

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038358**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.13

(21) Номер заявки
201892548

(22) Дата подачи заявки
2017.06.01

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К АЛЬФА-СИНУКЛЕИНУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/344,746

(32) 2016.06.02

(33) US

(43) 2019.06.28

(86) PCT/EP2017/063406

(87) WO 2017/207739 2017.12.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
**Перкинсон Майкл, Шофилд Дарен,
Ирвинг Лоррейн, Том Джордж (GB)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)**

(56) WO-A1-2014132210

WO-A2-2008103472

D. GAMES ET AL.: "Reducing C-Terminal-Truncated Alpha-Synuclein by Immunotherapy Attenuates Neurodegeneration and Propagation in Parkinson's Disease-Like Models", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 34, no. 28, 9 July 2014 (2014-07-09), pages 9441-9454, XP055322627, US ISSN: 0270-6474, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5314-13.2014 figures 9-11

WO-A1-2015075011

WO-A1-2011104696

JUN SUNG LEE ET AL.: "Mechanism of Anti-[alpha]-Synuclein Immunotherapy", JOURNAL OF MOVEMENT DISORDERS, vol. 9, no. 1, 1 January 2016 (2016-01-01), pages 14-19, XP055399298, ISSN: 2005-940X, DOI: 10.14802/jmd.15059 the whole document

(57) Согласно изобретению предложены антитела, специфично связывающиеся с человеческим α -синуклеином с высокой аффинностью и уменьшающие распространение α -синуклеина *in vivo*, рекомбинантные полипептиды, содержащие указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, и способы получения таких полипептидов, а также композиции и способы получения антител к α -синуклеину и способы применения антител к α -синуклеину для лечения заболеваний центральной нервной системы, в частности α -синуклеинопатий.

B1

038358

038358

B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Данная заявка притязает на приоритет предварительной заявки на патент США № 62/344746, поданной 2 июня 2016 г. Вышеупомянутая заявка полностью включена сюда посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и полностью включен сюда посредством ссылки. Указанная ASCII-копия, созданная 30 мая 2017 г., имеет название 1848081-0002-091-WO1_SL.txt и размер 48099 байт.

Предшествующий уровень техники

Настоящее изобретение относится к антителам к α -синуклеину и их применению в предупреждении или лечении заболеваний, конкретно α -синуклеинопатий и конкретнее болезни Паркинсона (PD).

α -Синуклеинопатии, также известные как болезни телец Леви (Lewy body diseases, LBD), представляют собой группу нейродегенеративных заболеваний, основным патологическим признаком которых является α -синуклеин (Jellinger, *Mov Disord* (2003), 18 Suppl 6: S2-12 и Spillantini and Goedert, *Ann N Y Acad Sci* (2000), 920: 16-27; обе публикации включены сюда посредством ссылки). α -Синуклеинопатии включают болезнь Паркинсона (PD), деменцию с тельцами Леви (DLB) и мультисистемную атрофию (MSA).

PD представляет собой медленно прогрессирующее возрастное двигательное расстройство, поражающее более 1% людей старше 65 лет. PD является вторым по распространенности нейродегенеративным состоянием после болезни Альцгеймера.

Определяющим патологическим признаком α -синуклеинопатий являются тельца Леви и нейриты Леви, представляющие собой нерастворимые включения агрегированных белков, расположенные в нейронах головного мозга и выявляемые при посмертном гистологическом исследовании.

Присутствие патологических включений Леви и уменьшение количества нейронов в недвигательных областях головного мозга, таких как базальные отделы переднего мозга, мезопонтийная система, миндалевидное тело, новая кора головного мозга, дорсальное двигательное ядро блуждающего нерва, обонятельные луковицы, голубое пятно и ствол головного мозга, может приводить к когнитивным расстройствам и деменции, снижению обоняния, расстройствам сна, включая расстройство поведения в фазе быстрого сна (РПБС), расстройствам настроения, включая депрессию и тревогу, вегетативной дисфункции, включая сердечно-сосудистые и желудочно-кишечные расстройства, такие как запор, а также к усталости и сонливости. Некоторые из этих недвигательных симптомов характерны для премоторной или продромальной фазы заболевания (Kalia et al. *Lancet* (2015), 386(9996): 896-912; включено сюда посредством ссылки).

Присутствие патологических включений Леви и уменьшение количества нейронов в двигательных областях головного мозга, включая в первую очередь гибель дофаминергических нейронов в черной субстанции, может приводить к тремору покоя, ригидности, брадикинезии и постуральной неустойчивости (Spillantini and Goedert, *Ann N Y Acad Sci* (2000), 920: 16-27; включено сюда посредством ссылки).

Основным структурным компонентом телец Леви и нейритов Леви является α -синуклеин (также называемый " α -синуклеином" или " α -syn"). α -Синуклеин представляет собой небольшой кислый белок, содержащий до 140 аминокислот (14 кДа). Естественный человеческий α -синуклеин дикого типа имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, описанную в UniProtKB под регистрационным номером P37840. Если из контекста не очевидно иное, ссылка на α -синуклеин или его фрагменты включает естественную человеческую аминокислотную последовательность дикого типа, указанную выше, и ее человеческие аллельные варианты, в частности те, которые связаны с болезнями телец Леви (например, E46K, A30P, H50Q, G51D и A53T, где первая буква обозначает аминокислоту в SEQ ID NO: 1, число представляет собой положение кодона в SEQ ID NO: 1, а вторая буква представляет собой аминокислоту в аллельном варианте). Такие варианты могут, возможно, присутствовать по отдельности или в любой комбинации. Могут также присутствовать индуцированные мутации E83Q, A90V, A76T, усиливающие агрегацию α -синуклеина, по отдельности или в комбинации друг с другом и/или с человеческими аллельными вариантами E46K, A30P, H50Q, G51D и A53T. На структурном уровне α -синуклеин содержит три разных области: амфипатический N-концевой α -спиральный домен, обладающий липид- и мембраносвязывающими свойствами (остатки 1-60); центральный гидрофобный амилоидсвязывающий домен, кодирующий компонент бляшек, не являющийся амилоидом-бета (non-amyloid-beta component, NAC) (остатки 61-95); и кислый C-концевой хвост с высоким содержанием пролина (остатки 96-140). Предполагается, что остатки 71-82 домена NAC являются ключевыми для агрегационных/фибрилляционных свойств α -синуклеина, позволяя белку менять структуру со случайного клубка на бета-складчатую структуру (Bisaglia et al. *FASEB J* (2009), 23(2): 329-40; включено сюда посредством ссылки). Несмотря на то, что C-концевой домен не имеет существенной вторичной структуры, он содержит ключевой сайт фосфорилирования при остатке Ser129 и несколько тирозиновых остатков, которые нитрированы в цитозольных α -синуклеиновых включениях. Также существуют N-концевые и C-концевые усеченные формы α -синуклеина. Посттрансляционные модификации белка могут влиять на агрегацию и токсичность α -синуклеина (Oueslati et al. *Prog Brain Res* (2010), 183: 115-45; включено сюда посредством ссылки).

α -Синуклеин распространен в центральной нервной системе (CNS)/ головном мозге, где он присутствует как внутриклеточно в нейронах и глии, так и внеклеточно в спинномозговой жидкости (CSF) (Mollenhauer et al. *J Neural Transm* (2012), 119(7): 739-46; включено сюда посредством ссылки) и интерстициальной жидкости (ISF), омывающей и окружающей клетки головного мозга (Emmanouilidou et al. *PLoS One* (2011), 6(7): e22225; включено сюда посредством ссылки). α -Синуклеин является синаптическим белком, экспрессируемым главным образом в нейронах новой коры головного мозга, гиппокампа, черной субстанции, таламуса и мозжечка (Iwai et al. *Neuron* (1995), 14: 467-475; включено сюда посредством ссылки). В физиологических условиях он расположен в синаптических окончаниях нейронов и подвержен специфичной повышающей регуляции в пресинаптических окончаниях во время синаптической перестройки, связанной с восприятием стимулов (acquisition-related synaptic rearrangement) (Fortin et al. *J Neurosci* (2005), 25: 10913-10921; включено сюда посредством ссылки).

В исследованиях, проведенных *in vitro*, было показано, что начальной точкой процесса агрегации могут быть мономеры α -синуклеина. Возможна агрегация мономеров с образованием различных малых олигомерных частиц, которые затем стабилизируются взаимодействием бета-складчатых структур и в дальнейшем формируют протофибриллы, способные к полимеризации с образованием нерастворимых фибриллярных структур, похожих на структуры, обнаруженные в тельцах Леви (Cremades et al. *Cell* (2012), 149(5): 1048-59; включено сюда посредством ссылки).

В патологических условиях аберрантная агрегация α -синуклеина может играть ключевую роль в развитии патологических изменений, наблюдаемых при α -синуклеинопатиях (Lashuel et al. *Nature* (2002), 418: 291 и Tsigelny et al. *FEBS Journal* (2007), 274: 1862-1877; обе публикации включены сюда посредством ссылки). В исследованиях, проведенных *in vitro* и *in vivo*, было показано, что нейротоксические эффекты α -синуклеина, по-видимому, обусловлены небольшими растворимыми олигомерными конформерами или протофибриллами (Winner et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011), 108(10): 4194-9 и Danzer et al. *J Neurosci* (2007), 27(34): 9220-32; обе публикации включены сюда посредством ссылки). Несмотря на то, что для PD характерны фибриллярные агрегаты α -синуклеина, токсичны именно олигомерные формы α -синуклеина (Danzer et al. *J Neurosci* (2007), 27(34): 9220-32; Lashuel et al. *Nature* (2002), 418: 291 и Winner et al. *Proc Natl Acad Sci USA* (2011), 108: 4194-4199; каждая публикация включена сюда посредством ссылки).

Возможно высвобождение олигомеров α -синуклеина во внеклеточную среду и их проникновение в соседние клетки в рамках механизма "передачи" ("propagation") (Angot and Brundin, *Parkinsonism Relat Disord* (2009), 15 Suppl 3: S143-147; Desplats et al. *Proc Natl Acad Sci USA* (2009), 106: 13010-13015 и Lee et al. *J Biol Chem* (2010), 285: 9262-9272; каждая публикация включена сюда посредством ссылки). Агрегаты α -синуклеина могут приводить к передаче нарушений сворачивания белка посредством прионоподобного механизма распространения (Lee et al. *Nat Rev Neurol* (2010), 6: 702-706; Luk et al. *J Exp Med* (2012), 209(5): 975-86 и Luk et al. *Science* (2012), 338(6109): 949-53; каждая публикация включена сюда посредством ссылки). Таким образом, α -синуклеин может индуцировать нейродегенерацию в результате токсичности олигомеров или воспроизведения и прионоподобного распространения.

В настоящее время хорошо известно и общепризнано, что клетки, включая нейроны, могут секретировать различные формы α -синуклеина (мономеры, олигомеры, агрегаты) в нормальных условиях, а также в условиях клеточного стресса, что в условиях клеточного стресса секреция мономерных и агрегированных форм α -синуклеина усиливается и что такое высвобождение α -синуклеина во внеклеточную среду может приводить к передаче патологических трансмиссивных форм α -синуклеина от нейрона к нейрону (Recasens and Dehay, *Front Neuroanat* (2014), 8: 159; включено сюда посредством ссылки).

Эффекты α -синуклеина при PD могут выходить за рамки непосредственного повреждения пораженных нервных клеток. Как при большинстве нейродегенеративных заболеваний, при PD наблюдается провоспалительный клеточный ответ (Lee et al. *J Biol Chem* (2010), 285: 9262-9272; включено сюда посредством ссылки). Циркулирующий α -синуклеин и/или активированные астроциты могут активировать микроглию, что приводит к усиленному образованию активных форм кислорода, оксида азота и цитокинов, дополнительно усугубляя нейродегенерацию (Lee et al. *J Biol Chem* (2010), 285:9262-9272; включено сюда посредством ссылки).

Множество различных экспериментальных моделей продемонстрировали межклеточный перенос α -синуклеина у культивируемых клеток или распространение и передачу патологического α -синуклеина *in vivo*. Патологические изменения в виде телец Леви наблюдались в эмбриональных мезэнцефалических нейрональных трансплантатах более чем через 10 лет после их терапевтической трансплантации в половозрелое тело пациентов с PD. Конкретно, трансплантированные нейроны содержали множество включений наподобие телец Леви, которые положительно окрашивались на α -синуклеин, указывая на перенос патологического α -синуклеина трансплантату от хозяина (Li et al. *Nat Med* (2008), 14(5): 501-3 и Kordower et al. *Nat Med* (2008), 14(5): 504-6; обе публикации включены сюда посредством ссылки).

Кроме того, возможно проникновение предварительно сформированных фибрилл рекомбинантного α -синуклеина и олигомеров α -синуклеина в культивируемые клетки и нейроны, и был продемонстриро-

ван прямой перенос α -синуклеина от клеток-доноров клеткам-реципиентам с образованием α -синуклеиновых включений, сходных с тельцами Леви (Danzer et al. *J Neurosci* (2007), 27(34): 9220-32; Volpicelli-Daley et al. *Neuron* (2011), 72(1): 57-71 и Luk et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009), 106(47): 20051-6; каждая публикация включена сюда посредством ссылки). Введение предварительно сформированных фибрилл синтетического α -синуклеина или материала, содержащего α -синуклеин наподобие телец Леви, выделенного из головного мозга пожилых мышей, трансгенных по α -синуклеину, в головной мозг мышей-реципиентов без симптомов заболевания, приводит к появлению патологических включений наподобие телец Леви в нейронах-хозяевах животных-реципиентов, а также к нейродегенерации и неврологическим расстройствам (Luk et al. *J Exp Med* (2012), 209(5): 975-86 и Luk et al. *Science* (2012), 338(6109): 949-53; обе публикации включены сюда посредством ссылки). Экстракты телец Леви, содержащие α -синуклеин, выделенные из головного мозга при PD и введенные в черную субстанцию или полосатое тело макаков и мышей, быстро (в течение 24 ч) проникают в клетки организма-хозяина с последующим медленным уменьшением стриарных дофаминергических окончаний и очевидным уменьшением количества клеток по прошествии более чем одного года (Recasens et al. *Ann Neurol* (2014), 75(3): 351-62; включено сюда посредством ссылки). Сходным образом, введение мышам гомогенатов головного мозга, полученных от пациентов с синуклеинопатиями DLB или MSA приводит к появлению патологического α -синуклеина наподобие телец Леви у мышей-хозяев (Watts et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013), 110(48): 19555-60; и Masuda-Suzukake et al. *Brain* (2013), 136(Pt 4): 1128-38; обе публикации включены сюда посредством ссылки). В завершение, у мышей были продемонстрированы перенос и передача как мономерного, так и олигомерного α -синуклеина из обонятельной луковицы в связанные с ней структуры головного мозга (Rey et al. *Acta Neuropathol* (2013), 126(4): 555-73; включено сюда посредством ссылки).

Способы пассивной иммунотерапии антителами, направленными на α -синуклеин, были изучены во множестве доклинических моделей α -синуклеинопатий у мышей (Lawand et al. *Expert Opin Ther Targets* (2015): 1-10; включено сюда посредством ссылки). Конкретно, в исследовании с использованием моноклонального антитела, направленного против α -синуклеина (9E4), были показаны устранение α -синуклеиновых агрегатов и патологии *in vivo*, поведенческие двигательные улучшения и нейропротективные эффекты (WO 2014/058924, включенная сюда посредством ссылки).

В других исследованиях с применением пассивной иммунизации мышей, трансгенных по α -синуклеину, разработанных в качестве экспериментальной модели PD/DLB, моноклональным антителом 9E4 было показано, что это антитело приводит к устранению α -синуклеиновой патологии, уменьшает синаптический и аксональный дефицит, препятствует сокращению количества стриарных тирозингидроксилазных волокон и существенно уменьшает выраженность расстройств памяти и двигательных нарушений (Games et al. *J Neurosci* (2014), 34(28): 9441-54; Bae et al. *J Neurosci* (2012), 32(39): 13454-69 и Masliah et al. *PLoS One* (2011), 6(4): e19338; каждая публикация включена сюда посредством ссылки). Кроме того, было продемонстрировано, что пассивное введение моноклональных антител против α -синуклеина мышам дикого типа после инъекции предварительно сформированных фибрилл (pff) синтетического α -синуклеина в полосатое тело приводило к значительному уменьшению патологии Леви, предотвращало уменьшение количества дофаминовых нейронов в черной субстанции и значительно уменьшало выраженность двигательных расстройств, возникающих в данной модели у мышей после введения pff (Tran et al. *Cell Rep* (2014), 7(6): 2054-65; включено сюда посредством ссылки).

Кроме того, одной из основных проблем, связанных с лечением расстройств CNS макромолекулярными терапевтическими средствами, такими как антитела, является проникновение этих лекарственных средств в пораженную ткань. Проникновение макромолекул в головной и спинной мозг в значительной степени ограничено гематоэнцефалическим барьером (BBB). BBB защищает и регулирует гомеостаз головного мозга и предотвращает свободное проникновение молекул в большинство областей головного мозга, что ограничивает возможности лечения многих заболеваний головного мозга. Транспорт необходимых молекул, таких как питательные вещества, факторы роста и гормоны, осуществляется через ряд специфических переносчиков и рецепторов, регулирующих проникновение через эндотелиальные клетки головного мозга. Поэтому доставка биологических и других лекарственных средств в головной мозг представляет серьезную проблему. Кроме того, существуют транспортные механизмы, обеспечивающие быстрое удаление антител из головного мозга, вероятно, для предупреждения воспалительных ответов в результате взаимодействия Fc-областей с эффекторными лигандами, стимулирующими провоспалительный ответ.

За последние десять лет появились сообщения о проникновении антител через BBB, когда связывание с внеклеточным доменом молекул-переносчиков способствовало трансцитозу комплекса рецептор-антитело через слой эндотелиальных клеток.

BBB состоит главным образом из эндотелиальных клеток капилляров головного мозга, обладающих специализированными характеристиками, такими как плотные контакты, ограничивающими транспорт молекул в головной мозг (Reese et al. 1967, *J. Cell Biol.* 34: 207-217; Brightman et al. 1969, *J. Cell Biol.* 40: 648-677; Rubin et al. 1999, *Ann. Rev. Neurosci.* 22: 11-28), однако и другие клетки, такие как перициты, астроциты и нейроны, также играют важную роль в функционировании BBB. Обычно в головной мозг

проникает менее 0,1% периферически введенного антитела (Boado et al. 2010, Mol. Pharm. 7: 237-244; Pepinsky et al. 2011, Nat. Neurosci. 8: 745-751). BBB функционирует как физический, метаболический и иммунологический барьер (Gaillard et al. 2003, Microvasc. Res. 65: 24-31).

Транспорт антител через BBB может быть усилен стимуляцией рецептор-опосредованного трансцитоза через эндотелиальные клетки головного мозга. Во время этого процесса связывание антигенов на люминальной стороне эндотелиальной клетки может индуцировать интернализацию и перенос антитела через клетку с его последующим высвобождением в ткань.

В настоящее время лекарственная терапия PD сосредоточена главным образом на коррекции двигательных симптомов заболевания. На данный момент лекарственные средства, которые позволяли бы лечить или предупреждать α -синуклеинопатию, на рынке не представлены и недоступны.

Соответственно в данной области существует потребность в терапии для лечения α -синуклеинопатий, в частности, у людей.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенным антителам к человеческому α -синуклеину. Согласно изобретению предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, обладающие одним или более чем одним функциональным свойством антитела aslo0452 ngl-3. Далее приведены примеры.

Согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающиеся с С-концевой областью человеческого α -синуклеина. Согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающиеся с областью, содержащей аминокислоты от приблизительно 102 до приблизительно 130 человеческого α -синуклеина (например, SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связывается с областью, содержащей аминокислоты от приблизительно 120 до приблизительно 130 человеческого α -синуклеина (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается антитело 9E4.

Согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с человеческим α -синуклеином, но не с человеческим β -синуклеином или человеческим γ -синуклеином.

Согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с человеческим α -синуклеином, крысиным α -синуклеином и α -синуклеином яванского макака.

Согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с человеческим α -синуклеином с высокой аффинностью. В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с α -синуклеином с K_D менее 500 пикоомоль (пМ), менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 150 пМ, менее 120 пМ, менее 110 пМ или 106 пМ или менее, как измерено, например, с применением анализа Octet. В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с α -синуклеином с K_D менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 250 пМ, менее 200 пМ, менее 150 пМ, менее 120 пМ, менее 110 пМ, менее 100 пМ, менее 80 пМ или 74 пМ или менее, как измерено, например, с применением анализа KinExA.

Согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с нативным эндогенным человеческим α -синуклеином.

Согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с мономерными формами человеческого α -синуклеина.

Согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с агрегатами человеческого α -синуклеина.

Согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с болезненными патологическими формами α -синуклеина.

Согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, снижающее уровни α -синуклеина в интерстициальной жидкости головного мозга. В частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению снижает уровни свободного несвязанного α -синуклеина в интерстициальной жидкости головного мозга.

Согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, снижающие уровни α -синуклеина в спинномозговой жидкости. В частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению снижают уровни свободного несвязанного α -синуклеина в спинномозговой жидкости.

При использовании здесь термин "свободный несвязанный α -синуклеин" относится к α -синуклеину, не связанному с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению. Указанный свободный несвязанный α -синуклеин может относиться к α -синуклеину в его мономерной или олигомерной форме или в агрегированной форме. Этот термин обычно применим к любой патологической форме α -синуклеина.

Согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, уменьшаю-

щие распространение α -синуклеина *in vivo*.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению конкурирует с антителом aslo0452 ngl-3 за связывание с человеческим α -синуклеином.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с тем же эпитопом человеческого α -синуклеина, что и антитело aslo0452 ngl-3.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению имеет происхождение из антитела asyn0087, содержащего вариабельную область тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 и вариабельную область легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, раскрытые здесь.

В определенном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению имеет происхождение из антитела asyn0087, K_D менее 500 мМ и связываются с тем же эпитопом, что и любое из антител asyn0087, aslo0452 ngl-3 и aslo0543, описанных здесь.

При использовании здесь "H-CDR" обозначает гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи, а "L-CDR" обозначает гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит по меньшей мере один CDR, выбранный из:

- (i) H-CDR1 SEQ ID NO: 5,
- (ii) H-CDR2 SEQ ID NO: 6,
- (iii) H-CDR3 SEQ ID NO: 7,
- (iv) L-CDR1 SEQ ID NO: 9,
- (v) L-CDR2 SEQ ID NO: 10,
- (vi) L-CDR3 SEQ ID NO: 11.

В другом воплощении CDR3 тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению представляет собой CDR3 SEQ ID NO: 16 тяжелой цепи антитела aslo0452 ngl-3; и/или CDR3 легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению представляет собой CDR3 SEQ ID NO: 21 легкой цепи антитела aslo0452 ngl-3.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению имеет по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или все CDR, выбранные из CDR антитела aslo0452 ngl-3, то есть по меньшей мере один CDR, выбранный из любой из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 21.

В одном воплощении CDR3 тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению предоставляет собой CDR3 тяжелой цепи антитела aslo0452 ngl-3; и/или CDR3 легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению представляет собой CDR3 легкой цепи антитела aslo0452 ngl-3.

В одном воплощении CDR3 тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению представляет собой CDR3 тяжелой цепи антитела aslo0452 ngl-3.

В одном воплощении CDR3 легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению представляет собой CDR3 легкой цепи антитела aslo0452 ngl-3.

В одном воплощении CDR3 тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению предоставляет собой CDR3 тяжелой цепи антитела aslo0452 ngl-3; и CDR3 легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению представляет собой CDR3 легкой цепи антитела aslo0452 ngl-3.

Согласно настоящему изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие шесть CDR антитела aslo0452 ngl-3.

Таким образом, в одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержат:

- a) три CDR тяжелой цепи, имеющие последовательности:
 - (i) H-CDR1 SEQ ID NO: 5,
 - (ii) H-CDR2 SEQ ID NO: 15 и
 - (iii) H-CDR3 SEQ ID NO: 16; и
- b) три CDR легкой цепи, имеющие последовательности:
 - (i) L-CDR1 SEQ ID NO: 20,
 - (ii) L-CDR2 SEQ ID NO: 10 и
 - (iii) L-CDR3 SEQ ID NO: 21.

Согласно настоящему изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, содержащие вариабельную тяжелую цепь, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную нуклеотидной последовательности, определенной SEQ ID NO: 13, и вариабельную легкую цепь, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную нуклеотидной последовательности, определенной SEQ ID NO: 18.

- (v) H-CDR2 SEQ ID NO: 26 и
- (vi) H-CDR3 SEQ ID NO: 27; и
- d) три CDR легкой цепи, имеющие последовательности:
- (iv) L-CDR1 SEQ ID NO: 31,
- (v) L-CDR2 SEQ ID NO: 32 и
- (vi) L-CDR3 SEQ ID NO: 33.

Согласно настоящему изобретению также предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную тяжелую цепь, имеющую нуклеотидную последовательность, определенную SEQ ID NO: 24, и переменную легкую цепь, имеющую нуклеотидную последовательность, определенную SEQ ID NO: 30.

Согласно настоящему изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, определенную SEQ ID NO: 24, и переменную легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, определенную SEQ ID NO: 30.

Также предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, содержащие тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, определенную SEQ ID NO: 22, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, определенную SEQ ID NO: 28.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, как определено выше, представляют собой антитело IgA, IgD, IgE, IgM, IgG, такое как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, или его антигенсвязывающий фрагмент.

В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению имеют модифицированную Fc-область. Подходящие модификации хорошо известны специалистам в данной области и могут включать, среди прочего, модификации для увеличения или уменьшения периода полувыведения, устранения, снижения или усиления эффекторной функции, обеспечения замещенных цистеинов со свободными тиолами для конъюгации. Примерами таких модификаций являются YTE для увеличения периода полувыведения и/или TM для снижения эффекторной функции. В некоторых воплощениях любые антитела или антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые здесь, содержат мутации M252Y/S254T/T256E (YTE) в Fc-области антитела (Dall'Acqua et al., 2006, J. Biol. Chem, 281:23514-23524). В некоторых воплощениях любые антитела или антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые здесь, содержат тройную мутацию (сокращенно обозначенную здесь как "TM") в Fc-области, которая соответствует мутации L234F/L235E/P331S, раскрытой в Oganessian et al. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, (2008) 64: 700-704. В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут представлять собой антитело IgG1 TM или его антигенсвязывающий фрагмент. В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут содержать Fc-область, имеющую мутации YTE.

В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть связаны с группировкой-переносчиком через гематоэнцефалический барьер (BBB), способной обеспечивать проникновение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через BBB.

В одном воплощении группировка-переносчик через BBB может представлять собой антитело. В одном воплощении BBB-антитело может образовывать с антителом против α -синуклеина или его антигенсвязывающим фрагментом мультиспецифичную конструкцию. Группировка-переносчик через BBB может содержать гипервариабельный участок 1 переменной тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), гипервариабельный участок 2 переменной тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), гипервариабельный участок 3 переменной тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), гипервариабельный участок 1 переменной легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), гипервариабельный участок 2 переменной легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2) и гипервариабельный участок 3 переменной легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3); где VH-CDR1 содержит SEQ ID NO: 40 или 49, VH-CDR2 содержит SEQ ID NO: 41 или 50, VH-CDR3 содержит SEQ ID NO: 42 или 51, VL-CDR1 содержит SEQ ID NO: 36, 44 или 53, VL-CDR2 содержит SEQ ID NO: 37, 45 или 54, и VL-CDR3 содержит SEQ ID NO: 38, 46 или 55.

В некоторых воплощениях группировка-переносчик содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), содержащую SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 39. В некоторых воплощениях группировка-переносчик содержит переменную область легкой цепи иммуноглобулина (VL), содержащую SEQ ID NO: 43.

Кроме того, группировка-переносчик может быть выбрана из полноразмерного антитела, Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, дисульфидносвязанного Fv-фрагмента (dsFv), одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv), sc(Fv)₂-фрагмента, диатела, триатела, тетратела, минитела и одноцепочечного антитела. В определенном воплощении группировка-переносчик содержит scFv-фрагмент, содержащий домен VH и домен VL, слитые друг с другом через линкер. В некоторых случаях линкер может представлять собой (Gly₄Ser)ⁿ (SEQ ID NO: 56), где n представляет собой положительное целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

В некоторых воплощениях любую молекулу-переносчика по изобретению можно сочетать, как опи-

сано здесь, с любой молекулой по изобретению, связывающейся с α -синуклеином, с получением мультиспецифичной связывающей молекулы по изобретению.

Согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, как определено выше, для применения в качестве лекарственного средства.

Согласно изобретению также предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, как определено выше, для применения в предупреждении или лечении α -синуклеинопатии.

В одном воплощении α -синуклеинопатия выбрана из болезни Паркинсона (PD), деменции с тельцами Леви (DLB) и мультисистемной атрофии (MSA).

В одном воплощении α -синуклеинопатия представляет собой болезнь Паркинсона (PD).

Согласно изобретению предложен способ лечения или предупреждения заболевания, связанного с центральной нервной системой, у пациента, включающий введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, как определено выше.

В одном воплощении заболевание представляет собой α -синуклеинопатию.

В одном воплощении α -синуклеинопатия выбрана из болезни Паркинсона (PD), деменции с тельцами Леви (DLB) и мультисистемной атрофии (MSA).

В одном воплощении α -синуклеинопатия представляет собой болезнь Паркинсона (PD).

Согласно изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, как определено выше, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Фраза "фармацевтически приемлемый эксципиент" включает все и любые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные агенты и противогрибковые агенты, изотонические агенты, агенты, задерживающие всасывание, и тому подобное, совместимые с фармацевтическим введением. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. Композиции могут также содержать другие активные вещества, обеспечивающие добавочные, дополнительные или усиленные терапевтические функции. Фармацевтические композиции могут также быть помещены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями по применению.

Фармацевтическую композицию по изобретению изготавливают совместимой с предполагаемым путем ее введения. Способы осуществления введения известны специалистам в данной области. Введение может, например, быть внутривенным, внутривнутрибрюшинным, внутримышечным, внутримышечным, подкожным или чрескожным.

Согласно изобретению предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, как определено выше.

В определенном воплощении согласно настоящему изобретению предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая SEQ ID NO: 13 и/или SEQ ID NO: 18.

В другом определенном воплощении согласно настоящему изобретению предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая SEQ ID NO: 23 и/или SEQ ID NO: 29.

Обладая данной информацией, специалист в данной области сможет легко получить молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие раскрытые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Нуклеиновые кислоты могут включать ДНК или РНК и могут быть полностью или частично синтетическими или рекомбинантными. Если контекст не требует иного, ссылка на нуклеотидную последовательность включает молекулу ДНК с указанной последовательностью и молекулу РНК с указанной последовательностью, в которой Т заменен на U.

Молекулы нуклеиновых кислот по изобретению содержат последовательность, кодирующую CDR, домен VH и/или домен VL, раскрытые здесь.

Согласно настоящему изобретению также предложены конструкции в форме плазмид, векторов, фагмид, транскрипционных или экспрессионных кассет, содержащие по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, как определено выше, в частности кодирующие CDR, домен VH и/или домен VL, раскрытые здесь.

Согласно изобретению также предложена клетка-хозяин, содержащая одну или более чем одну конструкцию, указанную выше.

Также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие один или более чем один CDR (H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 или L-CDR3), домен VH или VL, раскрытые здесь, а также способы получения кодируемых ими продуктов. Способ включает экспрессию кодируемого продукта с кодирующей нуклеиновой кислоты. Экспрессия может быть проведена культивированием рекомбинантных клеток-хозяев, содержащих нуклеиновую кислоту, в подходящих условиях. После получения экспрессией домен VH или VL или специфичный связывающий агент могут быть выделены и/или очищены с применением любой подходящей методики, после чего использованы нужным образом.

Антигенсвязывающие фрагменты, домены VH и/или VL и кодирующие молекулы нуклеиновых кислот и векторы могут быть выделены и/или очищены из их естественной среды в практически чистой

или однородной форме или, в случае нуклеиновой кислоты, свободной или практически свободной от нуклеиновой кислоты или генов, происхождение которых отличается от последовательности, кодирующей полипептид, обладающий необходимой функцией.

Системы для клонирования и экспрессии полипептидов во множестве различных клеток-хозяев хорошо известны в данной области (см. клетки, подходящие для получения антител, в *Gene Expression Systems*, Academic Press, eds. Fernandez et al., 1999). Кратко, подходящие клетки-хозяева включают бактерии, растительные клетки, клетки млекопитающих и дрожжевые и бакуловирусные системы. Линии клеток млекопитающих, доступные в данной области для экспрессии гетерологичных полипептидов, включают клетки яичника китайского хомячка, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка, клетки мышинной миеломы NS0 и многие другие. Широко применяемым бактериальным хозяином является *E. coli*. Для получения раскрытых антител может быть использована любая система экспрессии белков, совместимая с данным изобретением. Подходящие системы экспрессии включают трансгенных животных, описанных в *Gene Expression Systems*, Academic Press, eds. Fernandez et al., 1999.

Подходящие векторы могут быть выбраны или сконструированы таким образом, чтобы они содержали подходящие регуляторные последовательности, включая промоторные последовательности, терминаторные последовательности, последовательности полиаденилирования, энхансерные последовательности, маркерные гены и другие необходимые последовательности. Векторы могут по необходимости быть плазмидными, вирусными, например, фаговыми, или фагмидными. Более подробно см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Многие известные методики и протоколы для манипуляций с нуклеиновыми кислотами, например, проводимых при получении конструкций нуклеиновых кислот, мутагенезе, секвенировании, введении ДНК в клетки и экспрессии генов, и анализа белков подробно описаны в *Current Protocols in Molecular Biology*, 2nd Edition, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992.

Согласно другому аспекту изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, раскрытую здесь, в частности вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, как определено выше.

Согласно другому аспекту предложен способ, включающий введение такой нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Для введения может быть применена любая доступная методика. Для эукариотических клеток подходящие методики могут включать трансфекцию с фосфатом кальция, DEAE-декстран, электропорацию, липосомную трансфекцию и трансдукцию с использованием ретровирусов или других вирусов, например вируса коровьей оспы или, для клеток насекомых, бакуловирусов. Для бактериальных клеток подходящие методики могут включать трансформацию с хлоридом кальция, электропорацию и трансфекцию с использованием бактериофагов. После введения нуклеиновой кислоты в клетки может быть проведена стимуляция экспрессии или созданы условия для экспрессии нуклеиновой кислоты, например, посредством культивирования клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии гена.

Краткое описание графических материалов и перечня последовательностей

Теперь настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на приложенные графические материалы и перечень последовательностей, в которых представлено следующее.

Расшифровка SEQ ID NO

| Название | Описание | SEQ ID NO: | |
|---|---|--|----|
| Человеческий альфа-синуклеин | Аминокислотная последовательность | 1 | |
| asyn0087 | Аминокислотная последовательность VH | 2 | |
| | Аминокислотная последовательность VL | 3 | |
| Общая последовательность антитела, имеющего происхождение из asyn0087 | Аминокислотная последовательность VH | 4 | |
| | Аминокислотная последовательность H-CDR1 | 5 | |
| | Аминокислотная последовательность H-CDR2 | 6 | |
| | Аминокислотная последовательность H-CDR3 | 7 | |
| | Аминокислотная последовательность VL | 8 | |
| | Аминокислотная последовательность L-CDR1 | 9 | |
| | Аминокислотная последовательность L-CDR2 | 10 | |
| | Аминокислотная последовательность L-CDR3 | 11 | |
| | aslo0452 ngl-3 | Аминокислотная последовательность тяжелой цепи | 12 |
| | | Нуклеотидная последовательность VH | 13 |
| | | Аминокислотная последовательность VH | 14 |
| Аминокислотная последовательность H-CDR1 | | 5 | |
| Аминокислотная последовательность H-CDR2 | | 15 | |
| Аминокислотная последовательность H-CDR3 | | 16 | |
| Аминокислотная последовательность легкой цепи | | 17 | |
| Нуклеотидная последовательность VL | | 18 | |
| Аминокислотная последовательность VL | | 19 | |
| Аминокислотная последовательность L-CDR1 | | 20 | |
| Аминокислотная последовательность L-CDR2 | | 10 | |
| Аминокислотная последовательность L-CDR3 | | 21 | |
| aslo0543 | | Аминокислотная последовательность тяжелой цепи | 22 |
| | | Нуклеотидная последовательность VH | 23 |
| | | Аминокислотная последовательность VH | 24 |
| | | Аминокислотная последовательность H-CDR1 | 25 |
| | | Аминокислотная последовательность H-CDR2 | 26 |
| | Аминокислотная последовательность H-CDR3 | 27 | |
| | Аминокислотная последовательность легкой цепи | 28 | |
| | Нуклеотидная последовательность VL | 29 | |
| | Аминокислотная последовательность VL | 30 | |
| | Аминокислотная последовательность L-CDR1 | 31 | |
| | Аминокислотная последовательность L-CDR2 | 32 | |

| | | | |
|---|---|---|----|
| | Аминокислотная последовательность L-CDR3 | 33 | |
| Общий переносчик через BBV | Аминокислотная последовательность VH | 34 | |
| | Аминокислотная последовательность VL | 35 | |
| | Аминокислотная последовательность L-CDR1 | 36 | |
| | Аминокислотная последовательность L-CDR2 | 37 | |
| | Аминокислотная последовательность L-CDR3 | 38 | |
| | BBVt0626gl | Аминокислотная последовательность VH | 39 |
| | | Аминокислотная последовательность H-CDR1 | 40 |
| Аминокислотная последовательность H-CDR2 | | 41 | |
| Аминокислотная последовательность H-CDR3 | | 42 | |
| Аминокислотная последовательность VL | | 43 | |
| Аминокислотная последовательность L-CDR1 | | 44 | |
| Аминокислотная последовательность L-CDR2 | | 45 | |
| Аминокислотная последовательность L-CDR3 | | 46 | |
| BBVt0626 | | Аминокислотная последовательность VH | 47 |
| | | Аминокислотная последовательность H-CDR1 | 40 |
| | | Аминокислотная последовательность H-CDR2 | 41 |
| | Аминокислотная последовательность H-CDR3 | 42 | |
| | Аминокислотная последовательность VL | 43 | |
| | Аминокислотная последовательность L-CDR1 | 44 | |
| | Аминокислотная последовательность L-CDR2 | 45 | |
| | Аминокислотная последовательность L-CDR3 | 46 | |
| | BBVt0632gl | Аминокислотная последовательность VH | 48 |
| | | Аминокислотная последовательность H-CDR1 | 49 |
| | | Аминокислотная последовательность H-CDR2 | 50 |
| | | Аминокислотная последовательность H-CDR3 | 51 |
| Аминокислотная последовательность VL | | 52 | |
| Аминокислотная последовательность L-CDR1 | | 52 | |
| Аминокислотная последовательность L-CDR2 | | 54 | |
| Аминокислотная последовательность L-CDR3 | | 55 | |

Описание графических материалов

Таблица. Определение аффинности ключевых антител против α -синуклеина в отношении человеческого α -syn, проведенное на двух платформах для измерения аффинности.

Фиг. 1. Схема HTRF®-анализа.

