-----
RFGSGSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSVVVFGGGTKLTVL
```

NI-308.46F8 VH-PIMC (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCTASGFTFDEYGMSWVRQVPGKLEWVSGINWNGATTYYA
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
DSVKGGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDALYHCARDGCRNTSCYIWDWFDWQGTLLTVV
--
SS
```

(J) NI-308.4M1 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CEVQLVETGGGVVQPGGSLRLSCEASGFTIGTYAMHWVRQFPKGGLDWVAVISFDGTTEYYT
---FR3-----CDR3-----FR4-----
DAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNYLRGDDTAIFYCARDFTSSGETGSWTQVPDLWGQGTLLVT
---
VSS
```

NI-308.4M1 Vk (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
CEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTKYLAWYQKPGQAPRLLIYDVSYRAAGTPAR
-----CDR3-----FR4-----
FSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCHQRSSWPPVTFGGGTKVEIK
```

(J) NI-308.4M1 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCEASGFTIGTYAMHWVRQFPKGGLDWVAVISFDGTTEYYT
---FR3-----CDR3-----FR4-----
DAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNYLRGDDTAIFYCARDFTSSGETGSWTQVPDLWGQGTLLVT
---
VSS
```

NI-308.4M1 Vk (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
CEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTKYLAWYQKPGQAPRLLIYDVSYRAAGTPAR
-----CDR3-----FR4-----
FSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCHQRSSWPPVTFGGGTKVEIK
```

(K) NI-308.12A3 VH (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CEVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCVSGGLFSDFEMDWVRQAPGKLEWISYISGDGNIYYQT
---FR3-----CDR3-----FR4-----
DSVKGGRFTISRDNAKNSLFLQMDSLTVEDTAVYYCARDARENCGGDCYSTSFDFWGQGTLLVT
---
VSS
```

NI-308.12A3 Vk (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
CDIQMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLYTANNRNYLAWYQKAGQPPKLLIHWASTRA
---FR3-----CDR3-----FR4-----
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLQAEDVAVYFCQHYYNSPRTFGGQGTKVEIK
```

NI-308.12A3 VH - PIMC (последовательность вариательной области тяжелой цепи VH)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVSGGLFSDFEMDWVRQAPGKLEWISYISGDGNIYYQT
---FR3-----CDR3-----FR4-----
DSVKGGRFTISRDNAKNSLFLQMDSLTVEDTAVYYCARDARENCGGDCYSTSFDFWGQGTLLVT
---
VSS
```

NI-308.12A3 Vk - PIMC (последовательность вариательной области легкой цепи Vk)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
CDIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLYTANNRNYLAWYQKAGQPPKLLIHWASTRA
---FR3-----CDR3-----FR4-----
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLQAEDVAVYFCQHYYNSPRTFGGQGTKVEIK
```

Фиг. 1 (продолжение)

(L) NI-308.16C10 VH (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----
CEVQLVETGGGVVQPGMSLSLSCAATGFTFSSYGMHWVRQGPQGPEWVAGIWDGNTNKYYG
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
DSVTGRVTISRDNKNTLFLQMINVRVEDTAVYYCVKDAERVQKWASYIMDVWGQGTITVTVS
-
S

NI-308.16C10 Vk (последовательность вариабельной области легкой цепи Vk)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2--FR3--
CEIVLTQSPGILSLSRGNRVALSCRASRSVNSSYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASKRATGISD
-----CDR3--FR4-----
RFRGTGSGTDFTLTVARLEPEDIAVYYCQHYGAFGQGTKLEIK

NI-308.16C10 VH - PIMC (последовательность вариабельной области тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----
CQVQLVESGGGVVQPGMSLSLSCAATGFTFSSYGMHWVRQGPQGPEWVAGIWDGNTNKYYG
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
DSVTGRVTISRDNKNTLFLQMINVRVEDTAVYYCVKDAERVQKWASYIMDVWGQGTITVTVS
-
S

NI-308.16C10 Vk - PIMC (последовательность вариабельной области легкой цепи Vk)

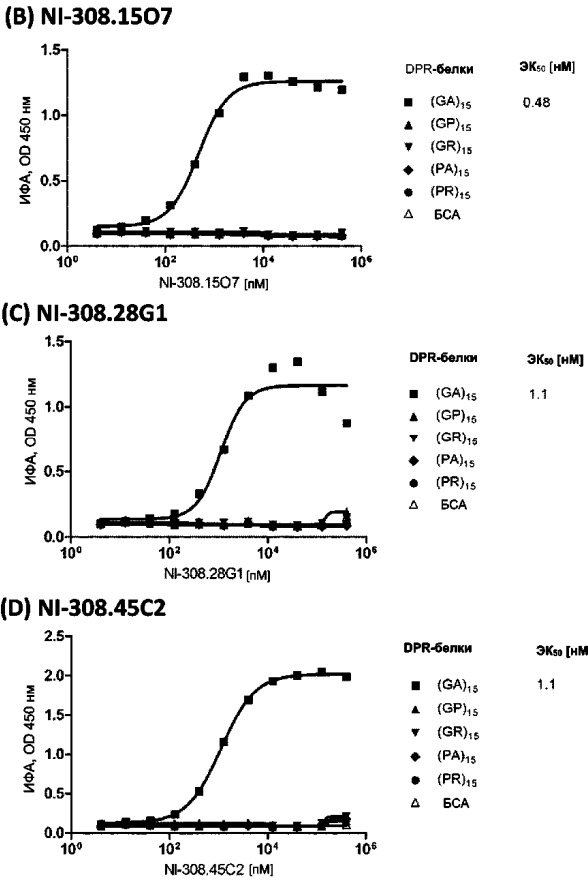
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2--FR3--
CEIVLTQSPGILSLSRGNRVALSCRASRSVNSSYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASKRATGISD
-----CDR3--FR4-----
RFRGTGSGTDFTLTVARLEPEDIAVYYCQHYGAFGQGTKVEIK