Фиг. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей asyn0087, aslo0452 ngl-3 и aslo0543: вариабельные области тяжелой цепи (VH) (SEQ ID NO: 2, 14 и 24 соответственно) и вариабельные области легкой цепи (VL) (SEQ ID NO: 3, 19 и 30 соответственно). Подчеркнутые аминокислоты соответствуют CDR.

Фиг. 3А-3D. Нуклеотидная и аминокислотная последовательность aslo0452 ngl-3. На фиг. 3А и 3В показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности варибельной тяжелой цепи и варибельной легкой цепи aslo0452 ngl-3 соответственно. На фиг. 3А представлены SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно в порядке их появления. На фиг. 3В представлены SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно в порядке их появления. На фиг. 3С и 3D показано выравнивание этих последовательностей с наиболее близкими им человеческими эмбриональными последовательностями. На фиг. 3С показано выравнивание аминокислотной последовательности варибельного домена тяжелой цепи aslo0452 ngl-3 (SEQ ID NO: 14) с эмбриональными последовательностями IGHV3-23 (SEQ ID NO: 58) и JH6 (SEQ ID NO: 59). На фиг. 3D показано выравнивание аминокислотной последовательности варибельного домена легкой цепи aslo0452 ngl-3 (SEQ ID NO: 19) с эмбриональными последовательностями IGLV5-45 (SEQ ID NO: 60) и JL2 (SEQ ID NO: 61), 3 последовательности. Гиперварибельные участки (CDR) подчеркнуты и подписаны. Отличия от эмбриональных последовательностей - выделены жирным шрифтом и обведены. Все остатки карбонильных областей легкой цепи, не являющиеся остатками Вернье, представляют собой человеческие эмбриональные аминокислоты. Остатки Вернье (*) для сопоставления с эмбриональными аминокислотами не менялись.

Фиг. 4А и 4В. Связывание эпитопов клонами ведущих изолятов с использованием панели усеченных форм α -syn. На лунки для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) сорбировали несколько имеющихся в продаже усеченных форм α -syn, представляющие несколько определенных областей этого белка: 1-140: полноразмерный α -syn; 1-60: только N-концевая область; 61-140: неамилоидный компонент бляшек (НАС) с С-концевой областью; 1-95: N-концевая и НАС-области; 96-140: только С-концевая область; Δ НАС: делеция НАС-области; NСАР: форма α -syn, полученная в результате альтернативного сплайсинга, без аминокислот 103-129 (rPeptide). Первичными антителами, использованными для выявления, были: (фиг. 4А) asyn087 и (фиг. 4В) aslo0452 ngl-3 (черные столбцы), aslo0543 (светло-серые столбцы) и контрольное антитело того же изотипа NIP228 (темно-серые столбцы). Связывание выявляли вторичным антителом против человеческого IgG с Eu^{3+} (фиг. 4А) или вторичным антителом против человеческого IgG с HRP (фиг. 4В).

Фиг. 5. Специфичность aslo0452 ngl-3 и aslo0543 в отношении α -syn в сравнении с другими представителями семейства синуклеинов при применении эпитоп-конкурентного DELFIA-анализа. При применении эпитоп-конкурентного HTRF-анализа специфичность клонов aslo0452 ngl-3 и aslo0543 с оптимизированной аффинностью в отношении α -syn определяли титрованием немеченных α -syn, β -syn и γ -syn. По результатам титрования определяли значения IC_{50} .

Фиг. 6. Специфичность aslo0452 ngl-3 и aslo0543 в отношении человеческого α -syn, α -syn яванского макака и крысиного α -syn при применении эпитоп-конкурентного HTRF-анализа. С применением эпитоп-конкурентного HTRF-анализа определяли профиль межвидовой перекрестной реактивности клонов с оптимизированной аффинностью в сходном анализе титрованием немеченного α -syn с последующим расчетом значений IC_{50} для α -syn каждого вида.

Фиг. 7А и 7В. Репрезентативные результаты проточной цитометрии, демонстрирующие, что клоны с оптимизированной аффинностью связываются с нативным человеческим α -syn в клеточной линии человеческой нейроblastомы.

На изображениях А, С, Е и G фиг. 7А и 7В показано связывание с α -syn-отрицательной клеточной линией человеческого рака молочной железы BT20. На изображениях В, D, F и H фиг. 7А и 7В показано связывание с α -syn-положительной клеточной линией человеческой нейроblastомы SHSY5Y. Фиг. 7А: первичными человеческими антителами, использованными в этом исследовании, были asyn0087 и контрольный человеческий IgG (Hu IgG); связывание человеческих антител выявляли с использованием вторичного противочеловеческого IgG-FITC (Jackson). Фиг. 7В: первичными человеческими антителами, использованными в этом исследовании, были aslo0452 ngl-3, aslo0543 и контрольный IgG1 ТМ того же изотипа NIP228; связывание человеческих антител выявляли с использованием вторичного противочеловеческого IgG-FITC (Jackson). В качестве первичных мышинных антител были использованы 4D6 (Covance) и отрицательный контроль того же изотипа (R&D Systems). Связывание мышинных антител выявляли с использованием вторичного противомышиного IgG-FITC (Sigma).

Фиг. 8. Специфичность оптимизированных IgG против α -syn в отношении агрегированного человеческого α -syn по результатам DELFIA-ELISA. На диаграмме показано, что aslo0452 ngl-3 и aslo0543, два высокоаффинных α -syn-специфичных клонов и ведущее антитело asyn0087 позволяли выявлять захваченные агрегированные формы α -syn (черные столбцы), но не позволяли выявлять захваченный мономерный α -syn.

Фиг. 9А-9С. Специфичность и аффинность оптимизированных клонов в болезненных тканях по результатам иммуногистохимии. На фиг. 9А, 9В и 9С показано окрашивание антителами aslo0452 ngl-3, asyn0087 и aslo0543 соответственно. На изображениях А, В и С показано окрашивание телец Леви (изображения А и В) и нейритов Леви (изображение С) в черной субстанции в ткани головного мозга при PD антителом aslo0452 ngl-3. На изображении D показана низкая степень окрашивания α -syn в клетках ви-

сочной коры в нормальном срезе головного мозга антителом aslo0452 ngl-3. На изображениях E, F и G показано окрашивание телец Леви, нейритов Леви и точек Леви в миндалевидном теле в ткани головного мозга при PD антителом aslo0452 ngl-3. Изображение H соответствует контрольному антителу того же изотипа и демонстрирует отсутствие окрашивания в миндалевидном теле в ткани головного мозга при PD. На изображениях I-M показано окрашивание голубого пятна в ткани головного мозга при PD антителом asyn0087; выявленные патологические признаки представляют собой тельца Леви (изображения I и L), нейронные агрегаты (изображение J), нейриты Леви (изображение K) и "бледные тельца" (изображение M). На изображениях N и O показано окрашивание телец Леви и нейритов Леви в черной субстанции в ткани головного мозга при PD антителом aslo0543. На изображении P показана низкая степень окрашивания α -syn в клетках височной коры в нормальном срезе головного мозга антителом aslo0543.

Фиг. 10A и 10B. Системное введение aslo0452 ngl-3 приводит к быстрому снижению уровней свободного α -syn в префронтальной коре крыс. Среднее плюс/минус SEM абсолютной (фиг. 10A) или относительной (фиг. 10B) концентрации свободного α -синуклеина в ISF крыс, которым вводили aslo0452 ngl-3 (30 мг/кг, внутривенно; закрашенные символы) или наполнитель (незакрашенные символы).

Фиг. 11A и 11B. Системное введение aslo0452 ngl-3 приводит к дозо- и времязависимому снижению уровней свободного α -syn в CSF крыс. Среднее плюс/минус SEM абсолютной (фиг. 11A) или относительной (фиг. 11B) концентрации свободного α -синуклеина в CSF крыс, которым вводили aslo0452 ngl-3 (3, 10, 30, 100 мг/кг, внутривенно; закрашенные символы) или наполнитель (незакрашенные символы).

Фиг. 12A-12C. Антитела против α -синуклеина aslo0452 ngl-3 и aslo0452 ngl-3-D265A блокируют распространение α -синуклеина с ипсилатеральной стороны на контралатеральную. (фиг. 12A): нетрансгенных (non-tg) мышей, которым была проведена инъекция LV- α -syn в правый гиппокамп (черные стрелки), пассивно иммунизировали еженедельным введением мышиных антител IgG1 против α -синуклеина aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3-D265A, 9E4 или контрольным антителом того же изотипа NIP228 на протяжении 13 недель с последующим определением распространения α -синуклеина иммуноцитохимией с применением SYN-1 и автоматического анализа изображений. Фиг. 12B: количественный анализ данных по α -синуклеиновой иммунореактивности, полученных при иммуноцитохимическом анализе ипсилатеральных коронарных срезов гиппокампа, представленных на изображении A. Каждый столбец представляет собой среднее плюс/минус SEM десяти независимых введений антитела (n равно 10 мышей на каждую группу введения антител). *P меньше 0,05 против NIP228; 1-факторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта. Фиг. 12C: количественный анализ данных по α -синуклеиновой иммунореактивности, полученных при иммуноцитохимическом анализе контралатеральных коронарных срезов гиппокампа, представленных на изображении A. Каждый столбец представляет собой среднее плюс/минус SEM десяти независимых введений антитела (n равно 10 мышей на каждую группу введения антител). *P меньше 0,05 против NIP228; 1-факторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта.

Фиг. 13A-13C. Антитела против α -синуклеина aslo0452 ngl-3 и aslo0452 ngl-3-D265A уменьшают отложение и диссеминацию α -синуклеина, экспрессированного лентивирусным методом, по аксонам. Фиг. 13A: нетрансгенных (non-tg) мышей, которым была проведена инъекция LV- α -syn в правый гиппокамп, пассивно иммунизировали еженедельным введением мышиных антител IgG1 против α -синуклеина aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3-D265A, 9E4 или контрольным антителом того же изотипа NIP228 на протяжении 13 недель с последующим иммуноцитохимическим анализом отложений α -синуклеина в ипсилатеральных и контралатеральных трансгиппокампальных аксонах (черные стрелки). Фиг. 13B: количественный анализ ипсилатеральных аксональных отложений α -синуклеина, определенных иммуноцитохимией с применением SYN-1 и автоматического анализа изображений. Каждый столбец представляет собой среднее плюс/минус SEM десяти независимых введений антитела (n равно 10 мышей на каждую группу введения антител). *P меньше 0,05 против NIP228; 1-факторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта. Фиг. 13C: количественный анализ контралатеральных аксональных отложений α -синуклеина, определенных иммуноцитохимией с применением SYN-1 и автоматического анализа изображений. Каждый столбец представляет собой среднее плюс/минус SEM десяти независимых введений антитела (n равно 10 мышей на каждую группу введения антител). *P меньше 0,05 против NIP228; 1-факторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта.

Фиг. 14A-14C. Антитела против α -синуклеина aslo0452 ngl-3 и aslo0452 ngl-3-D265A уменьшают отложение α -синуклеина в нейронах CA1-области гиппокампа и неокортикальных нейронах 5-го слоя. Фиг. 14A: нетрансгенных (non-tg) мышей, которым была проведена инъекция LV- α -syn в правый гиппокамп, пассивно иммунизировали еженедельным введением мышиных антител IgG1 против α -синуклеина aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3-D265A, 9E4 или контрольным антителом того же изотипа NIP228 на протяжении 13 недель с последующим иммуноцитохимическим анализом отложений α -синуклеина в ипсилатеральных нейронах CA1-области гиппокампа и ипсилатеральных неокортикальных нейронах 5-го слоя (черные стрелки). Фиг. 14B: количественный анализ отложений α -синуклеина в ипсилатеральных неокортикальных нейронах 5-го слоя, определенных иммуноцитохимией с применением SYN-1 и автоматического анализа изображений. Показанные данные представляют собой количество α -синуклеин-

положительных клеток (нейронов) на $0,1 \text{ мм}^2$. Каждый столбец представляет собой среднее плюс/минус SEM десяти независимых введений антитела (n равно 10 мышей на каждую группу введения антител). * P меньше 0,05 против NIP228; 1-факторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта. Фиг. 14C: количественный анализ отложений α -синуклеина в ипсилатеральных нейронах CA1-области гиппокампа, определенных иммуноцитохимией с применением SYN-1 и автоматического анализа изображений. Показанные данные представляют собой количество α -синуклеин-положительных клеток (нейронов) на $0,1 \text{ мм}^2$. Каждый столбец представляет собой среднее плюс/минус SEM десяти независимых введений антитела (n равно 10 мышей на каждую группу введения антител). * P меньше 0,05 против NIP228; 1-факторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта.

Фиг. 15A-15C. Антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0452 ngl-3-D265A блокируют распространение α -синуклеина у мышей, трансгенных по α -синуклеину. Фиг. 15A: мышей, трансгенных по α -syn (α -syn tg), которым была проведена инъекция LV- α -syn в правый гиппокамп (черные стрелки), пассивно иммунизировали еженедельным введением мышинных антител IgG1 против α -синуклеина aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3-D265A, 9E4 или контрольным антителом того же изотипа NIP228 на протяжении 13 недель с последующим определением распространения α -синуклеина иммуноцитохимией с применением SYN-1 и автоматического анализа изображений. Фиг. 15B: количественный анализ данных по α -синуклеиновой иммунореактивности, полученных при иммуноцитохимическом анализе ипсилатеральных коронарных срезов гиппокампа, представленных на изображении A. Каждый столбец представляет собой среднее плюс/минус SEM десяти независимых введений антитела (n равно 10 мышей на каждую группу введения антител). * P меньше 0,05 против NIP228; 1-факторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта. Фиг. 15C: количественный анализ данных по α -синуклеиновой иммунореактивности, полученных при иммуноцитохимическом анализе контралатеральных коронарных срезов гиппокампа, представленных на изображении A. Каждый столбец представляет собой среднее плюс/минус SEM десяти независимых введений антитела (n равно 10 мышей на каждую группу введения антител). * P меньше 0,05 против NIP228; 1-факторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта.

Фиг. 16A-16C. Антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0452 ngl-3-D265A уменьшают отложение и диссеминацию α -синуклеина, экспрессированного лентивирусным методом, по аксонам у трансгенных мышей. Фиг. 16A: мышей, трансгенных по α -syn (α -syn tg), которым была проведена инъекция LV- α -syn в правый гиппокамп, пассивно иммунизировали еженедельным введением мышинных антител IgG1 против α -синуклеина aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3-D265A, 9E4 или контрольным антителом того же изотипа NIP228 на протяжении 13 недель с последующим иммуноцитохимическим анализом отложений α -синуклеина в ипсилатеральных и контралатеральных трансгиппокампальных аксонах (черные стрелки). Фиг. 16B: количественный анализ ипсилатеральных аксональных отложений α -синуклеина, определенных иммуноцитохимией с применением SYN-1 и автоматического анализа изображений. Каждый столбец представляет собой среднее плюс/минус SEM десяти независимых введений антитела (n равно 10 мышей на каждую группу введения антител). * P меньше 0,05 против NIP228; 1-факторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта. Фиг. 16C: количественный анализ контралатеральных аксональных отложений α -синуклеина, определенных иммуноцитохимией с применением SYN-1 и автоматического анализа изображений. Каждый столбец представляет собой среднее плюс/минус SEM десяти независимых введений антитела (n равно 10 мышей на каждую группу введения антител). * P меньше 0,05 против NIP228; 1-факторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта.

Фиг. 17A-17D. Антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0452 ngl-3-D265A уменьшают отложение α -синуклеина в нейронах CA1-области гиппокампа и неокортикальных нейронах 5-го слоя у мышей, трансгенных по α -синуклеину. Фиг. 17A: мышей, трансгенных по α -syn (α -syn tg), которым была проведена инъекция LV- α -syn в правый гиппокамп, пассивно иммунизировали еженедельным введением мышинных антител IgG1 против α -синуклеина aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3-D265A, 9E4 или контрольным антителом того же изотипа NIP228 на протяжении 13 недель с последующим иммуноцитохимическим анализом отложений α -синуклеина в ипсилатеральных нейронах CA1-области гиппокампа и ипсилатеральных неокортикальных нейронах 5-го слоя (черные стрелки). Фиг. 17B: количественный анализ отложений α -синуклеина в ипсилатеральных неокортикальных нейронах 5-го слоя, определенных иммуноцитохимией с применением SYN-1 и автоматического анализа изображений. Показанные данные представляют собой количество α -синуклеин-положительных клеток (нейронов) на $0,1 \text{ мм}^2$. Каждый столбец представляет собой среднее плюс/минус SEM десяти независимых введений антитела (n равно 10 мышей на каждую группу введения антител). * P меньше 0,05 против NIP228; 1-факторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта. Фиг. 17C: количественный анализ отложений α -синуклеина в ипсилатеральных нейронах CA1-области гиппокампа, определенных иммуноцитохимией с применением SYN-1 и автоматического анализа изображений. Показанные данные представляют собой количество α -синуклеин-положительных клеток (нейронов) на $0,1 \text{ мм}^2$. Каждый столбец представляет собой среднее плюс/минус SEM десяти независимых введений антитела (n равно 10 мышей на каждую группу введения антител). * P меньше 0,05 против NIP228; 1-факторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта. Фиг. 17D: ко-

личественный анализ отложений α -синуклеина в контралатеральных нейронах CA1-области гиппокампа, определенных иммуноцитохимией с применением SYN-1 и автоматического анализа изображений. Показанные данные представляют собой количество α -синуклеин-положительных клеток (нейронов) на 0,1 мм². Каждый столбец представляет собой среднее плюс/минус SEM десяти независимых введений антигена (n равно 10 мышей на каждую группу введения антигена). *P меньше 0,05 против NIP228; 1-факторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта.

Фиг. 18. Конкуренция aslo452 ngl-3-hIgG1TM и BBBt0626gl-scFv-Bs2-also0452 ngl-3-hIgG1TM за эпитопы в HTRF-анализе демонстрирует, что включение BBB-группировки не оказывает влияния на специфичность связывания aslo452 ngl-3-hIgG1TM. Антитело против α -синуклеина aslo0452 ngl-3-hIgG1TM, меченное dylight650, связывается с биотинилированным α -синуклеином, который, в свою очередь, связывается со стрептавидином, меченным криптатом. После возбуждения криптата происходит перенос энергии (FRET), и в присутствии aslo0452 ngl-3-hIgG1TM, меченного dylight650, происходит возбуждение dylight650, приводящее к флуоресценции. Присутствие IgG-конкурента блокирует связывание aslo0452, меченного dylight650, предотвращая его возбуждение и приводя к снижению флуоресцентного сигнала. Как немеченное aslo0452, так и Bbbt0626-Bs2-also0452-hIgG1TM способны конкурировать с aslo0452 ngl-3-hIgG1TM, меченным dylight650, в равной степени.

Фиг. 19. Связывание BBBt0626gl-BS2-aslo452 ngl-3-hIgG1TM с эндотелиальными клетками головного мозга демонстрирует, что BBB-группировка эффективно взаимодействует со своей мишенью, будучи связанной с aslo452 ngl-3-hIgG1TM. Для определения специфичного связывания антител с эндотелиальными клетками головного мозга были применены аналитические технологии FRET (технология анализа флуоресценции в микрообъеме) или "Mirgor-ball" ("зеркальный шар"). Такой анализ позволяет измерить связывание человеческих IgG с мышинными эндотелиальными клетками головного мозга (b.End3). Bbbt0626-hIgG1TM, Bbbt0626glscFv-Bs2-aslo452-hIgG1TM и Bbbt0626glscFv-Bs2-NIP228-hIgG1TM демонстрируют сходное связывание с клетками b.End3, контрольное антитело NIP228-hIgG1TM с клетками b.End3 не связывается. Связывание выявляют мышинным mAb против Fc (специфичным в отношении человеческого Fc), которое, в свою очередь, выявляют козым антителом против мышинового Fc, меченным Alexa Fluor 647.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано на неожиданном открытии антител aslo0452 ngl-3 и aslo0543. Это открытие привело к появлению новой группы антител, имеющих характеристики, общие с антителами aslo0452 ngl-3 и aslo0543, а также подгрупп антител, имеющих характеристики aslo0452 ngl-3 и aslo0543 соответственно.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению имеют происхождение из антитела asyn0087, содержащего вариабельную область тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 и вариабельную область легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, раскрытые здесь.

В определенном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению имеют происхождение из антитела asyn0087, K_D менее 500 нМ и связываются с тем же эпитопом, что и любое из антител asyn0087, aslo0452 ngl-3 и aslo0543, описанных здесь.

Аналогично asyn0087 антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0543 связываются с C-концевой областью (остатки 96-140) человеческого α -синуклеина. Конкретнее, антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0543 или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с областью, содержащей аминокислоты от приблизительно 102 до приблизительно 130 человеческого α -синуклеина (например, SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях любые антитела или антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые здесь, связываются с областью, содержащей аминокислоты от приблизительно 120 до приблизительно 130 человеческого α -синуклеина (например, SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях любые антитела или антиген-связывающие фрагменты, раскрытые здесь, связываются с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается антитело 9E4.

Антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0543 селективны в отношении α -синуклеина. Эти антитела или их антигенсвязывающие фрагменты не связываются с другими представителями семейства синуклеинов, такими как β -синуклеин или γ -синуклеин. Конкретнее, эти антитела или их антигенсвязывающие фрагменты специфичны в отношении человеческого α -синуклеина.

Антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0543 связываются с человеческим α -синуклеином, крысиным α -синуклеином или α -синуклеином яванского макака. Способность aslo0452 ngl-3 и aslo0543 связываться с человеческим α -синуклеином, α -синуклеином яванского макака и крысиным α -синуклеином указывает на связывание с эпитопом человеческого α -синуклеина, отличным от эпитопа, с которым связываются антитела, не связывающиеся с человеческим α -синуклеином, α -синуклеином яванского макака и крысиным α -синуклеином. Поэтому антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0543 могут быть использованы для оценки и изучения безопасности in vivo в моделях заболевания у яванских макаков и крыс.

Антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0543 связываются с человеческим α -синуклеином с высокой аффин-

ностью. Антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0543 связываются с α -синуклеином с K_D менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 150 пМ, менее 120 пМ, менее 115 пМ, менее 110 пМ или 106 пМ или менее, как измерено, например, с применением анализа Octet (см., например, пример 9). Антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0543 связываются с α -синуклеином с K_D менее 300 пМ, менее 250 пМ, менее 200 пМ, менее 150 пМ, менее 120 пМ, менее 110 или 108 пМ, менее 100 пМ, менее 80 пМ или 74 пМ или менее, как измерено, например, с применением анализа KinExA (например, см. протокол анализа KinExA в примере 9).

Fab-фрагмент aslo0452 ngl-3 связывается с человеческим α -синуклеином с высокой аффинностью. Fab-фрагмент aslo0452 ngl-3 связывается с α -синуклеином с K_D менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 180 или 174 пМ или менее, как измерено, например, с применением анализа KinExA (см., например, пример 9.3).

Антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0543 связываются с нативным эндогенным человеческим α -синуклеином. Антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0543 связываются с агрегатами человеческого α -синуклеина. В частности, эти антитела связываются, таким образом, с эпитопом, не являющимся необходимым для агрегации. Антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0543 способны секвестрировать как мономерные, так и агрегированные формы α -синуклеина. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению способны связываться с мономерными и агрегированными формами α -синуклеина.

Антитела aslo0452 ngl-3 и aslo0543 связываются с болезненными патологическими формами α -синуклеина, например тельцами Леви, нейритами Леви, точками Леви, в ткани головного мозга при болезни Паркинсона. В нормальном головном мозге (без болезни) наблюдается минимальное окрашивание.

Антитело aslo0452 ngl-3 снижает уровни α -синуклеина в интерстициальной жидкости головного мозга. В частности, антитело aslo0452 ngl-3 снижает уровни свободного несвязанного α -синуклеина в интерстициальной жидкости головного мозга.

Антитело aslo0452 ngl-3 снижает уровни α -синуклеина в спинномозговой жидкости. В частности, антитело aslo0452 ngl-3 снижает уровни свободного несвязанного α -синуклеина в спинномозговой жидкости. Антитело aslo0452 ngl-3 уменьшает распространение α -синуклеина *in vivo*. Эта новая функция ингибирования распространения α -синуклеина указывает на связывание с эпитопом человеческого α -синуклеина, отличным от эпитопа, с которым связываются антитела, не ингибирующие его распространение.

В некоторых воплощениях любые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые здесь, имеют любое одно или более чем одно из функциональных свойств aslo0452 ngl-3, например любое из функциональных свойств aslo0452 ngl-3, указанных здесь. В некоторых воплощениях любые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые здесь, имеют любое одно или более чем одно из функциональных свойств aslo0543, например любое из функциональных свойств aslo0543, указанных здесь.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению конкурируют с антителом aslo0452 ngl-3 и/или aslo0543 за связывание с человеческим α -синуклеином. В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связываются с тем же эпитопом человеческого α -синуклеина, что и антитело aslo0452 ngl-3 и/или aslo0543.

Можно легко определить, связываются ли рассматриваемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с эпитопом эталонного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, как определено выше. Такие методы рутинно применяются в данной области. Например, одно антитело можно сравнить с другим посредством биохимического конкурентного анализа, в котором два антитела (одно из которых мечено в целях выявления, а другое - нет) инкубируют с заданным антигеном одновременно. В случае получения сигнала связывания меченого антитела говорят, что два антитела распознают отдельные перекрывающиеся эпитопы интересующего белка. Отсутствие сигнала связывания, наоборот, характеризует их как имеющие перекрывающиеся эпитопы в последовательности белка, поскольку связывание одного антитела стерически препятствует связыванию второго антитела. Кроме того, аминокислотное положение заданного эпитопа может также быть определено с использованием модифицированных белков, таких как усеченные формы, линейных пептидных последовательностей, имеющих происхождение из первичной аминокислотной последовательности антигена, видовых ортологов, а также протеолитическим расщеплением и масс-спектрометрическим анализом антитела, связанного с заданным белком. Эти методики позволяют определить область взаимодействия антитела с антигеном.

Могут быть проведены дополнительные рутинные эксперименты (такие как анализ пептидных мутаций и связывания) для подтверждения того, что наблюдаемое снижение связывания действительно обусловлено связыванием с эпитопом по изобретению, а не каким-либо иным феноменом (таким как стерическое несоответствие). Такие эксперименты могут быть проведены с применением ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или других известных анализов связывания антител.

Например, для точного картирования определенного эпитопа могут быть выстроены математические модели поверхности взаимодействия эпитопа с паратопом, основанные на данных, полученных при определении структуры комплекса антиген-антитело с применением способа визуализации с высокой разрешающей способностью, такого как сокристаллизация с дифракцией рентгеновских лучей. Для под-

тверждения адекватности выстроенной математической модели применительно к идентификации ключевых контактных остатков, определяющих эпитоп, в антигене необходимо провести последующие точковые мутации с анализом их влияния на силу связывания антигена с антителом. Применение этой комбинации способов позволяет получить точную карту ключевых контактных остатков, составляющих рассматриваемый эпитоп.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, связывающиеся с эпитопом антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, могут быть созданы получением вариантов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. Такие варианты антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут иметь CDR, которые в высокой степени идентичны CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. Например, в некоторых воплощениях любые CDR, раскрытые здесь, любых антител или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых здесь, могут отличаться 1 или 2 аминокислотными остатками от любой одной или более чем одной конкретной последовательности CDR, указанной здесь (например, одного или более чем одного CDR, имеющего SEQ ID NO: 5, 15, 16, 20, 10 и 21). Кроме того, такие антитела могут иметь одно или более чем одно изменение (например, консервативную аминокислотную замену) в каркасных областях.

В одном воплощении антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению имеют такие изменения в аминокислотных последовательностях CDR, которые позволяют им оставаться по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% и до 99% идентичными CDR антитела aslo0452 ngl-3.

В частности, предполагаются консервативные аминокислотные замены. Консервативные замены представляют собой замены в пределах семейства аминокислот, имеющих родственные боковые цепи. Генетически кодируемые аминокислоты обычно разделяют на следующие семейства: (1) кислые аминокислоты: аспартат, глутамат; (2) основные аминокислоты: лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты: аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан и (4) незаряженные полярные аминокислоты: глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Эти семейства могут быть классифицированы далее: серин и треонин представляют собой алифатическое гидроксисемейство; аспарагин и глутамин представляют собой амидсодержащее семейство; аланин, валин, лейцин и изолейцин представляют собой алифатическое семейство; и фенилаланин, триптофан и тирозин представляют собой ароматическое семейство. Таким образом, обычно можно ожидать, что сама по себе замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или аналогичная замена одной аминокислоты на структурно родственную аминокислоту не окажет существенного влияния на связывающую функцию или свойства полученного антитела, особенно если эта замена не затрагивает аминокислоты CDR.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержат по меньшей мере один CDR, выбранный из:

- (i) H-CDR1 SEQ ID NO: 5,
- (ii) H-CDR2 SEQ ID NO: 6,
- (iii) H-CDR3 SEQ ID NO: 7,
- (iv) L-CDR1 SEQ ID NO: 9,
- (v) L-CDR2 SEQ ID NO: 10,
- (vi) L-CDR3 SEQ ID NO: 11.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению имеют по меньшей мере один CDR, выбранный из CDR антитела aslo0452 ngl-3, то есть по меньшей мере один CDR, выбранный из любой из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 21.

В другом воплощении CDR3 тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению представляет собой CDR3 тяжелой цепи антитела aslo0452 ngl-3; и/или CDR3 легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению представляет собой CDR3 легкой цепи антитела aslo0452 ngl-3. Таким образом, в одном воплощении CDR3 тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению представляет собой CDR3 SEQ ID NO: 16 тяжелой цепи антитела aslo0452 ngl-3; и/или CDR3 легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению представляет собой CDR3 SEQ ID NO: 21 легкой цепи антитела aslo0452 ngl-3.

В другом воплощении CDR3 тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению представляет собой CDR3 тяжелой цепи антитела aslo0452 ngl-3.

В одном воплощении CDR3 легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению представляет собой CDR3 легкой цепи антитела aslo0452 ngl-3.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению имеют шесть CDR антитела aslo0452 ngl-3, то есть три CDR тяжелой цепи, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16; и три CDR легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 21.

Согласно настоящему изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, содержащие вариабельную тяжелую цепь, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную нуклеотидной последовательности, определенной SEQ ID NO: 13, и вариабельную легкую цепь, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную нуклеотидной последовательности, определенной SEQ ID NO: 18.

Согласно настоящему изобретению также предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную тяжелую цепь, имеющую нуклеотидную последовательность, определенную SEQ ID NO: 13, и вариабельную легкую цепь, имеющую нуклеотидную последовательность, определенную SEQ ID NO: 18.

Согласно настоящему изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, содержащие вариабельную тяжелую цепь, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности, определенной SEQ ID NO: 14, и вариабельную легкую цепь, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности, определенной SEQ ID NO: 19.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат (i) вариабельную тяжелую цепь, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности, определенной SEQ ID NO: 14, и вариабельную легкую цепь, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности, определенной SEQ ID NO: 19, и (ii) шесть CDR антитела aslo0452 ng1-3.

Согласно настоящему изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, содержащие вариабельную тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельную легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению имеют шесть CDR антитела aslo0543.

Таким образом, в одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержат:

а) три CDR тяжелой цепи, имеющие последовательности:

(i) H-CDR1 SEQ ID NO: 25,

(ii) H-CDR2 SEQ ID NO: 26 и

(iii) H-CDR3 SEQ ID NO: 27; и

б) три CDR легкой цепи, имеющие последовательности:

(i) L-CDR1 SEQ ID NO: 31,

(ii) L-CDR2 SEQ ID NO: 32 и

(iii) L-CDR3 SEQ ID NO: 33.

В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержат вариабельную тяжелую цепь, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную последовательности, определенной SEQ ID NO: 14, и вариабельную легкую цепь, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную последовательности, определенной SEQ ID NO: 19, и дополнительно содержат:

а) три CDR тяжелой цепи, имеющие последовательности:

(vii) H-CDR1 SEQ ID NO: 25,

(viii) H-CDR2 SEQ ID NO: 26 и

(ix) H-CDR3 SEQ ID NO: 27; и

б) три CDR легкой цепи, имеющие последовательности:

(vii) L-CDR1 SEQ ID NO: 31,

(viii) L-CDR2 SEQ ID NO: 32 и

(ix) L-CDR3 SEQ ID NO: 33.

Согласно настоящему изобретению также предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную тяжелую цепь, имеющую нуклеотидную последовательность, определенную SEQ ID NO: 23, и вариабельную легкую цепь, имеющую нуклеотидную последовательность, определенную SEQ ID NO: 29.

Согласно настоящему изобретению также предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, содержащие вариабельную тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и вариабельную легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, определенную SEQ ID NO: 22, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, определенную SEQ ID NO: 28.

Каркасная область и CDR антитела могут быть точно определены (см. Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services (1991), 91-3242, 1991 и Chothia et al. J. Mol. Biol. (1987), 196:901-917, обе публикации включены сюда посредством ссылки).

Предполагают, что настоящее изобретение включает незначительные изменения аминокислотных последовательностей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению при условии, что эти изменения аминокислотной последовательности (последовательностей) позволяют ей оставаться по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичной последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, как определено здесь. В частности, предполагаются консервативные аминокислотные замены.

Согласно изобретению также предложена одноцепочечная аминокислотная последовательность, содержащая легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, как определено здесь. Согласно изобретению также предложена одноцепочечная аминокислотная последовательность, содержащая тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, как определено здесь.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с применением алгоритма выравнивания на основе локальной гомологии Смита-Уотермана (Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2 (1981), 484; включено сюда посредством ссылки), алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* (1970), 48: 443; включено сюда посредством ссылки), способа поиска сходства Пирсона-Липмана (Pearson & Lipman, *Proc Natl Acad Sci U S A* (1988), 85: 2444; включено сюда посредством ссылки), компьютерных версий этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA - Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705) или визуально (см. *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausbel et al., eds, *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. And John Wiley & Sons, Inc. (1995 Supplement) Ausubel; включено сюда посредством ссылки).

Примерами алгоритмов, подходящих для определения процента сходства или идентичности последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0 (см. Altschul et al. *J. Mol. Biol.* (1990), 215(3): 403-410; и интернет-сайт "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>" Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnology Information); оба источника включены сюда посредством ссылки).

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению являются выделенными. В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению являются очищенными.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляют собой моноклональное антитело. В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляют собой гуманизованное антитело. В еще одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляют собой человеческое антитело.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению представляют собой антитело IgA, IgD, IgE, IgM, IgG, такое как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, или его антигенсвязывающий фрагмент.

В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению имеют сниженную аффинность связывания с IgG Fc-рецепторами. Поэтому антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению имеют низкий иммуногенный эффект. В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело IgG1 ТМ или его антигенсвязывающий фрагмент. IgG1 ТМ является тройным мутантом IgG1, содержащим 3 точковые мутации (L234F/L235E/P331S) в Fc-домене, которые снижают аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с Fc-гамма-рецепторами (FcγR) (Oganessian et al. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, (2008) 64: 700-704; включено сюда посредством ссылки). Таким образом, в некоторых воплощениях Fc-ассоциированные эффекторные функции не являются ключевым механизмом действия при антителопосредованном предупреждении распространения α-синуклеина антителами по изобретению.

Антигенсвязывающие фрагменты включают Fab, Fv, scFv, dAb, Fd, Fab', F(ab')₂ или выделенный гипервариабельный участок (CDR), имеющий достаточный каркас для связывания. Fab-фрагмент может представлять собой моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1. F(ab')₂-фрагмент может представлять собой бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидной связью в шарнирной области. Fc-фрагмент может состоять из доменов CH2 и CH3. Fv-фрагмент может состоять из доменов VL и VH одной половины антитела. dAb-фрагмент (Ward et al. *Nature* (1989), 341: 544-546; включено сюда посредством ссылки) может состоять из домена VH. Выделенный гипервариабельный участок (CDR), имеющий достаточный каркас для связывания, может представлять собой антигенсвязывающую часть вариабельной области.

Антигенсвязывающая часть вариабельной области легкой цепи и антигенсвязывающая часть вариабельной области тяжелой цепи, например два домена Fv-фрагмента, VL и VH, могут быть соединены с применением рекомбинантных способов синтетическим линкером, позволяющим получать их как одну белковую цепь, в которой области VL и VH соединены с образованием моновалентных молекул (извест-

ных как одноцепочечные Fv (scFv); см., например, Bird et al. *Science* (1988), 242(4877): 423-426 и Huston et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1988), 85: 5879-5883; обе публикации включены сюда посредством ссылки). Их получают с применением обычных методик, известных специалистам в данной области, и проводят скрининг этих фрагментов на предмет возможности их применения аналогичным с интактными антителами образом.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут обладать любыми или всеми полезными свойствами, как определено здесь, или их комбинациями. В частности, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут быть селективны в отношении α -синуклеина и быть способны замедлять или предотвращать передачу и распространение α -синуклеина от клетки к клетке *in vivo*.

Функциональность полученного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, и в частности (i) его способность связываться с эпитопом α -синуклеина и (ii) его способность замедлять или предотвращать передачу и распространение α -синуклеина от клетки к клетке *in vivo*, могут легко быть определены анализом их специфической активности с применением методик, описанных здесь в разделе примеры.

Согласно данному изобретению предложены композиции для доставки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению через гематоэнцефалический барьер (BBB) с использованием молекулы-переносчика, которая может проходить через эндотелиальные клетки головного мозга, будучи связанной с указанным антителом или фрагментом, например будучи слитой или конъюгированной с указанным антителом или фрагментом. Здесь предложены BBB-последовательности.

При использовании здесь термин "полезная группировка" использован как условное обозначение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано здесь, проникновение которых через BBB может быть облегчено молекулой-переносчиком, предложенной здесь. В определенных воплощениях "полезная группировка" включает вариабельную область тяжелой цепи антител по изобретению, конкретнее вариабельную область тяжелой цепи also0452 ngl-3 или aslo0543.

Полезная группировка может быть частью молекулы-переносчика, например, в форме слитого полипептида, или соединена с полипептидом дисульфидными связями или другими ковалентными связями. Альтернативно, полезная группировка может быть связана с молекулой-переносчиком таким образом, который позволит молекуле-переносчику облегчить ее проникновение через BBB, как дополнительно описано ниже. В определенных аспектах полезная группировка остается частью молекулы-переносчика после прохождения через BBB и сохраняет активность в центральной нервной системе (CNS) в такой форме. Альтернативно, полезная группировка может быть связана с молекулой-переносчиком во время прохождения через BBB, но таким образом, который позволяет ей диссоциировать от молекулы-переносчика после прохождения через BBB.

Согласно изобретению также предложены способы лечения или диагностики заболевания или расстройства CNS, в частности α -синуклеинопатии, включающие применение таких молекул-переносчиков, связанных с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению.