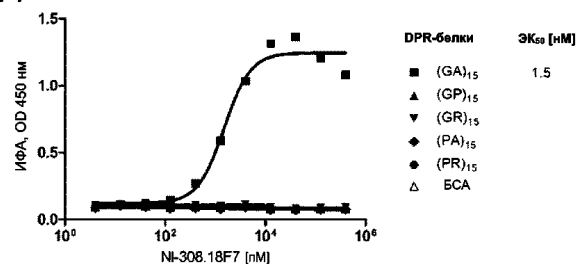
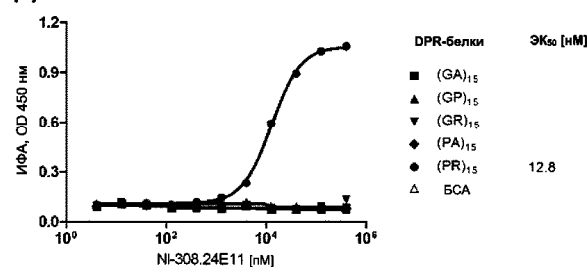
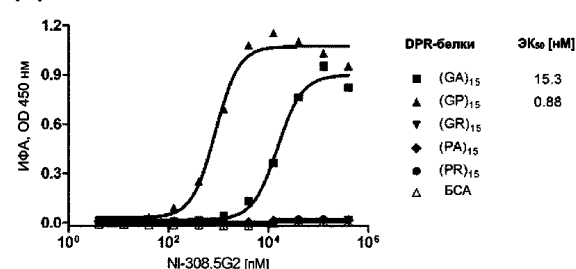
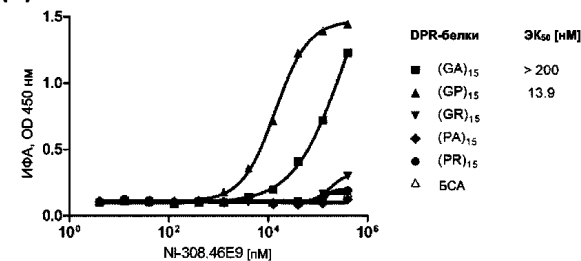
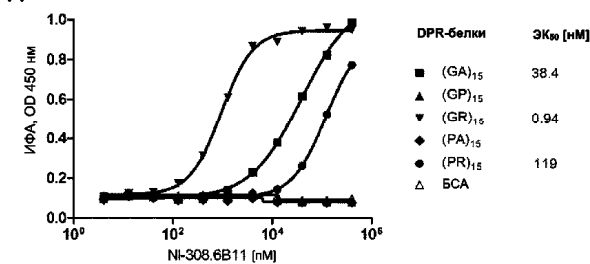
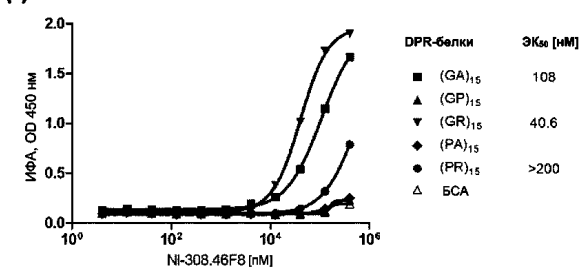
Фиг. 1 (продолжение)

(A)

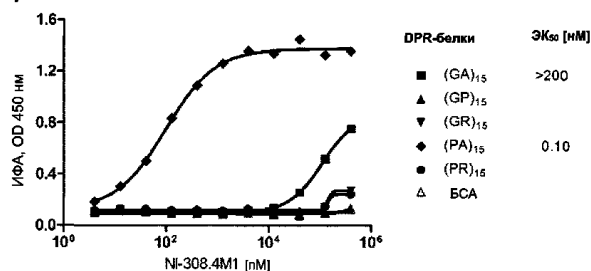
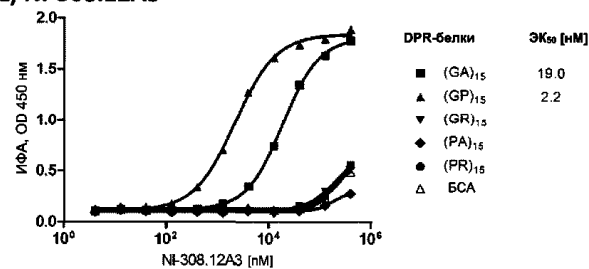
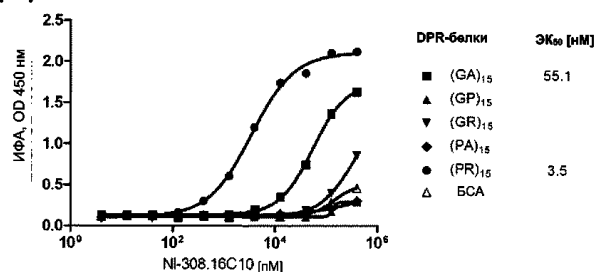
Антитело	ЭК ₅₀ [нМ]				
	(GA) ₁₅	(GP) ₁₅	(GR) ₁₅	(PR) ₁₅	(PA) ₁₅
NI-308.15O7	0.48	-	-	-	-
NI-308.28G1	1.1	-	-	-	-
NI-308.45C2	1.1	-	-	-	-
NI-308.18F7	1.5	-	-	-	-
NI-308.24E11	-	-	-	12.8	-
NI-308.16C10	55.1	-	-	3.5	-
NI-308.5G2	15.3	0.88	-	-	-
NI-203.12A3	19.0	2.2	-	-	-
NI-308.46E9	> 200	13.9	-	-	-
NI-308.6B11	38.4	-	0.94	119	-
NI-308.46F8	108	-	40.6	> 200	-
NI-308.4M1	> 200	-	-	-	0.10