В определенных аспектах согласно данному изобретению предложена выделенная молекула-переносчик, содержащая полипептид, имеющий происхождение из иммуноглобулина. В определенных аспектах полипептид является миметиком или не является миметиком антитела представителей семейства верблюдовых FC5, идентифицированным и выделенным с применением технологии анализа флуоресценции в микрообъеме (Fluorescence Micro-volume Assay Technology, FMAT) для выявления связывания с эндотелиальными клетками микрососудов головного мозга (brain microvascular endothelial cells, BMVEC), например, мышинными клетками B.End3. В определенных аспектах полипептид, имеющий происхождение из иммуноглобулина, представляет собой антитело или его активный фрагмент, где "активный" означает, что молекула-переносчик может, например, связываться с BMVEC одного или более чем одного вида, например мышинными BMVEC, крысиными BMVEC, BMVEC яванского макака или человеческими BMVEC, проникать в BMVEC одного или более чем одного вида и/или проходить через гематоэнцефалический барьер либо сама по себе, либо будучи связанной с полезной группировкой.

В некоторых воплощениях молекула-переносчик через BBB представляет собой молекулу-переносчик через BBB, описанную в предварительной заявке на патент США № 62/094503, полностью включенной сюда посредством ссылки. В определенных аспектах молекула-переносчик содержит одно или более из Bbbt0241, Bbbt0626, Bbbt0626gl, Bbbt0632, Bbbt0632gl, Bbbt0654, Bbbt0726, Bbbt0727, Bbbt0732, Bbbt0754, Bbbt0674, Bbbt0755, Bbbt0643, Bbbt0579 или Bbbt0671, как описано в предварительной заявке на патент США № 62/094503, полностью включенной сюда посредством ссылки.

В определенном воплощении молекула-переносчик через BBB представляет собой Bbbt0626 или bbbt0632.

В определенных воплощениях молекула-переносчик через BBB может быть модифицирована на эмбриональном уровне, например Bbbt0626gl представляет собой вариант Bbbt0626, модифицированный на эмбриональном уровне, называемый "Bbbt0626gl".

В другом определенном воплощении молекула-переносчик через BBB представляет собой

ВВВt0632gl или Вbbt0626gl.

В определенных аспектах молекула-переносчик не связывается с ВМВЕС, но все равно способна проходить через ВВВ, по результатам анализа транскрипта *in vitro*.

Применительно к молекулам-переносчикам через ВВВ описанные последовательности VH-CDR соответствуют классической нумерации Kabat, а именно согласно нумерации Kabat H-CDR1 расположен в положениях 31-35, H-CDR2 расположен в положениях 50-65, и H-CDR3 расположен в положениях 95-102. L-CDR2 и L-CDR3 также соответствуют классической нумерации Kabat, а именно положениям 50-56 и 89-97 соответственно. При использовании здесь термины "L-CDR1" или "CDR1 легкой цепи" соответствуют последовательностям, расположенным в VL в положениях 23-34 по нумерации Kabat (в отличие от этого классическое расположение L-CDR1 по схеме нумерации Kabat соответствует положениям 24-34).

В определенных аспектах полипептид, имеющий происхождение из иммуноглобулина, содержит гипервариабельные участки (CDR) тяжелой цепи иммуноглобулина. Например, полипептид, имеющий происхождение из иммуноглобулина, может содержать гипервариабельный участок 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (H-CDR1), гипервариабельный участок 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (H-CDR2), гипервариабельный участок 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (H-CDR3). В определенных аспектах полипептид, имеющий происхождение из иммуноглобулина, может дополнительно содержать или альтернативно содержать CDR легкой цепи иммуноглобулина. Например, полипептид, имеющий происхождение из иммуноглобулина, может содержать гипервариабельный участок 1 легкой цепи иммуноглобулина (L-CDR1), гипервариабельный участок 2 легкой цепи иммуноглобулина (L-CDR2), гипервариабельный участок 3 легкой цепи иммуноглобулина (L-CDR3).

В определенных аспектах полипептид, имеющий происхождение из иммуноглобулина, содержит H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3 со следующими аминокислотными последовательностями, соответственно:

(a) SEQ ID NO: 40 в качестве H-CDR1, SEQ ID NO: 41 в качестве H-CDR2, SEQ ID NO: 42 в качестве H-CDR3, SEQ ID NO: 36 в качестве L-CDR1, SEQ ID NO: 37 в качестве L-CDR2 и SEQ ID NO: 38 в качестве L-CDR3, где указанные CDR сходны с CDR Bbbt0626 и Bbbt0626gl;

(b) SEQ ID NO: 40 в качестве H-CDR1, SEQ ID NO: 41 в качестве H-CDR2, SEQ ID NO: 42 в качестве H-CDR3, SEQ ID NO: 44 в качестве L-CDR1, SEQ ID NO: 45 в качестве L-CDR2 и SEQ ID NO: 46 в качестве L-CDR3, где указанные CDR идентичны CDR Bbbt0626 и Bbbt062gl.

В определенных аспектах полипептид, имеющий происхождение из иммуноглобулина, содержит H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3 со следующими аминокислотными последовательностями соответственно:

(a) SEQ ID NO: 49 в качестве H-CDR1, SEQ ID NO: 50 в качестве H-CDR2, SEQ ID NO: 51 в качестве H-CDR3, SEQ ID NO: 53 в качестве L-CDR1, SEQ ID NO: 54 в качестве L-CDR2 и SEQ ID NO: 55 в качестве L-CDR3, где указанные CDR сходны с CDR Bbbt0632gl;

(b) SEQ ID NO: 49 в качестве H-CDR1, SEQ ID NO: 50 в качестве H-CDR2, SEQ ID NO: 51 в качестве H-CDR3, SEQ ID NO: 53 в качестве L-CDR1, SEQ ID NO: 54 в качестве L-CDR2 и SEQ ID NO: 55 в качестве L-CDR3, где указанные CDR идентичны CDR Bbbt0632gl.

В определенных альтернативных воплощениях один или более чем один CDR, описанные выше, идентичны указанным CDR, за исключением, например, 1, 2, 3, 4 или 5 одиночных аминокислотных децетий, замен или вставок.

В определенных воплощениях молекула-переносчик, предложенная выше, может проходить через гематоэнцефалический барьер.

В определенных аспектах H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3 могут быть расположены в каркасных областях иммуноглобулина, образуя VH антитела и VL антитела. В определенных аспектах каркасные области могут представлять собой каркасные области человеческого происхождения. В определенных аспектах VH антитела и VL антитела слиты друг с другом, например, через гибкий пептидный линкер, с образованием молекулы scFv. В определенных аспектах VH и VL дополнительно содержат один или более чем один константный домен иммуноглобулина, например домен CH1, шарнирную область, домен CH2, домен CH3, домен CL-каппа и/или домен CL-лямбда. В определенных аспектах один или более чем один константный домен иммуноглобулина имеют происхождение из человеческого иммуноглобулина, например человеческого иммуноглобулина IgG1. В определенных аспектах VH, VL и/или константные домены могут содержать мутации, например, для увеличения или уменьшения периода полувыведения, усиления или ослабления эффекторных функций или обеспечения возможности присоединения полезной молекулы посредством слияния пептидов, образования дисульфидной связи или химической конъюгации.

В определенных аспектах изобретения предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, связанные с молекулой-переносчиком, способной проходить через эндотелиальные клетки головного мозга, как описано здесь.

В определенных аспектах согласно данному изобретению предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, связанные с молекулой-переносчиком, содержащей полипептид,

имеющий происхождение из иммуноглобулина, содержащий вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (VL). В определенных аспектах полипептид, имеющий происхождение из иммуноглобулина, содержит последовательности, предложенные здесь, включая:

(а) аминокислотную последовательность VH, по меньшей мере на 80, 84, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 39, и аминокислотную последовательность VL, по меньшей мере на 80, 84, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 43, где SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 43 кодируют области VH и VL Bbbt0626gl;

(b) аминокислотную последовательность VH, по меньшей мере на 80, 84, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 47, и аминокислотную последовательность VL, по меньшей мере на 80, 84, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 43, где SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 43 кодируют области VH и VL Bbbt0626;

(с) аминокислотную последовательность VH, по меньшей мере на 80, 84, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 48, и аминокислотную последовательность VL, по меньшей мере на 80, 84, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 43, где SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 43 кодируют области VH и VL Bbbt0632.

В определенных аспектах согласно данному изобретению предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, связанные с молекулой-переносчиком, содержащей полипептид, имеющий происхождение из иммуноглобулина, содержащий область VH и область VL, где:

(а) область VH содержит SEQ ID NO: 34 и область VL содержит SEQ ID NO: 35; или

(b) область VH содержит SEQ ID NO: 39 и область VL содержит SEQ ID NO: 43; или

(с) область VH содержит SEQ ID NO: 39 и область VL содержит SEQ ID NO: 35; или

(d) область VH содержит SEQ ID NO: 47 и область VL содержит SEQ ID NO: 43; или

(е) область VH содержит SEQ ID NO: 47 и область VL содержит SEQ ID NO: 35; или

(f) область VH содержит SEQ ID NO: 48 и область VL содержит SEQ ID NO: 52.

В другом воплощении области VH и VL молекулы-переносчика, как описано выше, ковалентно связаны с образованием одноцепочечного фрагмента (scFv).

В определенных аспектах молекула-переносчик, предложенная здесь, обладает активностью переносчика, например, она может связываться с BMVEC одного или более чем одного вида, например мышинными, крысиными BMVEC, BMVEC яванского макака или человеческими BMVEC, она может проникать в BMVEC одного или более чем одного вида или она может проходить через гематоэнцефалический барьер.

В определенных аспектах молекула-переносчик, предложенная здесь, содержит полипептид, имеющий происхождение из иммуноглобулина, содержащий антитело или его фрагмент, проникающий через BBB.

"Фрагмент, проникающий через BBB", как описано здесь, представляет собой фрагмент молекулы-переносчика, способный специфично связываться с BMVEC одного или более чем одного вида и проходить через BMVEC *in vitro* или *in vivo* из периферических сосудов в сосуды CNS. Определить, является ли заданный фрагмент фрагментом, проникающим через BBB, можно с применением множества *in vitro* или *in vivo*-анализов, известных специалистам в данной области. Например, молекула-переносчик может быть изучена в анализе транцитоза *in vitro*, в *in vivo*-анализе, таком как анализ диуреза, как описано в US 62/094503. Другие анализы, которые могут быть применены для оценки доставки полезных группировок через BBB *in vivo*, включают, без ограничения, хроническое компрессионное повреждение (chronic constriction injury, CCI), модель частичного повреждения нерва (spared nerve injury model, SNI) или перевязку спинномозговых нервов (spinal nerve ligation, SNL), во всех этих случаях оценку можно проводить по отдергиванию лапы или методом Харгрейвса (Hargreaves K, et al., Pain; 1988; 32; 77-88). В определенных аспектах молекула-переносчик, предложенная здесь, может связываться с BMVEC одного или более чем одного вида, например человеческими BMVEC, BMVEC яванского макака, мышинными, крысиными или бычьими BMVEC. Связывание может быть продемонстрировано различными способами, известными специалистам в данной области, например, в FМAT-анализе, как описано в US 62/094503. В определенных аспектах BMVEC представляют собой эндотелиальные клетки капилляров головного мозга (brain capillary endothelial cells, BCEC). В определенных аспектах молекула-переносчик, предложенная здесь, может проходить через монослой BCEC в анализе транцитоза *in vitro*. В определенных аспектах активность молекулы-переносчика может быть продемонстрирована визуализацией молекулы-переносчика в CNS. Например, молекула-переносчик, меченная тритием, может быть доставлена субъекту, например мышши, периферически, например внутривенно, и затем визуализирована в CNS количественной радиографией всего тела. В определенных аспектах молекула-переносчик локализуется в определенных областях CNS, например в коре мозжечка, сером веществе мозжечка, сером веществе спинного мозга, мосте или их комбинации.

В определенных аспектах молекула-переносчик, предложенная здесь, содержит антитело или его фрагмент, проникающий через BBB, содержащий или состоящий из двух или более субъединиц, например тяжелой цепи или ее фрагмента и легкой цепи или ее фрагмента, где тяжелая цепь и легкая цепь объ-

единены, например, в форме единого слитого белка (например, scFv) или в форме двух субъединиц, удерживаемых вместе одной или более чем одной дисульфидной связью. В определенных аспектах тяжелая цепь содержит домен или область VH и легкая цепь содержит домен или область VL.

В одном воплощении согласно изобретению предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, связанные с молекулой-переносчиком через гематоэнцефалический барьер, как описано здесь.

В определенном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связаны с молекулой-переносчиком через гематоэнцефалический барьер, представляющей собой одноцепочечный фрагмент (scFv), содержащий:

- i) переменную область тяжелой цепи (VH) BBBt0626gl SEQ ID NO: 39 и переменную область легкой цепи (VL) BBBt0626gl SEQ ID NO: 43, или
- ii) переменную область тяжелой цепи (VH) BBBt0626 SEQ ID NO: 47 и переменную область легкой цепи (VL) BBBt0626 SEQ ID NO: 43;
- iii) переменную область тяжелой цепи (VH) BBBt0632gl SEQ ID NO: 48 и переменную область легкой цепи (VL) BBBt0632gl SEQ ID NO: 52.

В определенных аспектах тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи, например домен CH1, шарнирную область, домен CH2 и/или домен CH3, или его фрагмент. В определенных аспектах константный домен тяжелой цепи представляет собой константный домен IgG или его фрагмент, например константный домен человеческого IgG, например константный домен человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В определенных аспектах константный домен IgG или его фрагмент содержит измененное гликозилирование и/или одну или более чем одну аминокислотную замену по сравнению с константным доменом IgG дикого типа, где модифицированный IgG обладает определенным свойством, например увеличенным или уменьшенным периодом полувыведения по сравнению с периодом полувыведения IgG, имеющего константный домен IgG дикого типа, повышенными или пониженными эффекторными функциями по сравнению с константным доменом IgG дикого типа или способностью к присоединению гетерологичных группировок посредством, например, пептидной связи, дисульфидной связи или химической конъюгации. В определенных аспектах константный домен IgG или его фрагмент имеет измененное гликозилирование по сравнению с константным доменом IgG дикого типа, где модифицированный IgG обладает определенным свойством, например увеличенным или уменьшенным периодом полувыведения по сравнению с периодом полувыведения IgG, имеющего константный домен IgG дикого типа, повышенными или пониженными эффекторными функциями по сравнению с константным доменом IgG дикого типа.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связаны с BBBt0626 или BBBt0626gl, как определено здесь, с образованием молекул биспецифичных антител.

В других воплощениях указанные биспецифичные антитела по изобретению содержат остов человеческого IgG1 TM (то есть области CH1, CH2, CH3 тяжелой цепи IgG1 TM), связанный с одноцепочечным фрагментом (scFv), содержащим области VH и VL BBBt0626 или BBBt0626gl, перенесенные на N-конец ("формат BiS2") или C-конец ("формат BiS3") тяжелой цепи или N-конец ("формат BiS1") VL антитела против α -синуклеина по изобретению. Ссылки на формат BiS раскрыты в DiMasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30;393(3):672-92.

В некоторых воплощениях указанные биспецифичные антитела по изобретению дополнительно содержат легкую цепь, содержащую область CL каппа или лямбда, связанную с VL антитела против α -синуклеина по изобретению.

В определенных воплощениях биспецифичные антитела по изобретению содержат остов человеческого IgG1 TM, связанный с:

- (i) одноцепочечным фрагментом (scFv) BBBt0626gl, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 39 и переменную область легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 43; или
 - (ii) одноцепочечным фрагментом (scFv) BBBt0626, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 47 и переменную область легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 43;
- где указанный scFv перенесен на N-конец ("формат BiS2") или C-конец ("формат BiS3") тяжелой цепи aslo0452 ngl-3 SEQ ID NO: 12 или N-конец ("формат BiS1") легкой цепи SEQ ID NO: 17.

В других определенных воплощениях биспецифичные антитела по изобретению содержат остов человеческого IgG1 TM, связанный с одноцепочечным фрагментом (scFv) BBBt0626gl, содержащим (i) переменную область тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 39 и (ii) переменную область легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 43, где указанный scFv перенесен на N-конец ("формат BiS2") или C-конец ("формат BiS3") тяжелой цепи aslo0452 ngl-3 SEQ ID NO: 12 или N-конец ("формат BiS1") легкой цепи SEQ ID NO: 17.

В других определенных воплощениях биспецифичные антитела по изобретению содержат остов человеческого IgG1 TM, связанный с:

- (i) одноцепочечным фрагментом (scFv) BBBt0626gl, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 39 и переменную область легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 43; или
- (ii) одноцепочечным фрагментом (scFv) BBBt0626, содержащим переменную область тяжелой цепи

пи (VH) SEQ ID NO: 47 и вариабельную область легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 43;

где указанный scFv перенесен на N-конец ("формат BiS2") или C-конец ("формат BiS3") тяжелой цепи aslo0543 SEQ ID NO: 22 или N-конец ("формат BiS1") легкой цепи SEQ ID NO: 28.

Согласно настоящему изобретению также предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

Согласно настоящему изобретению также предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению для применения в предупреждении или лечении заболевания центральной нервной системы, в частности α -синуклеинопатии. В одном воплощении α -синуклеинопатия выбрана из болезни Паркинсона (PD), деменции с тельцами Леви (DLB) и мультисистемной атрофии (MSA). В предпочтительном воплощении α -синуклеинопатия представляет собой болезнь Паркинсона (PD).

Согласно настоящему изобретению также предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению для изготовления лекарственного средства для предупреждения или лечения заболевания центральной нервной системы, в частности α -синуклеинопатии. В одном воплощении α -синуклеинопатия выбрана из болезни Паркинсона (PD), деменции с тельцами Леви (DLB) и мультисистемной атрофии (MSA). В предпочтительном воплощении α -синуклеинопатия представляет собой болезнь Паркинсона (PD).

Согласно изобретению также предложен способ лечения или предупреждения заболевания у пациента, включающий введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. В одном воплощении α -синуклеинопатия выбрана из болезни Паркинсона (PD), деменции с тельцами Леви (DLB) и мультисистемной атрофии (MSA). В предпочтительном воплощении α -синуклеинопатия представляет собой болезнь Паркинсона (PD).

При применении антитела или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению позволяют лечить или предупреждать прогрессирование заболевания посредством ингибирования передачи и распространения α -синуклеина *in vivo*. Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению обеспечивают явное преимущество по сравнению с другими терапевтическими средствами. Согласно изобретению также предложен способ замедления или предупреждения прогрессирования заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению пациенту.

В одном воплощении указанный способ лечения заболевания включает введение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. В другом воплощении указанный способ предупреждения заболевания или замедления или предупреждения прогрессирования заболевания включает введение профилактически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению.

Диапазоны доз для введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению представляют собой диапазоны доз, обеспечивающие желаемый терапевтический эффект. Следует понимать, что необходимый диапазон доз зависит от конкретных свойств антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или композиции, пути введения, свойств лекарственной формы, возраста пациента, природы, степени выраженности или тяжести состояния пациента, противопоказаний, в случае их наличия, и мнения лечащего врача. Эти уровни доз можно менять и корректировать с применением стандартных эмпирических методов оптимизации.

Подходящие дозы входят в диапазон от 1 до 50 мг на кг массы тела. Они могут входить в диапазон от 5 до 30 мг/кг, от 10 до 25 мг/кг или от 15 до 20 мг/кг. Стандартную дозу можно вводить ежедневно или с меньшей частотой, например каждую неделю или каждый месяц.

Введение может быть осуществлено в виде повторных введений антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению на протяжении продолжительного периода времени. Введение может быть одновременным или последовательным и может быть осуществлено в любом порядке.

Предупреждение или лечение, определенные здесь, могут быть проведены как единственная терапия или могут включать, помимо антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, применение других агентов или известных видов терапии, обычно применяемых при лечении α -синуклеинопатий (таких как L-3,4-дигидроксифенилаланин (L-DOPA), агонисты (рецепторов) дофамина, ингибиторы катехол-О-метилтрансферазы (COMT) и/или ингибиторы моноаминоксидазы типа B (MAO-B)). Применение других агентов или известных видов терапии может быть проведено в комбинации с, или в дополнение к, или в сочетании с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по изобретению и может быть осуществлено посредством одновременного, последовательного или раздельного введения отдельных компонентов лечения.

Комбинированное лечение может быть проведено любым способом, необходимым или удобным с точки зрения специалиста в данной области и для целей данного изобретения, предполагают, что порядок введения, вводимое количество, число введений или относительное количество соединений, используемых в комбинации, не ограничены.

Терапевтически эффективное количество относится к количеству антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое при его введении, самого по себе или в комбинации, пациенту для лечения

заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания является достаточным для такого лечения заболевания или симптома. Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости, например, от антитела и/или симптомов заболевания, возраста, массы тела и/или состояния здоровья пациента, подлежащего лечению, и мнения лечащего врача. В каждом конкретном случае подходящее терапевтически эффективное количество может быть определено специалистами в данной области или специалистами, способными определять его, посредством рутинных экспериментов. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором полезные эффекты антитела или его антигенсвязывающего фрагмента превосходят любые токсические или вредные эффекты.

"Профилактически эффективное количество" представляет собой любое количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое при его ведении, самого по себе или в комбинации, пациенту ингибирует или задерживает начало или рецидив заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания. В некоторых воплощениях профилактически эффективное количество полностью предупреждает начало или рецидив заболевания. "Ингибирование" начала означает либо уменьшение вероятности начала заболевания, либо полное предупреждение начала заболевания.

Согласно настоящему изобретению также предложены фармацевтические композиции, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Соответственно согласно настоящему изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым эксципиентом. Подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты могут облегчать обработку активных соединений с получением препаратов, подходящих для фармацевтического введения.

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть изготовлены, без ограничения, для парентеральной доставки, например внутримышечной, подкожной или внутривенной. Композиции, подходящие для внутримышечного, подкожного или внутривенного введения, содержат стерильные водные растворы.

Фармацевтическая композиция может иметь форму водного раствора и может содержать физиологически совместимые буферы, такие как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический раствор. Фармацевтическая композиция может дополнительно или альтернативно содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит или декстран. Фармацевтическая композиция может быть изготовлена в форме подходящих масляных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или наполнители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Возможно, фармацевтическая композиция может содержать подходящие стабилизаторы или агенты, повышающие растворимость соединений, что позволяет получать высококонцентрированные растворы.

Согласно настоящему изобретению предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Согласно настоящему изобретению также предложен вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. Согласно настоящему изобретению также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор по изобретению.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению не ограничены конкретным способом получения или изготовления. Таким образом, согласно изобретению предложены антитела, полученные из гибридомы, секретирующей антитело, а также антитела, полученные из рекомбинантно полученной клетки, трансформированной или трансфицированной нуклеиновой кислотой или нуклеиновыми кислотами, кодирующими антитело. Такие гибридомы, рекомбинантно полученные клетки и нуклеиновые кислоты являются частью данного изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение антител.

Специфичные антитела против α -syn выделяли из фаговых дисплейных библиотек, проводя несколько циклов отбора с использованием рекомбинантного человеческого α -syn ("hu α -syn"), как пассивно иммобилизованного на микротитрационных лунках, так и свободного в растворе. Для отбора использовали наивные фаговые дисплейные библиотеки человеческих одноцепочечных Fv (scFv), клонированные в фагмидный вектор на основе нитчатого фага M13 (Lloyd et al., Protein Eng Des Sel. (2009), 22(3): 159-68 и Vaughan et al., Nat Biotechnol. (1996), 14(3): 309-14; обе публикации включены сюда посредством ссылки).

Репрезентативное число отдельных клонов из полученных в результате отбора после двух или трех раундов отбора, описанного выше, подвергали начальному скринингу в форме растворимых scFv-фрагментов в периплазматических экстрактах *E. coli* (Kipriyanov et al. J Immunol Methods (1997) 200: 69-77; включено сюда посредством ссылки) в гомогенном HTRF®-анализе (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence (гомогенная флуоресценция с временным разрешением), Cisbio International) с FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции) на предмет связывания с растворимым человеческим α -

синуклеином.

HTRF®-анализ (фиг. 1) представляет собой технологию гомогенного анализа с применением резонансного переноса энергии флуоресценции между флуорофором-донором и флуорофором-акцептором, расположенными в непосредственной близости друг от друга (Mathis G Clin Chem (1995) 41: 1391-1397; включено сюда посредством ссылки). Этот анализ применялся для оценки взаимодействий макромолекул посредством прямого или непрямого сочетания одной молекулы, представляющей интерес, с флуорофором-донором, например криплатом европия (Eu^{3+}), и сочетания другой молекулы, представляющей интерес, с флуорофором-акцептором XL665 (стабильный поперечно сшитый аллофикоцианин). Возбуждение молекулы криптата (при 337 нм) приводило к эмиссии флуоресценции при 620 нм. Энергия этой эмиссии передавалась на XL665, расположенный в непосредственной близости от криптата, приводя к эмиссии специфической долгоживущей флуоресценции (при 665 нм) от XL665. Проводили измерение специфических сигналов как от донора (при 620 нм), так и от акцептора (при 665 нм), рассчитывая отношение 665/620 нм, что позволяло компенсировать присутствие окрашенных соединений во время анализа.

Неочищенные образцы scFv против α -syn анализировали на предмет связывания с биотинилированным α -syn. 5 мкл раствора, содержащего 40 нМ биотинилированного человеческого α -syn вместе с 0,8 нМ стрептавидина тербия (Cisbio International, 610SATLB), вносили в 384-луночный аналитический планшет малого объема (Costar, 3676). Затем в планшет добавляли по 10 мкл каждого разведения анализируемого образца антитела. В завершение, в аналитический планшет добавляли 5 мкл раствора, содержащего антитело против мус с DC (Cisbio International, 661MYCDAB). Все разведения проводили в аналитическом буфере, содержащем 0,8 М фторида калия (BDH 103444T) и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma A9576) в PBS Дульбекко (забуференный фосфатом физиологический раствор Дульбекко) (Invitrogen, 14190185). Аналитические планшеты инкубировали 3 ч при комнатной температуре и затем 16 ч при 4°C перед считыванием флуоресценции с временным разрешением при длинах волн 620 и 665 нм с использованием аппарата для прочтения планшетов EnVision (Perkin Elmer).

Данные анализировали, рассчитывая отношение 665/620 нм с последующим определением значений % ΔF для каждого образца. Отношение 665/620 нм использовали для учета интерференции образцов с применением уравнения, приведенного ниже:

отношение 665/620 нм равно (сигнал 665 нм/сигнал 620 нм)×10000.

Затем для каждого образца рассчитывали % ΔF , используя уравнение, приведенное ниже:

ΔF (%) равно ((отношение 665/620 нм образца минус отношение 665/620 нм отрицательного контроля)/отношение 665/620 нм отрицательного контроля)×10000.

Отрицательный контроль (неспецифическое связывание (non-specific binding, NSB)) определяли заменой анализируемого образца немеченным человеческим или крысиным α -syn.

Значения % ΔF затем использовали для расчета % специфического связывания, как описано в уравнении, приведенном ниже:

% специфического связывания равно ((ΔF (%) образца минус ΔF (%) NSB)/(ΔF (%) общего связывания минус ΔF (%) NSB))×100.

Значения IC_{50} определяли с применением программного обеспечения GraphPad Prism, проводя подбор кривых с использованием логистического уравнения с четырьмя параметрами:

Y равно нижнее значение плюс (верхнее значение минус нижнее значение)/(1 плюс $10^{((\text{LogEC}_{50} \text{ минус } X) \cdot \text{угловой коэффициент Хилла})}$),

X представляет собой логарифм концентрации,

Y представляет собой специфическое связывание,

Y начинается с нижнего значения и идет до верхнего значения, имея сигмовидную форму.

Клоны однопочечных Fv, связывавшиеся с человеческим α -syn в форме неочищенных периплазматических экстрактов, подвергали секвенированию ДНК (Osbourn et al., Immunotechnology (1996), 2: 181-196 и Vaughan et al., Nat Biotechnol. (1996), 14(3); 309-14; обе публикации включены сюда посредством ссылки). Уникальные scFv экспрессировали в бактериях еще раз и очищали аффинной хроматографией (как описано в WO 01/66754; включенной сюда посредством ссылки). Активность этих образцов определяли титрованием очищенных препаратов на предмет связывания с биотинилированным человеческим α -syn в HTRF-анализе, как описано выше. Очищенные препараты scFv, демонстрировавшие наиболее интенсивное взаимодействие с α -syn, отбирали для преобразования в формат IgG.

Исходя из результатов титрования антител в HTRF-анализе, клоны ранжировали по интенсивности связывания с α -syn. Клоны с наилучшим связыванием с α -syn подвергали дальнейшему анализу для определения кинетики связывания с α -syn (k_{off}) в форме IgG на биосенсоре Octet Red (см. способ, описанный в примере 9), а также для определения их селективности с использованием нескольких представителей семейства синуклеинов (человеческих α -syn, β -syn, γ -syn) (см. способ, описанный в примере 4) и перекрестной реактивности в отношении мышинового α -syn (см. способ, описанный в примере 5).

Пример 2. Получение aslo0452 ngl-3.

Клон asyn0087, специфично взаимодействующий с С-концом α -syn, был идентифицирован при скрининге на предмет связывания с человеческим α -syn в DELFIA-анализе (см. способ, описанный в примере 4). Asyn0087 специфично связывается с человеческим α -syn, α -syn яванского макака и грызунов (см. способ, описанный в примере 5). Перед оптимизацией asyn0087 было перенесено на самую близкую ему человеческую эмбриональную последовательность (Tomlinson VBASE. MRC Centre of Protein Engineering, Cambridge, UK. 1997; включено сюда посредством ссылки) с применением стандартных методик мутагенеза, что не повлияло на его активность. После преобразования клона в эмбриональную последовательность его связывание с α -syn было проанализировано повторно. Снижения связывания не наблюдали.

Большие фаговые библиотеки scFv, имеющих происхождение из ведущего клона, были созданы олигонуклеотидаправленным мутагенезом гипервариабельных участков (CDR) 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) и CDR 1 и 3 вариабельной области легкой цепи (VL) с применением стандартных молекулярно-биологических методик, как описано в Clarkson and Lowman (2004) (Phage display: A practical approach. Oxford: Oxford University Press; включено сюда посредством ссылки). Библиотеки подвергали фаговому дисплейному отбору на основе аффинности, проводимому с использованием растворимого биотинилированного человеческого α -syn для отбора вариантов с наиболее высокой аффинностью в отношении человеческого α -syn. В целом, отбор проводили, как описано ранее, за исключением того, что при каждом раунде отбора проводили снижение концентрации растворимого биотинилированного человеческого α -syn.

Репрезентативные клоны, полученные в результате каждого отбора, подвергали начальному скринингу в форме растворимых scFv-фрагментов в периплазматических экстрактах *E. coli* в HTRF-анализе на предмет их способности конкурировать за связывание с растворимым α -syn с исходным клоном asyn0087, связывающимся с α -syn. Показатели каждой библиотеки в этом популяционном скрининге использовали для определения того, какие CDR-мутагенетические библиотеки объединять друг с другом генетически или "рекомбинировать" для получения новых библиотек, и эти рекомбинированные библиотеки подвергали дополнительным раундам отбора по аффинности, проводимому с использованием растворимого биотинилированного человеческого α -syn.

Как в случае клонов, имеющих происхождение из отдельных мутагенетических библиотек, так и в случае клонов, имеющих происхождение из рекомбинированных мутагенетических библиотек, клоны экспрессировали и очищали в форме scFv-фрагментов и IgG и повторно подтверждали связывание с растворимым α -syn, проводя эпитопконкурентный HTRF-анализ. Исходя из результатов титрования антител в эпитопконкурентном HTRF-анализе, клоны ранжировали по их значениям IC_{50} для относительного улучшения связывания с α -syn по сравнению с исходным IgG asyn0087. Клоны с наилучшим связыванием с α -syn подвергали дальнейшему анализу для определения их селективности с использованием нескольких представителей семейства синуклеинов (человеческих α -syn, β -syn, γ -syn) и перекрестной реактивности в отношении α -syn яванского макака и крысиного α -syn в HTRF-анализе прямого связывания или эпитопконкурентном HTRF-анализе.

По результатам этих повторных раундов рекомбинирования и скрининга библиотек были идентифицированы два активных клона, специфичные в отношении α -syn и перекрестно реактивные в отношении α -syn яванского макака и крысиного α -syn, aslo0452 ngl-1 и aslo0467.

Проводили односточковый мутагенез aslo0452 ngl-1 в каждом из CDR, где было отмечено улучшение активности по IC_{50} . По отдельности проводили мутации по каждому положению выбранного CDR с использованием всех 20 возможных аминокислотных остатков и снова проводили скрининг эпитопконкурентным HTRF-анализом на предмет улучшения IC_{50} по сравнению с IgG aslo0452 ngl-1. Были проведены идентификация и комбинирование множества остатков в четырех CDR (H2, H3, L1 и L3) как в aslo0452 ngl-1, так и в aslo0467 с их повторной оценкой в эпитопконкурентном HTRF-анализе на предмет улучшения IC_{50} по сравнению с aslo0452 ngl-1. По результатам этих экспериментов два клона с наилучшим связыванием были идентифицированы как aslo0452 ngl-3 и aslo0543.

На фиг. 2 представлено сравнение аминокислотных последовательностей областей VH и VL asyn0087, aslo0452 ngl-3 и aslo0543.

Пример 2.1. Переформатирование scFv в IgG1 TM.

Клоны одноцепочечных Fv с желаемыми свойствами связывания с α -syn преобразовывали в антитела, имеющие формат полноразмерных иммуноглобулинов G1 TM (IgG1 TM), лишенных эффекторной функции (Oganesyan et al. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. (2008), 64(Pt 6):700-4; включено сюда посредством ссылки), в целом, как описано в Persic et al. (Persic et al., Gene (1997) 187: 9-18; включено сюда посредством ссылки), со следующими модификациями. В векторы экспрессии был включен фрагмент OriP для облегчения их использования с клетками CHO для транзитной трансфекции и обеспечения возможности эпизодической репликации. Вариабельный домен тяжелой цепи (VH) клонировали в вектор (pEU1.4), содержащий человеческие константные домены тяжелой цепи и регуляторные элементы для экспрессии полноразмерной тяжелой цепи IgG1 TM в клетках млекопитающих. Сходным образом, ва-

риабельный домен легкой цепи (VL) клонировали в вектор (pEU4.4) для экспрессии человеческих константных доменов легкой цепи (лямбда) с регуляторными элементами для экспрессии полноразмерной легкой цепи IgG в клетках млекопитающих. Для получения IgG клетки CHO для транзиторной трансфекции, являющиеся клетками млекопитающего, трансфицировали векторами экспрессии тяжелых и легких цепей IgG (Daramola et al., *Biotechnol Prog* (2014) 30: 132-141; включено сюда посредством ссылки). IgG экспрессировали с их секрецией в среду. Полученный материал фильтровали перед очисткой, после чего IgG очищали с применением хроматографии на белке А. Культуральные супернатанты наносили на колонку Ceramic Protein A (BioSeptra) подходящего размера и промывали с использованием 50 mM трис-HCl, pH 8,0, 250 mM NaCl. Связанный IgG элюировали из колонки с использованием 0,1 M цитрата натрия (pH 3,0) и нейтрализовали добавлением трис-HCl (pH 9,0). Элюированный материал подвергали замене буфера на PBS с использованием колонок Nap10 (Amersham, #17-0854-02) и проводили спектрофотометрическое определение концентрации IgG с использованием коэффициента экстинкции, основанного на аминокислотной последовательности IgG (Mach et al., *Anal Biochem* (1992) 200: 74-80; включено сюда посредством ссылки). Степень очистки очищенного IgG от агрегатов и продуктов распада анализировали с применением SEC-HPLC и посредством SDS-PAGE.

Обоснованием использования IgG1 TM в качестве формата лекарственного средства-кандидата является минимизация неспецифического лизиса, обусловленного активацией иммунокомпетентных клеток и комплемента (то есть избыточного образования C3a, которое может приводить к воспалению). Неспецифический лизис клеток может быть вызван возможным накоплением иммунных комплексов, образованных лекарственным средством-кандидатом и внеклеточным α -синуклеином, который, как было показано, взаимодействует с липидными мембранами (Bartels et al., *Biophys. J.* (2010), 99: 2116-2124; включено сюда посредством ссылки). Формат IgG1 TM был выбран, поскольку было продемонстрировано, что он обладает пренебрежительно малым связыванием с Fc γ -рецепторами (Fc γ R) и сниженной C1q-опосредованной активацией комплемента иммунными комплексами (Oganessian et al. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* (2008), 64(Pt 6):700-4; включено сюда посредством ссылки).

Для минимизации любых возможных рисков иммуногенности каркасные области aslo0452 ngl-3 настолько близки к человеческим эмбриональным аминокислотным последовательностям, насколько это возможно без снижения активности. Это означает, что некоторые аминокислоты aslo0452 ngl-3, включая остатки Вернье (Vernier residues) (Foote and Winter, *J Mol Biol.* (1992), 224(2): 487-99; включено сюда посредством ссылки), не соответствуют ближайшей человеческой эмбриональной последовательности. В домене V_H aslo0452 ngl-3 есть один остаток Вернье, не соответствующий человеческим эмбриональным последовательностям IG_{VH}3-23 и IG_{JH}6 (фиг. 3C). В домене V_L aslo0452 ngl-3 все остатки каркасных областей совпадают с человеческими эмбриональными последовательностями IGLV5-45 и IGLJ2 или IGLJ3 (фиг. 3D).

Пример 3. Подтверждение эпитопов IgG против α -syn с оптимизированной аффинностью.

Рекомбинантный человеческий α -, β - и γ -синуклеин, рекомбинантные усеченные варианты человеческого α -синуклеина (aa1-60, aa1-95, aa61-140, 96-140, ANAC и NCAP), и мышинный α -синуклеин были получены от rPeptide LLC. Ориентировочное картирование эпитопов проводили с использованием имеющихся в продаже усеченных вариантов α -syn.

Кратко, каждый усеченный вариант в концентрации один микрограмм на миллилитр сорбировали на микротитрационные лунки в течение ночи при 4°C. После промывки лунок в PBS вносили каждое антитело против α -syn в разведении 1 мкг/мл.

После 1 ч инкубации и промывки выявляли связанное антитело, добавляя антитело против человеческого IgG, конъюгированное с HRP или Eu⁺. После инкубации и промывки добавляли подходящий субстрат для выявления (TMB или раствор DELFIA Enhancer соответственно) и планшет считывали с использованием аппарата для прочтения микротитрационных планшетов.

В этих исследованиях связывания эпитопов было обнаружено, что ведущий изолят asyn0087 распознает эпитоп, расположенный в C-концевой области белка α -syn между аминокислотами 102 и 130 (фиг. 4A). aslo0452 ngl-3 и aslo0543 распознают тот же эпитоп, расположенный в C-концевой области белка α -syn между аминокислотами 102 и 130, аналогично ведущему изоляту asyn0087, на основе которого они были получены (фиг. 4B).

Пример 4. Специфичность aslo0452 ngl-3 и aslo0543 в отношении α -syn в сравнении с другими представителями семейства синуклеинов при применении эпитопконкурентного HTRF-анализа.

В случае антитела, предназначенного для терапевтического применения, важно, чтобы оно было специфичным в отношении человеческого α -syn для минимизации любых возможных рисков по безопасности, связанных с нецелевым взаимодействием с другими синуклеинами (β -синуклеином и γ -синуклеином).