Фиг. 2



(E) NI-308.18F7**(F) NI-308.24E11****(G) NI-308.5G2****(H) NI-308.46E9****(I) NI-308.6B11****(J) NI-308.46F8**

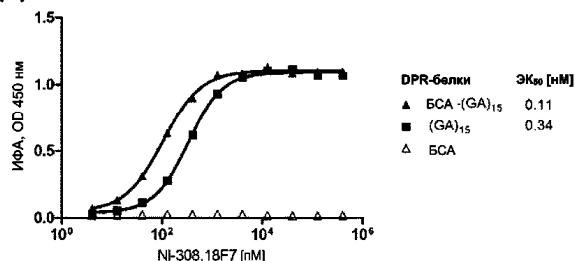
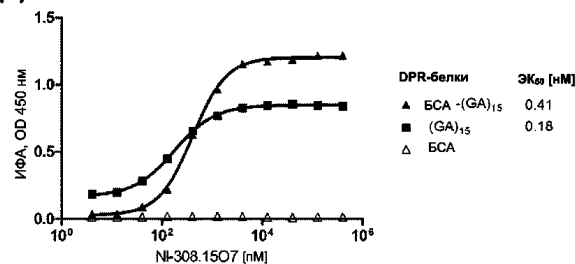
Фиг. 2 (продолжение)

(K) NI-308.4M1**(L) NI-308.12A3****(M) NI-308.16C10**

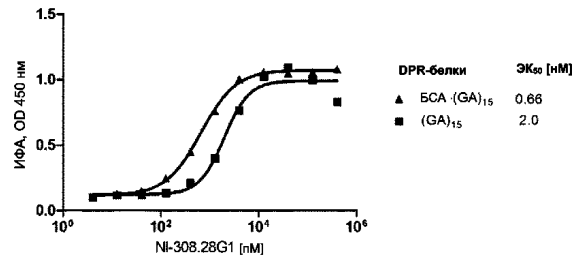
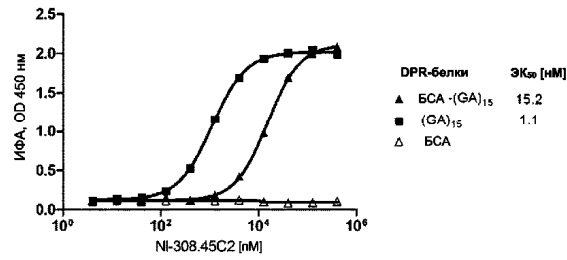
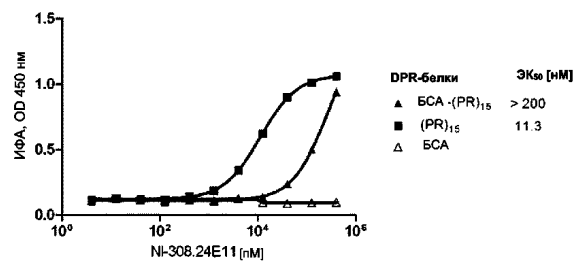
Фиг. 2 (продолжение)

(A)

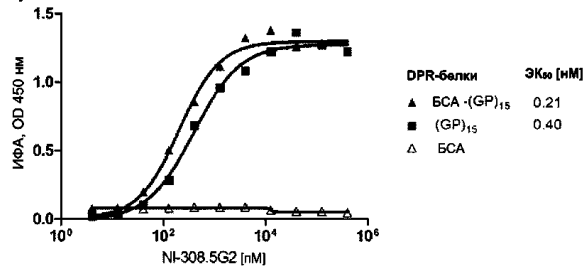
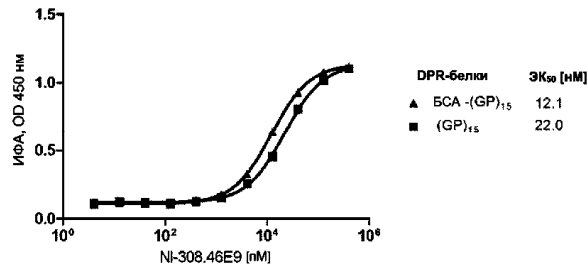
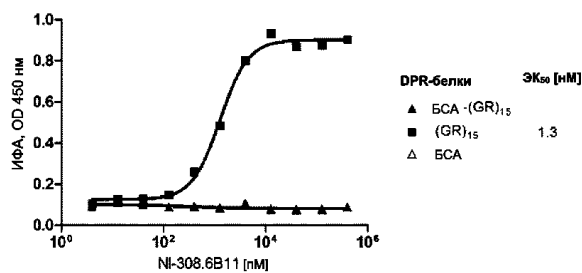
Антитело	Пептид	ЭК ₅₀ [нМ]	
		БСА-связанный пептид	Несвязанный пептид
NI-308.18F7	(GA) ₁₅	0.11	0.34
NI-308.15O7	(GA) ₁₅	0.41	0.18
NI-308.28G1	(GA) ₁₅	0.66	2.0
NI-308.45C2	(GA) ₁₅	15.2	1.1
NI-308.24E11	(PR) ₁₅	> 200	11.3
NI-308.16C10	(PR) ₁₅	91.1	3.5
NI-308.5G2	(GP) ₁₅	0.21	0.40
NI-308.12A3	(GP) ₁₅	6.1	2.2
NI-308.46E9	(GP) ₁₅	12.1	22.0
NI-308.6B11	(GR) ₁₅	NA	1.3
NI-308.46F8	(GR) ₁₅	NA	90.3
NI-308.4M1	(PA) ₁₅	0.14	0.10

(B) NI-308.18F7**(C) NI-308.15O7**

Фиг. 3

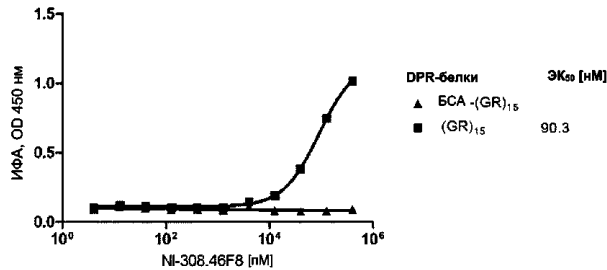
(D) NI-308.28G1**(E) NI-308.45C2****(F) NI-308.24E11**

Фиг. 3 (продолжение)

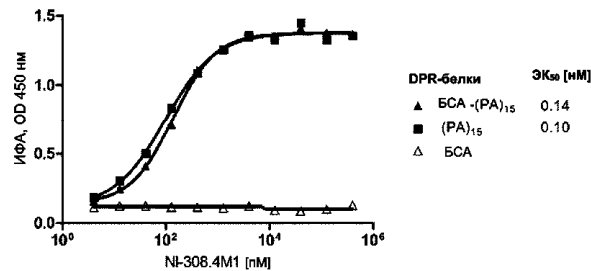
(G) NI-308.5G2**(H) NI-308.46E9****(I) NI-308.6B11**

Фиг. 3 (продолжение)

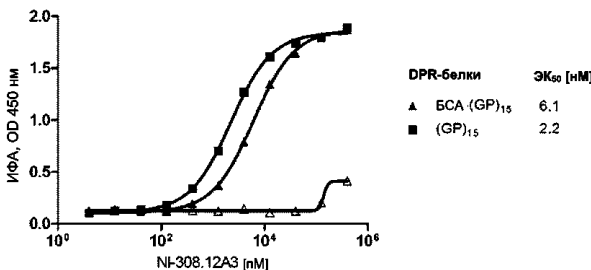
(J) NI-308.46F8



(K) NI-308.4M1

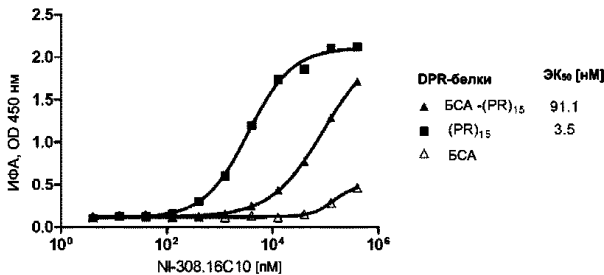


(L) NI-308.12A3

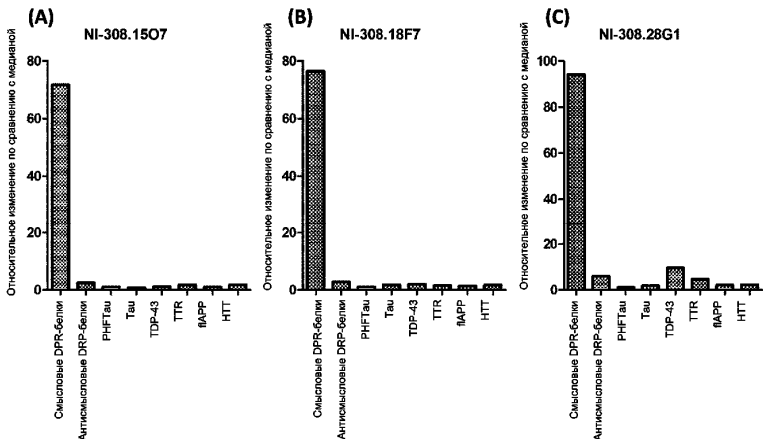


Фиг. 3 (продолжение)

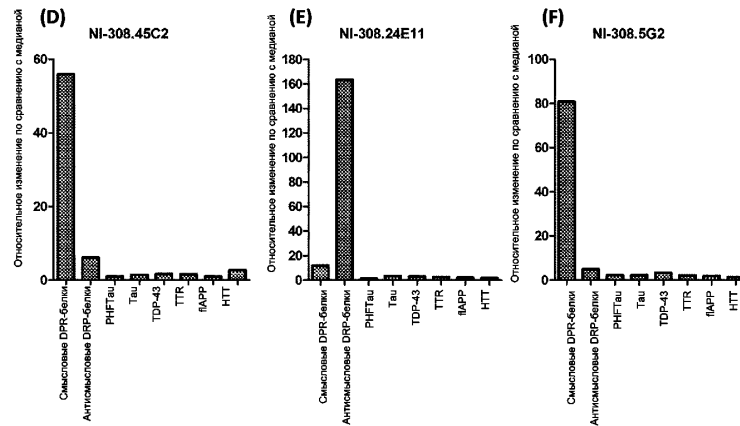
(M) NI-308.16C10



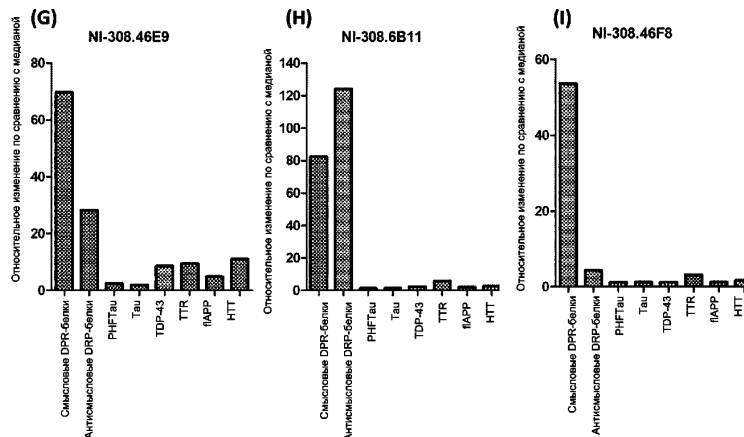
Фиг. 3 (продолжение)