Специфичность aslo0452 ngl-3 и aslo0543 в отношении α -syn в сравнении с другими представителями семейства синуклеинов, β -syn и γ -syn, определяли с применением эпитопконкурентного HTRF-анализа, позволяющего оценить связывание биотинилированного человеческого α -syn с антителом в растворе.

α -syn, β -syn и γ -syn титрованием добавляли в анализируемые образцы и оценивали селективность IgG aslo0452 ngl-3 и IgG aslo0543, измеряя степень ингибирования связывания биотинилированного человеческого α -syn с aslo0452 ngl-3/aslo0543. Значения IC_{50} определяли, проводя подбор кривых по полученным данным с применением логистического уравнения с четырьмя параметрами и программного обеспечения PRISM 6® (Graphpad). Более чувствительные HTRF-анализы, позволяющие оценить прямое связывание IgG с человеческим α -syn, β -syn и γ -syn, также были применены для подтверждения специфичности в отношении α -syn (данные не показаны). Для отрицательного контроля анализируемый образец с антителом заменяли контрольным антителом того же изотипа или буфером.

Репрезентативные значения IC_{50} , полученные при использовании белков α -syn, β -syn и γ -syn в эпито-конкурентных HTRF-анализах aslo0452 ngl-3 и aslo0543, показаны на фиг. 5. Связывания β -syn и γ -syn в проанализированных концентрациях (до 5 мкМ) отмечено не было, что указывает на селективность aslo0452 ngl-3 и aslo0543 в отношении α -syn.

Пример 5. Специфичность aslo0452 ngl-3 в отношении человеческого α -syn, α -syn яванского макака и крысиного α -syn при применении эпито-конкурентного HTRF-анализа.

В свете терапевтического применения важно, чтобы антитело было перекрестно реактивным в отношении α -синуклеина яванского макака, и желательно, чтобы оно было перекрестно реактивным в отношении крысиного α -синуклеина в пределах 10 раз по сравнению с человеческим α -syn. Это необходимо для обеспечения возможности проведения исследований безопасности как у яванских макаков, так и у крыс.

Специфичность aslo0452 ngl-3 и aslo0543 в отношении человеческого α -syn, α -syn яванского макака и крысиного α -syn определяли с применением эпито-конкурентного HTRF-анализа, позволяющего оценить связывание биотинилированного человеческого α -syn с aslo0452 ngl-3 в растворе.

Человеческий α -syn, α -syn яванского макака и крысиный α -syn титрованием добавляли в анализируемые образцы и оценивали селективность антитела, измеряя степень ингибирования связывания биотинилированного человеческого α -syn с антителом. Значения IC_{50} определяли, проводя подбор кривых по полученным данным с применением логистического уравнения с четырьмя параметрами и программного обеспечения PRISM 6® (Graphpad). Межвидовую перекрестную реактивность aslo0452 ngl-3 и aslo0543 также подтверждали с применением формата HTRF-анализа прямого связывания (не показано). Aslo0452 ngl-3 (или aslo0543) титрованием добавляли в анализируемые образцы для определения конкуренции за связывание с человеческим α -syn, α -syn яванского макака или крысиным α -syn с aslo0452 ngl-3 (или aslo0543) в HTRF-анализе. Для отрицательного контроля анализируемый образец с антителом заменяли контрольным антителом того же изотипа или буфером.

Репрезентативные значения IC_{50} , полученные при использовании белков человеческого α -syn, α -syn яванского макака и крысиного α -syn в эпито-конкурентном HTRF-анализе, показаны на фиг. 6. Aslo0452 ngl-3 связывается с человеческим α -syn и α -syn яванского макака со значениями IC_{50} 5,7 и 6,8 нМ соответственно и связывается с крысиным α -syn со значением IC_{50} 19,6 нМ, отличающимся от указанных выше значений менее чем в 4 раза. Aslo0543 связывается с человеческим α -syn и α -syn яванского макака со значениями IC_{50} 2,0 и 2,1 нМ соответственно и связывается с крысиным α -syn со значением IC_{50} 3,8 нМ, отличающимся от указанных выше значений менее чем в 2 раза.

Способность aslo0452 ngl-3 связываться с человеческим α -syn, α -syn яванского макака и крысиным α -syn указывает на связывание с эпитопом человеческого α -синуклеина, отличным от эпитопа, с которым связываются антитела, не связывающиеся с человеческим α -syn, α -syn яванского макака и крысиным α -syn.

Пример 6. Специфичность клонов с оптимизированной аффинностью в отношении нативного α -syn при ее оценке проточной цитометрией.

Специфичность IgG против α -syn с оптимизированной аффинностью aslo0452 ngl-3 и aslo0543 в отношении связывания с нативным эндогенным человеческим α -syn определяли проточной цитометрией с использованием α -syn-положительных и α -syn-отрицательных клеточных линий.

Кратко, клетки нейробластомы SH-SY5Y (α -syn-положительные) и клетки рака молочной железы BT-20 (α -syn-отрицательные) фиксировали в 0,01%-м формальдегиде и затем пермеабелизировали с использованием 0,5%-го (об./об.) Tween 20 перед инкубацией с антителами против α -syn, антителами положительного контроля или изотипического контроля. После многократной промывки связанное антитело выявляли инкубацией с FITC-конъюгированным вторичным антителом против человеческого или против мышинового IgG. После еще нескольких промывок клетки анализировали в приборе FACS Canto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) и данные анализировали с применением программного обеспечения Flow Jo Software (Tree Star, Ashland, OR).

Данные наносили на гистограммы, демонстрирующие различия между клетками, которые были окрашены сами по себе, и клетками, окрашенными первичными антителами. Результаты, показанные на фиг. 7A, демонстрируют сдвиг флуоресцентного сигнала в присутствии asyn0087 (изображение D) у α -syn-положительных клеток SH-SY5Y в сравнении с изотипическим контролем и вторичным антителом

самим по себе (изображение В), что указывает на распознавание эндогенно экспрессированного α -syn. Asyn0087 не связывается с α -syn-отрицательной клеточной линией человеческого рака молочной железы BT-20 (изображение С). Результаты, показанные на фиг. 7В, демонстрируют выраженный сдвиг флуоресцентного сигнала в присутствии aslo0452 ngl-3 или aslo0543 (изображение Н), сопоставимый с антителом положительного контроля 4D6, у α -syn-положительных клеток SH-SY5Y (изображение F) и отсутствие сдвига у α -syn-отрицательных клеток BT-20 (изображение G). Это демонстрирует, что как aslo0452 ngl-3, так и aslo0543 связываются с нативным эндогенно экспрессированным внутриклеточным человеческим α -syn.

Пример 7. Специфичность оптимизированных IgG против α -syn в отношении агрегированного человеческого α -syn по результатам DELFIA-ELISA.

Препараты фибрилл или агрегатов человеческого α -syn получали, как описано Emadi et al. (Emadi et al., *Biochemistry* (2004), 43: 2871-2878; включено сюда посредством ссылки). Кратко, аликвоту 200 мкл 50 мкМ рекомбинантного α -syn переносили в пробирку типа Зарштедт (Sarstedt tube) объемом 1,8 мл и помещали в шейкер-инкубатор при 37°C на 3 суток при 280 об/мин. Присутствие агрегированного α -syn определяли включением тиофлавина Т, который добавляли до конечной концентрации 10 мкМ с последующей инкубацией в темноте в течение 1 ч при комнатной температуре и считыванием флуоресценции при длине волны возбуждения 450 нм и длине волны эмиссии 485 нм с использованием аппарата для прочтения микропланшетов Envision.

Специфичность IgG против α -syn с оптимизированной аффинностью aslo0452 ngl-3 и aslo0543 и ведущего антитела asyn0087 в отношении агрегированного человеческого α -syn определяли с применением DELFIA®-анализа с захватом антител. Этот анализ позволял оценить захват агрегированного человеческого α -syn антителами aslo0452 ngl-3, aslo0543 или asyn0087 в парном ELISA. Кратко вариант антитела против α -syn в форме мышинового IgG1 иммобилизовали на лунке 96-луночного микротитрационного планшета (Nunc). После блокировки в лунках инкубировали агрегированный или мономерный человеческий α -syn. После промывки захваченный человеческий α -syn выявляли добавлением варианта того же антитела против α -syn в форме человеческого IgG1 ТМ и затем антитела против человеческого IgG, конъюгированного с европием (Perkin Elmer) или антитела против человеческого IgG, конъюгированного с HRP. После инкубации и промывки добавляли подходящий субстрат для выявления (ТМВ или раствор DELFIA Enhancer соответственно) и планшет считывали с использованием аппарата для прочтения микротитрационных планшетов.

В данном анализе возможны захват и выявление только агрегированного человеческого α -syn, поскольку на каждом его агрегате присутствует несколько копий одного и того же эпитопа. На мономерном α -syn присутствует только одна копия эпитопа, поэтому связывание со вторичным антителом для выявления в присутствии антитела для захвата невозможно. Полученные данные показаны на фиг. 8. Ведущий изолят asyn0087 способен связываться с агрегированным рекомбинантным человеческим α -syn. Таким образом, эпитоп, с которым связывается asyn0087, сам по себе не вовлечен в агрегацию α -syn. Как aslo0452 ngl-3, так и aslo0543 сохраняли способность связываться с агрегированным рекомбинантным человеческим α -syn.

Пример 8. Специфичность оптимизированных IgG против α -syn в болезненных тканях по результатам иммуногистохимии.

Специфичность IgG против α -syn с оптимизированной аффинностью aslo0452 ngl-3 и aslo0543 и ведущего антитела asyn0087 в отношении болезненных форм человеческого α -syn определяли иммуногистохимическим окрашиванием ткани головного мозга при болезни Паркинсона. Результаты показаны на фиг. 9 и демонстрируют, что аналогично asyn0087, aslo0452 ngl-3 и aslo0543 могут распознавать болезненные патологические формы человеческого α -syn в срезах ткани головного мозга при болезни Паркинсона, включая тельца Леви, нейриты Леви, нейронные агрегаты, точки Леви и фоновую ткань головного мозга. Неспецифического окрашивания нормальной или здоровой ткани головного мозга отмечено не было.

Пример 9. Определение аффинности антитела против α -syn.

Равновесные константы диссоциации (K_D) IgG против α -syn в отношении человеческого α -syn определяли с применением двух платформ: Octet Red (Forte Bio) и KinExA (Sapidyne Instruments).

Обе аналитические системы продемонстрировали хорошее соответствие, указывая на аффинность aslo0452 ngl-3 в субнаномолярном диапазоне. В таблице представлены значения аффинности, полученные для ключевых клонов против α -syn в процессе выделения и оптимизации ведущих клонов.

Пример 9.1. Аффинность aslo0452 ngl-3 по результатам анализа Octet.

Аффинность IgG aslo0452 ngl-3 в отношении рекомбинантного бактериально экспрессированного мономерного человеческого α -syn-Flag-His с avi-меткой оценивали с использованием прибора Octet Red. Aslo0452 ngl-3 предварительно смешивали с различными концентрациями каждого лиганда до достижения равновесия. Количество свободного антитела затем измеряли с применением анализа Octet посредством захвата свободного aslo0452 ngl-3 с использованием биотинилированного α -syn, иммобилизованного

на сенсорах со стрептавидиновым покрытием. Количество свободного антитела, определенное при каждой концентрации α -syn, наносили на график против концентрации лиганда и для расчета равновесной константы диссоциации (K_D) использовали программное обеспечение KinExA. Результаты, показанные в таблице, демонстрируют, что IgG aslo0452 ngl-3 связывается с человеческим α -syn с аффинностью 106 пМ.

Пример 9.2: Аффинность aslo0452 ngl-3 по результатам анализа KinExA.

В дополнение, аффинность IgG aslo0452 ngl-3 в растворенной фазе (K_D) в отношении рекомбинантного бактериально экспрессированного мономерного человеческого биотинилированного α -syn определяли с использованием прибора KinExA (Sapidyne Instruments). Aslo0452 ngl-3 предварительно смешивали с различными концентрациями каждого лиганда до достижения равновесия. Количество свободного антитела затем измеряли с применением анализа KinExA посредством захвата свободного aslo0452 ngl-3 с использованием гранул, покрытых α -syn, отмывки несвязанных веществ и выявления связанного антитела с использованием флуоресцентно-меченого видоспецифичного антитела. Количество свободного антитела, определенное при каждой концентрации α -syn, наносили на график против концентрации лиганда и для расчета равновесной константы диссоциации (K_D) использовали программное обеспечение KinExA. Результаты, показанные в таблице, демонстрируют, что IgG aslo0452 ngl-3 связывается с α -syn с аффинностью 74 пМ, показывая хорошее соответствие с анализом аффинности в растворенной фазе Octet, описанным выше.

Пример 9.3: Аффинность Fab-фрагмента aslo0452 ngl-3 по результатам анализа KinExA.

Fab-фрагмент aslo0452 ngl-3 связывается с α -синуклеином с высокой аффинностью. Значение K_D Fab-фрагмента aslo0452 ngl-3 в отношении α -синуклеина, измеренное в анализе KinExA (как описано в приведенном выше примере для полноразмерного антитела), составляет 174 пМ (95%-й ДИ: 15-177 пМ).

Пример 10. Влияние aslo0452 ngl-3 на уровни свободного несвязанного α -синуклеина в интерстициальной жидкости (ISF) префронтальной коры самцов крыс линии Спрег-Доули.

Взрослым самцам крыс линии Спрег-Доули (Sprague Dawley) (293-417 г; Harlan, the Netherlands) проводили анестезию и имплантировали направляющие в префронтальную кору.

За один сутки до эксперимента в префронтальную кору имплантировали возвратно-поступательные зонды (push pull probes) (мембрана из 1-3 МДа полиэтилена, 4 мм) с использованием стереотаксической рамки (координаты зондов: AP минус 3,4 мм (относительно брегмы), латерально плюс 0,8 мм (относительно срединной линии), вентрально минус 5,0 мм (относительно твердой мозговой оболочки), резец (incisor bar) устанавливали на минус 3,3 мм (все координаты указаны по Paxinos and Watson, The ratbrain in stereotaxic coordinates, Academic Press, New York, 6th edition 2008). Зонды прикрепляли к черепу винтами из нержавеющей стали и зубным цементом.

В день эксперимента возвратно-поступательные микродиализные зонды соединяли гибкими РЕЕК-трубками (Western Analytical Products Inc. USA; PK005-020) с микроперфузионным насосом (Harvard) и проводили перфузию искусственной CSF (перфузат), содержащей 147 мМ NaCl, 3,0 мМ KCl, 1,2 мМ CaCl₂ и 1,2 мМ MgCl₂ с 0,2% BSA при скорости потока 0,5 мкл/мин. Выходные отверстия зондов соединяли с гибкими FEP-трубками. После как минимум двух часов предварительной стабилизации вводили aslo0452 ngl-3 в PBS или PBS сам по себе (наполнитель), 30 или 0 мг/кг соответственно. Соединение вводили в дозе 2 мл/кг внутривенно. Микродиализные образцы получали с интервалами 120 мин. Образцы помещали в мини-пробирки (Microbiotech/se AB, Sweden; 4001029). Все образцы хранили при -80°C.

Для определения концентрации свободного α -синуклеина в крысиной ISF микродиализные образцы сначала подвергали иммунопреципитации для удаления aslo0452 ngl-3. Иммунопреципитация одновременно приводит к осаждению α -синуклеина, связанного с терапевтическими антителами, в то время как несвязанный "свободный" α -синуклеин остается в супернатанте. Раствор гранул с белком А (DynaBeads® Protein A) вносили в 96-луночный планшет без юбки (полипропилен, 0,2 мл) и проводили двукратную промывку TBST (50 мМ TBS с 0,1% Tween 20), используя магнит (DynaMag™ 96 side) для разделения гранул и раствора. В каждую лунку добавляли размороженные микродиализные образцы ISF (10 или 20 мкл), перемешивали их с гранулами пипетированием и инкубировали при 4°C с вращением под наклоном на протяжении 10 мин. Затем гранулы дважды осаждали с использованием магнита для обеспечения их полного удаления. Иммунопреципитированные образцы CSF переносили в 96-луночный планшет из набора для ELISA против α -синуклеина (Sensolyte™ Quantitative ELISA kit, human/mouse/rat, AnaSpec, US, AS-55550) с предварительным внесением буфера для разведения образцов до общего объема 100 мкл. В планшет вносили калибровочные образцы, по 100 мкл на лунку в двух повторях, и в каждую лунку добавляли по 50 мкл рабочего раствора антитела для выявления. Планшет инкубировали при +4-8°C в течение ночи с покачиванием в темноте и затем промывали шесть раз, используя по 350 мкл промывочного буфера. В завершение, в каждую лунку добавляли по 100 мкл TMB-субстрата для окрашивания и планшет инкубировали 10-15 мин при комнатной температуре в темноте. Для остановки реакции в каждую лунку добавляли по 50 мкл останавливающего раствора и считывание планшета на предмет поглощения при 450 нм проводили в течение 2 ч. Количественное определение проводили, нанося на график ответ калибровочной кривой в форме единиц поглощения по линейной шкале против концентра-

ции по логарифмической шкале. Для подбора кривых использовали функцию с четырьмя параметрами.

Было продемонстрировано времязависимое снижение α -синуклеина в ISF (фиг. 10) после однократного внутривенного введения aslo0452 ngl-3 в дозе 30 мг/кг.

Пример 11. Влияние aslo0452 ngl-3 на уровни свободного несвязанного α -синуклеина в CSF самцов крыс линии Спрег-Доули.

Взрослым самцам крыс линии Спрег-Доули проводили анестезию и катетеризацию большой цистерны для сбора образцов CSF. В большую цистерну помещали постоянный 0,8 см катетер и выводили его наружу через разрез в верхней части черепа. Конец CSF-катетера фиксировали на месте акриловым зубным цементом и прикрепляли к черепу тремя винтами из нержавеющей стали. Перед введением соединения животным давали по меньшей мере 2 суток на восстановление.

Aslo0452 ngl-3 разводили в буфере для введения в дозе 3, 10, 30 или 100 мг/кг. Соединение или наполнитель сам по себе вводили в дозе 2 мл/кг внутривенно.

Соединение вводили после получения по меньшей мере четырех чистых образцов CSF в течение по меньшей мере двух суток. На "0" сутки всем животным вводили aslo0452 ngl-3 или наполнитель. Образцы CSF получали в каждой указанной временной точке. До отправки все образцы хранили при -80°C .

Для определения концентрации свободного α -синуклеина в CSF α -синуклеин, связанный с aslo0452 ngl-3, удаляют иммунопреципитацией (IP) перед анализом. IP одновременно приведет к осаждению α -синуклеина, связанного с терапевтическими антителами, в то время как несвязанный "свободный" α -синуклеин остается в супернатанте. Определение уровней свободного α -синуклеина в супернатанте проводят с использованием коммерческого набора для ELISA, полученного от Anaspec. Анализ проводили, как описано в результатах по ISF (как описано в примере 10).

Было продемонстрировано дозо- и времязависимое снижение α -синуклеина в CSF (фиг. 11) после однократного внутривенного введения aslo0452 ngl-3 в диапазоне доз 3-100 мг/кг.

Пример 12. Определение функциональных характеристик aslo0452 ngl-3 по уменьшению распространения α -синуклеина в лентивирусной модели α -синуклеинопатии *in vivo*.

Способность высокоаффинного антитела против α -синуклеина aslo0452 ngl-3 блокировать распространение α -синуклеина исследовали с применением лентивирусной модели α -синуклеинопатии *in vivo* у мышей. С этой целью как нетрансгенным мышам дикого типа (non-tg), так и трансгенным мышам, сверхэкспрессирующим α -синуклеин (α -syn tg), вводили лентивирусный вектор, экспрессирующий α -синуклеин (LV- α -syn), в правый гиппокамп и затем пассивно иммунизировали каждую неделю на протяжении 13 недель мышинными антителами IgG1 против α -синуклеина, включая aslo0452 ngl-3, и контрольным мышинным IgG1 NIP228 того же изотипа. В конце периода иммунизации мышей умерщвляли и их головной мозг фиксировали в 4% PFA, после чего готовили коронарные срезы и анализировали их с применением иммуногистохимии и автоматического анализа изображений на предмет уровней α -синуклеиновой иммунореактивности ипсилатерально и контралатерально относительно места введения LV- α -syn.