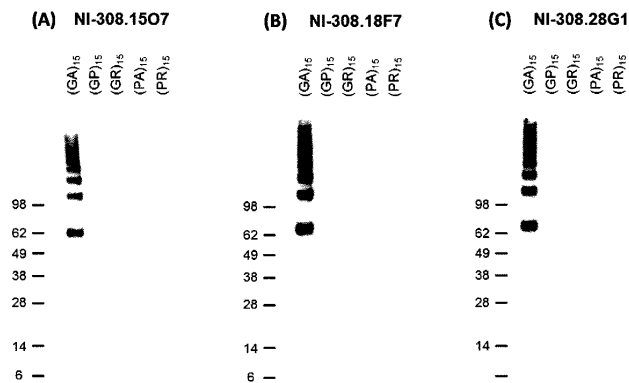
Фиг. 4



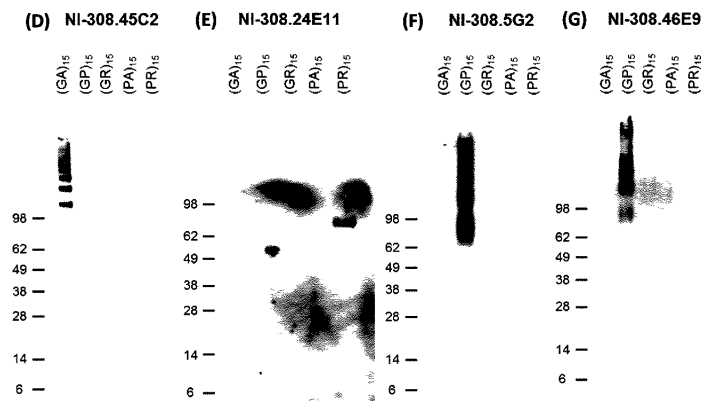
Фиг. 4 (продолжение)



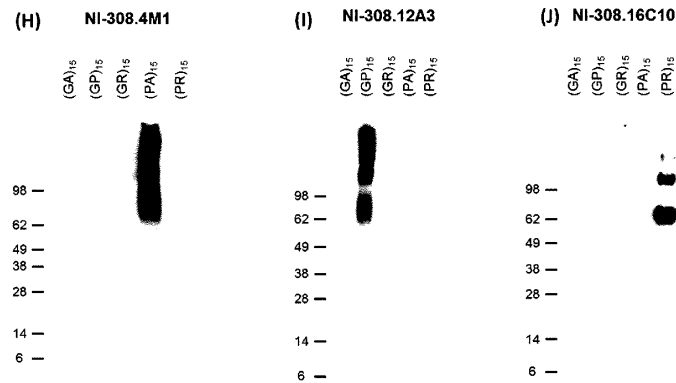
Фиг. 4 (продолжение)



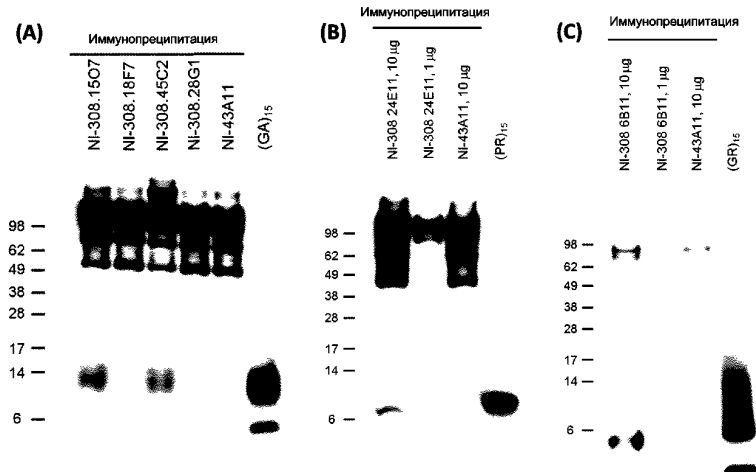
Фиг. 5



Фиг. 5 (продолжение)



Фиг. 5 (продолжение)



Фиг. 6

(A)

Антитело	ЭК ₅₀ [нМ]						
	(GA) ₂	(GA) ₃	(GA) ₄	(GA) ₅	(GA) ₆	(GA) ₁₀	(GA) ₂₀
NI-308.15O7	-	-	-	>150	7.9	0.37	0.54
NI-308.18F7	-	-	-	-	>200	0.78	0.83
NI-308.28G1	-	-	-	>200	6.3	0.9	1.1
NI-308.45C2	-	-	-	-	>200	7.6	9.6
NI-308.6B11	-	-	-	-	>200	27.7	33.6
NI-308.5G2	-	-	-	-	>200	5.7	18.2

(B)

Антитело	ЭК ₅₀ [нМ]						
	(GP) ₂	(GP) ₃	(GP) ₄	(GP) ₅	(GP) ₆	(GP) ₁₀	(GP) ₂₀
NI-308.5G2	-	-	-	>200	26.8	0.94	0.47
NI-308.46E9	-	-	-	-	-	63.3	15.5

(C)

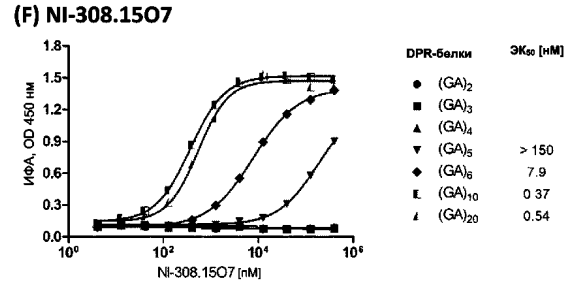
Антитело	ЭК ₅₀ [нМ]						
	(GR) ₂	(GR) ₃	(GR) ₄	(GR) ₅	(GR) ₆	(GR) ₁₀	(GR) ₂₀
NI-308.6B11	-	14.3	13.2	0.47	0.33	1.3	0.25

(D)

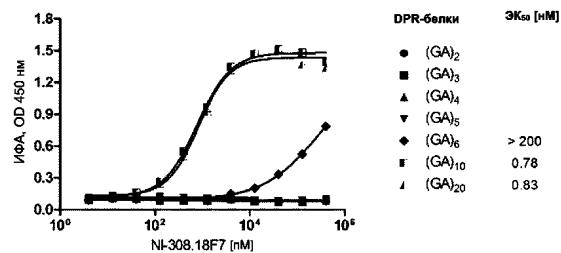
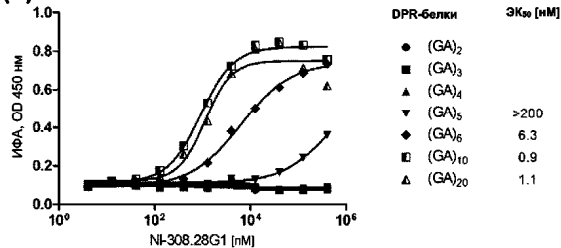
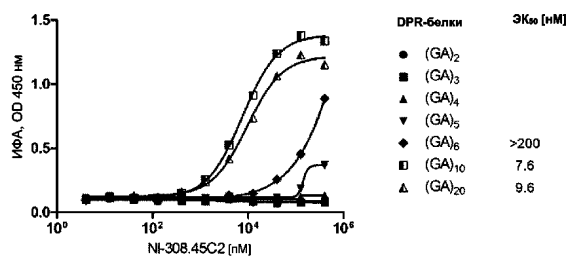
Антитело	ЭК ₅₀ [нМ]						
	(PR) ₂	(PR) ₃	(PR) ₄	(PR) ₅	(PR) ₆	(PR) ₁₀	(PR) ₂₀
NI-308.24E11	-	-	-	-	>200	31.7	11.3

(E)

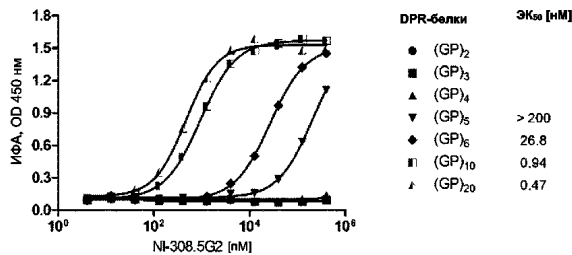
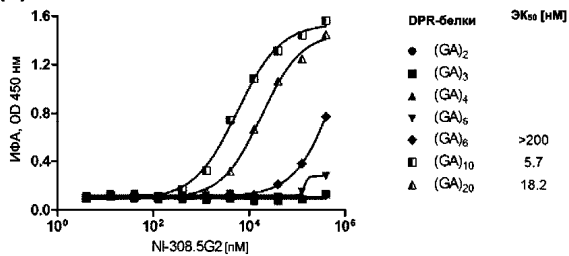
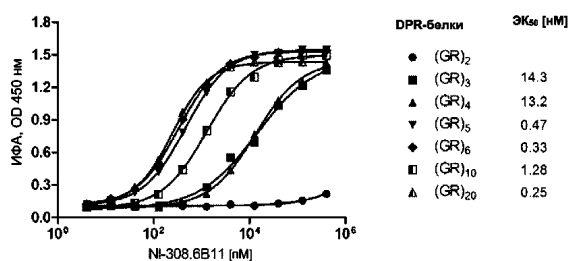
Антитело	ЭК ₅₀ [нМ]						
	(PA) ₂	(PA) ₃	(PA) ₄	(PA) ₅	(PA) ₆	(PA) ₁₀	(PA) ₂₀
NI-308.4M1	-	-	-	26.9	4.3	0.06	0.06



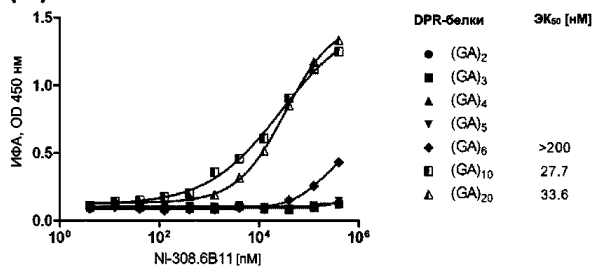
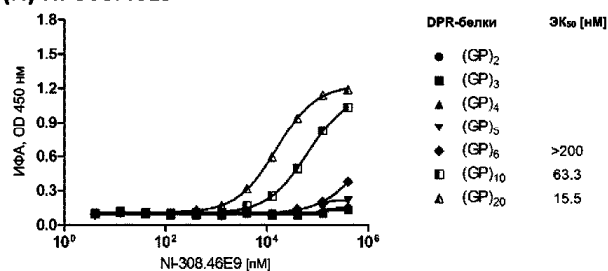
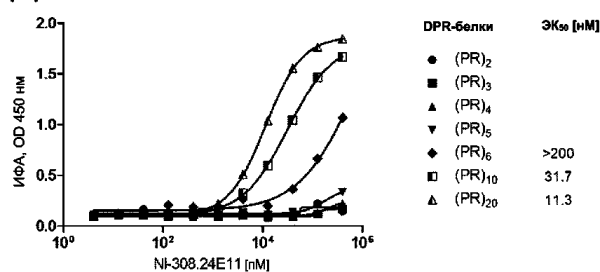
Фиг. 7

(G) NI-308.18F7**(H) NI-308.28G1****(I) NI-308.45C2**

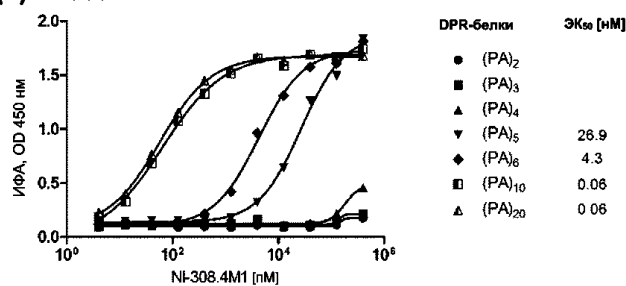
Фиг. 7 (продолжение)

(J) NI-308.5G2**(K) NI-308.5G2****(L) NI-308.6B11**

Фиг. 7 (продолжение)

(M) NI-308.6B11**(N) NI-308.46E9****(O) NI-308.24E11**

Фиг. 7 (продолжение)

(P) NI-308.4M1

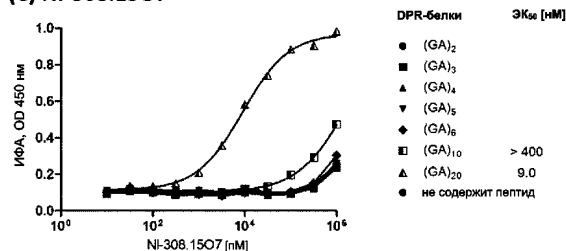
Фиг. 7 (продолжение)

(A)

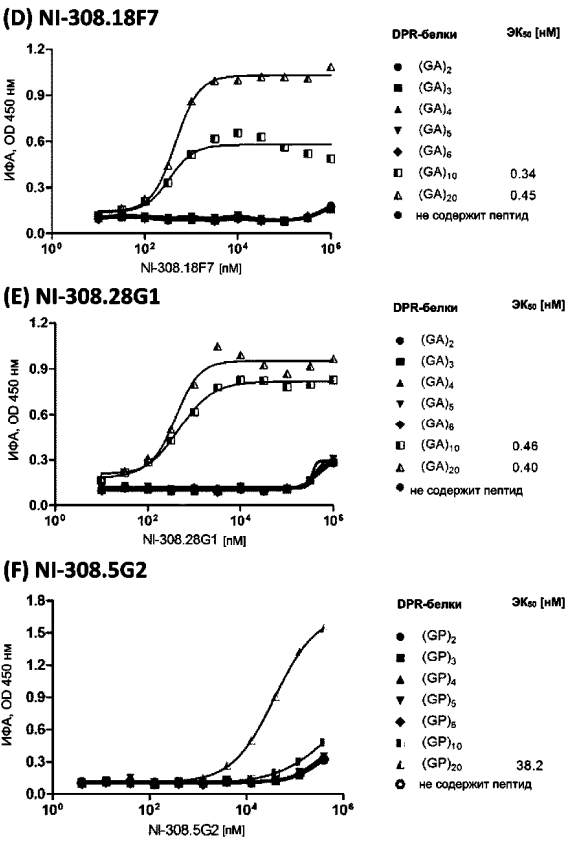
Антитело	ЭК ₅₀ [нМ]						
	(GA) ₂	(GA) ₃	(GA) ₄	(GA) ₅	(GA) ₆	(GA) ₁₀	(GA) ₂₀
NI-308.15O7	-	-	-	-	-	>400	9.0
NI-308.18F7	-	-	-	-	-	0.34	0.45
NI-308.28G1	-	-	-	-	-	0.46	0.40

(B)

Антитело	ЭК ₅₀ [нМ]						
	(GA) ₂	(GA) ₃	(GA) ₄	(GA) ₅	(GA) ₆	(GA) ₁₀	(GA) ₂₀
NI-308.5G2	-	-	-	-	-	-	38.2

(C) NI-308.15O7

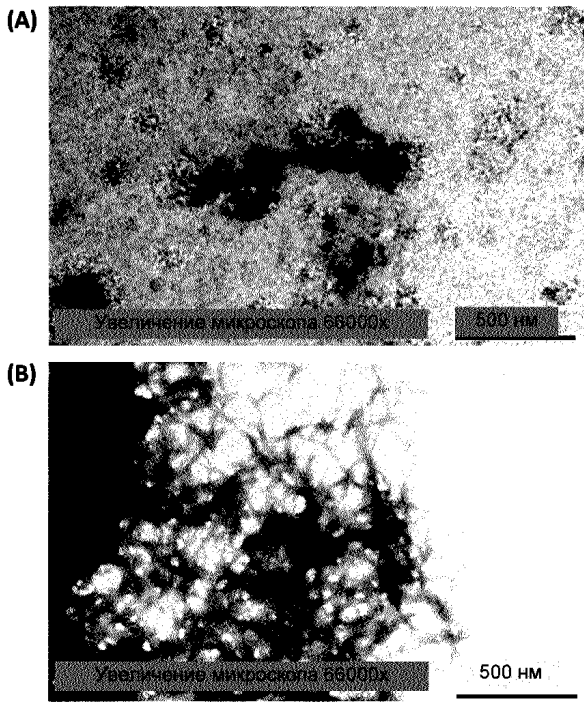
Фиг. 8



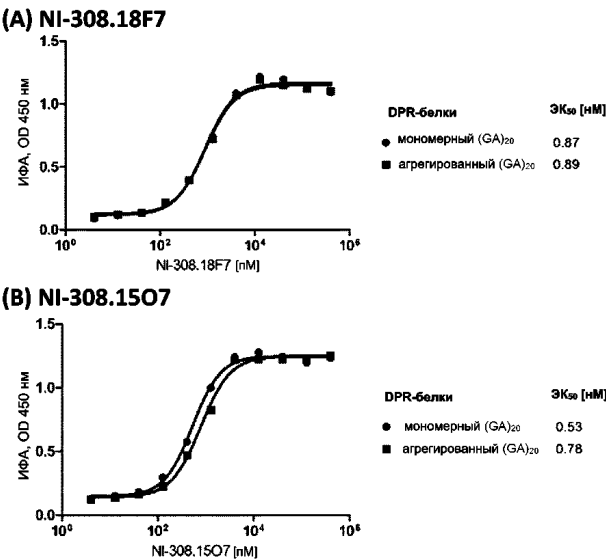
Фиг. 8 (продолжение)

Антитело	ЭК ₅₀ [нМ]			
	Непрямой ИФА		ИФА в формате «сэндвич»	
	мономерный (GA) ₁₅	агрегированный (GA) ₁₅	мономерный (GA) ₁₅	агрегированный (GA) ₁₅
NI-308.18F7	0.87	0.89	0.64	2.9
NI-308.15O7	0.53	0.78	6.3	8.1

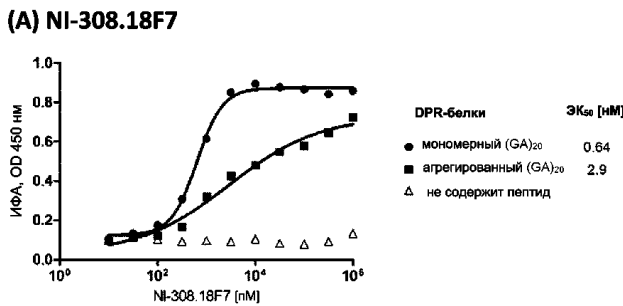
Фиг. 9



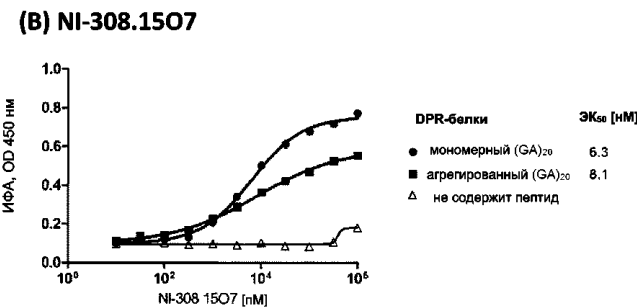
Фиг. 10



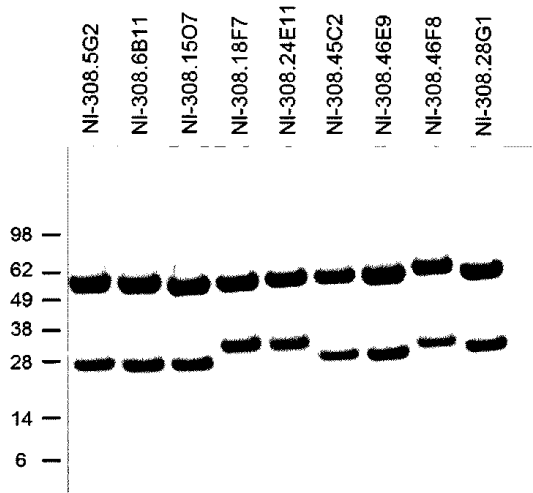
Фиг. 11



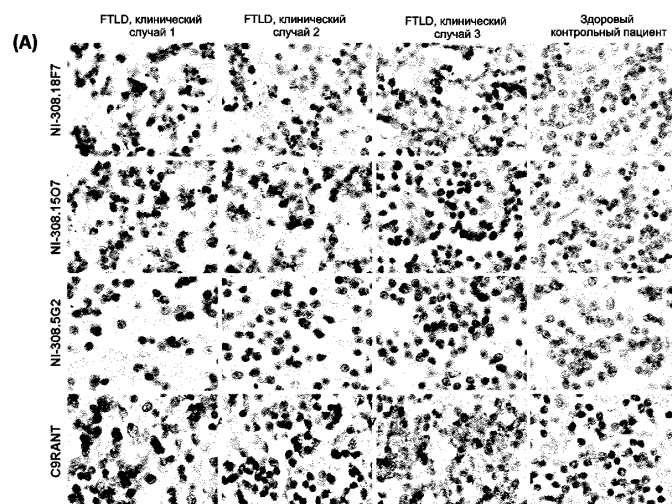
Фиг. 12



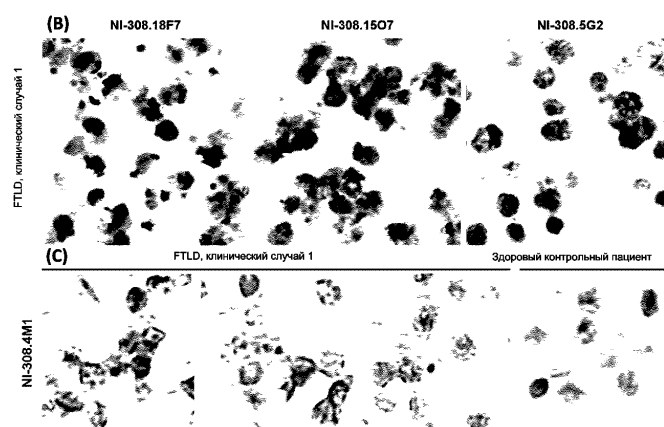
Фиг. 12 (продолжение)



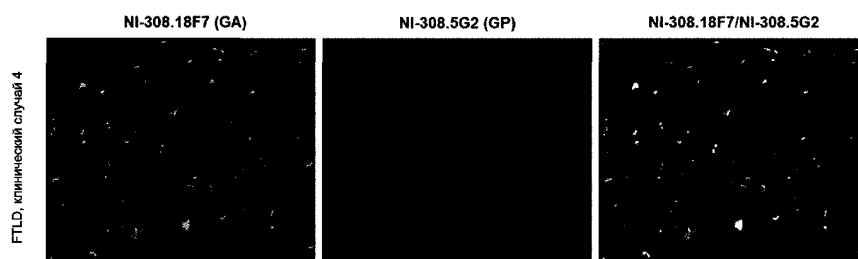
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 14 (продолжение)



Фиг. 15