Хирургическое вмешательство и пассивная иммунизация.

Нетрансгенным мышам дикого типа (non-tg; n равно 40) и мышам, трансгенным по α -синуклеину (α -syn tg; n равно 40) в возрасте трех-четырех месяцев проводили однократную одностороннюю инъекцию лентивирусного вектора, экспрессирующего α -синуклеин (LV- α -syn), в правый гиппокамп (-2,0, 1,5, -1,3 от брегмы). Через две недели после хирургического вмешательства с инъекцией LV- α -syn мышам начинали еженедельно вводить мышинные антитела IgG1 против α -синуклеина aslo0452 ngl-3 (non-tg n равно 10; α -syn tg n равно 10), aslo0452 ngl-3-D265A (non-tg n равно 10; α -syn tg n равно 10), 9E4 (non-tg n равно 10; α -syn tg n равно 10) или контрольный мышинный IgG1 NIP228 того же изотипа (non-tg n равно 10; α -syn tg n равно 10).

Все мышинные IgG вводили в дозе 20 мг/кг внутрибрюшинно (в/б) на протяжении 13 недель. Животных размещали группами не более 4 на клетку. Животных содержали при цикле света/темноты 12/12 со свободным доступом к корму и воде. Клетки меняли один раз в неделю и ежедневно осматривали. Отмечали любые нежелательные явления. Все животные хорошо переносили хирургические процедуры и иммунизацию. В конце периода введения антител мышей умерщвляли, следуя руководствам по гуманному обращению с животными, приготавливали серийные срезы головного мозга по коронарной оси и оценивали их для нейропатологического анализа распространения α -синуклеина иммуногистохимическими методами.

Иммуногистохимия на α -синуклеин.

Головной мозг извлекали, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде, готовили срезы с интервалом 40 мкм по коронарной оси с использованием вибратора и хранили их при -30°C в криозащитной среде (30% глицерина, 30% этиленгликоля, 40% PBS). После промывки в PBS и обработок блокирующим буфером срезы инкубировали в течение ночи при 4°C с первичным антителом (mAb против α -синуклеина SYN-1 от BD в разведении 1:500), промывали в PBS и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с вторичным антителом (биотинилированным антителом против мышинного IgG от Vector Labora-

toies в разведении 1:100). После завершающих стадий промывки в PBS окрашивание α -синуклеина локализовали с применением системы выявления на основе авидин/биотинпероксидазного комплекса (Elite ABC, Vector Laboratories). Затем срезы анализировали с применением автоматического анализа изображений на предмет уровней α -синуклеина ипсилатерально и контралатерально относительно места введения лентивирусного вектора (LV- α -syn).

Статистический анализ.

Данные, полученные при автоматическом определении уровней α -синуклеина по изображениям в non-tg и α -syn tg группах введения, анализировали с применением программного обеспечения GraphPad Prism, Сан-Диего, штат Калифорния, США. Однофакторный ANOVA проводили с применением апостериорного критерия Даннетта для множественных сравнений. Данные, показанные на графических материалах, представлены как среднее плюс/минус стандартная ошибка среднего (standard error of mean, SEM). Различия между группами признавали статистически значимыми при $p < 0,05$. Все анализы проводили слепым методом. Распределение по группам введения антител также проводили слепым методом.

Результаты.

Как у non-tg, так и у α -syn tg мышей α -синуклеиновая иммунореактивность нейронпилей на стороне инъекции LV- α -syn (ипсилатерально) была интенсивной и охватывала большую часть поверхности гиппокампа (фиг. 12A, 15A; NIP228 -ипсилатерально). Контралатеральный неинъецированный гиппокамп non-tg и α -syn tg мышей также продемонстрировал высокие уровни α -синуклеиновой иммунореактивности, указывая на распространение α -синуклеина, экспрессированного лентивирусным вектором, из инъекционного правого гиппокампа в левый гиппокамп (фиг. 12A, 15A; NIP228 - контралатерально). В предшествующих экспериментах, проведенных в этой модели у мышей с инъекцией лентивируса, экспрессирующего α -синуклеин, было показано, что на контралатеральную сторону распространяется только экспрессированный белок α -синуклеин без признаков переноса самого лентивируса, как определено PCR-анализом (данные не показаны).

Уровни экспрессированного лентивирусом α -синуклеина в ипсилатеральном и контралатеральном гиппокампе non-tg мышей, пассивно иммунизированных антителом 9E4 (9E4 - мышинный вариант PRX002 (Prothema)), были почти идентичны уровням экспрессированного лентивирусом α -синуклеина в ипсилатеральном и контралатеральном гиппокампе non-tg мышей, пассивно иммунизированных контрольным мышинным IgG1 NIP228 того же изотипа (фиг. 12A, B, C; 9E4 в сравнении с NIP228), указывая на то, что 9E4, вводимое в дозе 20 мг/кг каждую неделю на протяжении 13 недель в/б путем введения, не блокирует диссеминацию α -синуклеина в этой модели распространения α -синуклеина.

В отличие от этого уровни экспрессированного лентивирусом α -синуклеина как в ипсилатеральном, так и в контралатеральном гиппокампе non-tg мышей, пассивно иммунизированных антителом aslo0452 ngl-3 или мутантным вариантом aslo0452 ngl-3, лишенным эффекторной функции (aslo0452 ngl-3-D265A), в котором замена аспарагиновой кислоты на аланин в положении 265 (D265A) мышинового IgG1 приводит к утрате взаимодействия этого изотипа с низкоаффинными IgG-Fc-рецепторами (Fc γ RIIb и Fc γ RIII), присутствующими в микроглие, были очень существенно снижены, по сравнению с уровнями экспрессированного лентивирусом α -синуклеина в ипсилатеральном и контралатеральном гиппокампе non-tg мышей, пассивно иммунизированных контрольным мышинным IgG1 NIP228 того же изотипа (фиг. 12A, B, C; aslo0452-ngl-3 и aslo0452 ngl-3-D265A в сравнении с NIP228). Это указывает на то, что пассивная иммунизация мышей антителом aslo0452 ngl-3 или D265A-мутантным вариантом aslo0452 ngl-3, лишенным эффекторной функции, активно блокирует распространение α -синуклеина в этой модели α -синуклеинопатии у мышей. Сходные результаты были получены при введении вектора LV- α -syn в правый гиппокамп α -syn tg мышей; пассивная иммунизация антителами aslo0452 ngl-3 или aslo0452 ngl-3-D265A, но не антителом 9E4, приводила к выраженному и статистически значимому снижению ипсилатеральных и контралатеральных уровней α -синуклеиновой иммунореактивности в гиппокампе по сравнению с α -syn tg мышами, которым вводили антитело NIP228 (фиг. 15A, B, C).

При большем увеличении иммунореактивных отложений α -синуклеина, экспрессированного лентивирусом, у non-tg мышей можно было наблюдать как в ипсилатеральных аксонах инъекционной стороны, так и в контралатеральных аксонах неинъецированной стороны (фиг. 13A; черными стрелками показаны трансгиппокампаальные аксоны), указывая на то, что распространение α -синуклеина в контралатеральный гиппокамп может принципиально происходить по аксонам (трансаксональное распространение). Ипсилатеральные и контралатеральные уровни аксональных отложений α -синуклеина у non-tg мышей, пассивно иммунизированных антителом 9E4 или контрольным мышинным IgG1 NIP228 того же изотипа, значимо не различались (фиг. 13A, B, C; 9E4 в сравнении с NIP228), показывая, что в рассматриваемых экспериментальных условиях 9E4 не влияет на уровни аксональных отложений α -синуклеина и не уменьшает диссеминацию α -синуклеина по аксонам в данной модели распространения лентивирусной α -синуклеинопатии.

В отличие от этого как ипсилатеральные, так и контралатеральные уровни аксональных отложений α -синуклеина у non-tg мышей, пассивно иммунизированных антителом aslo0452 ngl-3 или мутантным

вариантом aslo0452 ngl-3, лишенным эффекторной функции (aslo0452 ngl-3-D265A), были существенно ниже уровней аксональных отложений α -синуклеина у non-tg мышей, которым вводили контрольный мышинный IgG1 NIP228 того же изотипа (фиг. 13A, B, C; aslo0452 ngl-3 и aslo0452 ngl-3-D265A в сравнении с NIP228), указывая на то, что пассивная иммунизация мышей антителом aslo0452 ngl-3 или D265A-мутантным вариантом aslo0452 ngl-3, лишенным эффекторной функции, устраняет аксональные отложения α -синуклеина и активно блокирует ипсилатерально-контралатеральный перенос α -синуклеина по аксонам в данной модели распространения лентивирусной α -синуклеинопатии.

Очень похожие результаты были получены при введении вектора LV- α -syn в правый гиппокамп α -syn tg мышей; пассивная иммунизация антителами aslo0452 ngl-3 или aslo0452 ngl-3-D265A, но не антителом 9E4, приводила к выраженному и статистически значимому снижению ипсилатеральных и контралатеральных уровней α -синуклеиновой иммунореактивности в аксонах по сравнению с α -syn tg мышами, которым вводили антитело NIP228 (фиг. 16A, B, C).

При большем увеличении у мышей non-tg после инъекции LV- α -syn выраженная α -синуклеиновая иммунореактивность была обнаружена в нейропилах ипсилатерального гиппокампа и, в меньшей степени, в нейропилах ипсилатерального неокортекса (фиг. 14A). Кроме того, многочисленные отложения α -синуклеина были выявлены в нескольких различных телах (сомах) нейронов в CA1-области ипсилатерального гиппокампа, а менее выраженная α -синуклеиновая иммунореактивность была выявлена в нейронах 5-го слоя ипсилатерального неокортекса (фиг. 14; черные стрелки). В то время как антитело 9E4 не приводило к существенным изменениям числа нейронов CA1-области ипсилатерального гиппокампа или ипсилатеральных неокортикальных нейронов 5-го слоя, содержащих отложения α -синуклеина, по сравнению с non-tg мышами, иммунизированными контрольным мышинным IgG NIP228 того же изотипа (фиг. 14A, B, C; 9E4 в сравнении с NIP228), у non-tg мышей, которым вводили антитело aslo0452 ngl-3 или мутантный вариант aslo0452 ngl-3, лишенный эффекторной функции (aslo0452 ngl-3-D265A), число ипсилатеральных CA1-нейронов и ипсилатеральных нейронов 5-го слоя, содержащих отложения α -синуклеина, было существенно снижено по сравнению с non-tg мышами, которым вводили контрольный мышинный IgG NIP228 того же изотипа (фиг. 14A, B, C; aslo0452 ngl-3 и aslo0452 ngl-3-D265A в сравнении с NIP228).

Кроме того, степень выраженности α -синуклеиновой иммунореактивности в нейропилах и нейронах ипсилатеральной CA1-области гиппокампа и 5-м слое ипсилатерального неокортекса у non-tg мышей, которым вводили aslo0452 ngl-3 и aslo0452 ngl-3-D265A, была заметно ниже, чем у non-tg мышей, которым вводили контрольный мышинный IgG NIP228 того же изотипа (фиг. 14A; aslo0452 ngl-3 и aslo0452 ngl-3-D265A в сравнении с NIP228).

Сходные результаты были получены при введении вектора LV- α -syn в правый гиппокамп α -syn tg мышей; введение антител aslo0452 ngl-3 или aslo0452 ngl-3-D265A, но не антитела 9E4, приводило к статистически значимому уменьшению числа нейронов с выраженной α -синуклеиновой иммунореактивностью в ипсилатеральной CA1-области гиппокампа и 5-м слое ипсилатерального неокортекса, а также в контралатеральной CA1-области гиппокампа, по сравнению с α -syn tg мышами, которым вводили антитело NIP228 (фиг. 17A, B, C, D).

Было продемонстрировано, что пассивная иммунизация non-tg мышей дикого типа или α -syn tg мышей, которым была проведена односторонняя стереотаксическая инъекция лентивирусного вектора, обеспечивающего экспрессию человеческого α -синуклеина, в гиппокамп, высокоаффинным мышинным антителом IgG1 против α -синуклеина aslo0452 ngl-3 существенно уменьшает ипсилатерально-контралатеральное трансаксональное распространение α -синуклеина, экспрессированного лентивирусом, наблюдаемое в данной модели распространения α -синуклеина у мышей. Свойство ингибирования распространения α -синуклеина *in vivo*, характерное для этого нового раскрытого антитела, указывает на связывание с эпитопом человеческого α -синуклеина, отличным от эпитопа, с которым связываются антитела, не ингибирующие распространение α -синуклеина в анализируемой модели, например антитело 9E4.

Кроме того, данные, демонстрирующие, что D265A-мутантный вариант aslo0452 ngl-3, лишенный эффекторной функции, уменьшает распространение α -синуклеина в данной модели так же эффективно, как aslo0452 ngl-3, указывают на то, что Fc-ассоциированные эффекторные функции не являются ключевым механизмом действия при антитело-опосредованном предупреждении распространения α -синуклеина, и, в частности, на то, что Fc-рецепторы (Fc γ RIIB и Fc γ RIII), присутствующие в микроглии, по-видимому, не являются необходимыми или не играют роли при антитело-опосредованной блокаде распространения α -синуклеина.

В заключение, антитела по изобретению, направленные на α -синуклеин, а также их антигенсвязывающие фрагменты обладают болезнью-модифицирующим потенциалом при PD, DLB или MSA, блокируя или замедляя патологическое проникновение α -синуклеина в клетки-реципиенты и предотвращая распространение и передачу α -синуклеиновой патологии между анатомически связанными областями головного мозга. Таким образом, антитела, направленные на α -синуклеин, могут позволить лечить заболе-

вание или предупреждать его прогрессирование и оказывать полезный терапевтический эффект у пациентов с синуклеинопатиями, такими как PD, DLB или MSA.

Пример 13. Получение биспецифичных антител 0452 ngl-3-BBBt0626gl.

Типичные биспецифичные антитела по изобретению, содержащие остов человеческого IgG1 TM, связанный с одноцепочечным фрагментом (scFv) BBBt0626gl, перенесенным на N-конец (формат BiS2) или C-конец (формат BiS3) тяжелой цепи aslo0452 ngl-3, получали, как описано ниже.

Биспецифичное антитело по изобретению в формате Bis2 получали, синтезируя фрагмент ДНК, кодирующий VH Bbbt0626glscFv-(G4S)x2-aslo0452 ngl-3 или VH Bbbt0626wt-(G4S)x2-aslo0452 ngl-3, содержащий фланкирующие эндонуклеазные сайты рестрикции BssHII и BstEII выше Bbbt0626glscFv или Bbbt0626wt и ниже VH aslo0452 ngl-3 соответственно. Затем проводили прямое клонирование фрагментов расщепленной ДНК в вектор с остовом hIgG1 TM.

Биспецифичное антитело по изобретению в формате Bis3 получали PCR-амплификацией с последующим прямым клонированием с использованием эндонуклеазных сайтов рестрикции (SfiI и XbaI). Получали два PCR-фрагмента, амплифицируя (1) домен CH3 hIgG1 TM от сайта рестрикции SfiI до C-конца домена CH3 и (2) перекрывающийся PCR-фрагмент, используя прямой PCR-олигонуклеотид, включавший C-конец домена CH3 с линкером (G4S)x3 (SEQ ID NO: 57) и N-конец scFv Bbbt0626gl, вместе с олигонуклеотидом, амплифицирующим C-конец scFv Bbbt0626gl и векторную последовательность, расположенную сразу после сайта рестрикции XbaI. Эти два PCR-фрагмента соединяли друг с другом, проводя PCR с концевыми сайтами рестрикции (pull-through PCR), с последующим прямым клонированием в pEU1_4 (вектор с человеческим IgG1 TM) через эндонуклеазные сайты рестрикции SfiI и XbaI.

Эти биспецифичные антитела экспрессировали в системе экспрессии на основе клеток CHO и полученные антитела очищали на колонках с белком А. Все биспецифичные антитела, имеющие происхождение из Bbbt0626, анализировали на предмет связывания с линией эндотелиальных клеток головного мозга мыши (b.end3) *in vitro* для подтверждения связывающей активности группировки-переносчика через BBB и, кроме того, анализировали на предмет конкуренции с aslo0452 ngl-3 за связывание в эпитоп-конкурентном HTRF-анализе для подтверждения связывания с эпитопом aslo0452 ngl-3.

Перечень последовательностей

<110> MEDIMMUNE LIMITED

<120> АНТИТЕЛА К АЛЬФА СИНУКЛЕИНУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

<130> 1848081-0002-091-WO1

<140>

<141>

<150> 62/344,746

<151> 2016-06-02

<160> 61

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 140

<212> ППТ

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val

1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys

20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val

35 40 45

038358

Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
50 55 60

Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
65 70 75 80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
85 90 95

Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
100 105 110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pr
115 120 125

Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
130 135 140

<210> 2
<211> 122
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Gly Ala Val Asn Val Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 115
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala

038358

1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Asn Asn Val Gly Asn
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Phe Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Met Val Trp His Ser Gly Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

Thr Val Leu
115

<210> 4
<211> 122
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (50)..(50)
<223> /replace="Ala"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (53)..(53)
<223> /replace="Gly"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (54)..(54)
<223> /replace="Ser"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (101)..(101)
<223> /replace="Arg"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (102)..(102)
<223> /replace="Arg"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (103)..(103)
<223> /replace="Gly"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (104)..(104)

<223> /replace="Arg"

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (105)..(105)

<223> /replace="Ile"

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(122)

<223> /note= "Вариантные остатки, указанные в последовательности, не являются предпочтительными по сравнению с остатками, указанными в пояснениях к вариантным положениям"

<400> 4

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Gly Gly Ala Asn His Val Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 6

<211> 17

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Ala"

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (4)..(4)
 <223> /replace="Gly"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (5)..(5)
 <223> /replace="Ser"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> /note= "Вариантные остатки, указанные в последовательности,
 не являются предпочтительными по сравнению с остатками,
 указанными в пояснениях к вариантным положениям"

<400> 6
 Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 7
 <211> 13
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (3)..(3)
 <223> /replace="Arg"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (4)..(4)
 <223> /replace="Arg"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (5)..(5)
 <223> /replace="Gly"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (6)..(6)
 <223> /replace="Arg"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (7)..(7)
 <223> /replace="Ile"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(13)
 <223> /note= "Вариантные остатки, указанные в последовательности,
 не являются предпочтительными по сравнению с остатками,
 указанными в пояснениях к вариантным положениям"

<400> 7
 Gly Ala Asn His Val Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 8
 <211> 114
 <212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (27)..(27)
<223> /replace="Ser"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (28)..(28)
<223> /replace="Gly"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (29)..(29)
<223> /replace="Asp"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (30)..(30)
<223> /replace="Phe"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (31)..(31)
<223> /replace="Ser"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (32)..(32)
<223> /replace="Arg"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (42)..(42)
<223> /replace="Pro"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (82)..(82)
<223> /replace="Leu"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (99)..(99)
<223> /replace="Ser"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (100)..(100)
<223> /replace="Ser"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (102)..(102)
<223> /replace="Ala"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (104)..(104)
<223> /replace="Tyr"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(114)
<223> /note= "Вариантные остатки, указанные в последовательности,
не являются предпочтительными по сравнению с остатками,
указанными в пояснениях к вариантным положениям"

038358

<400> 8

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Phe Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met
85 90 95

Val Trp Asp His Gly Val Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
100 105 110

Val Leu

<210> 9

<211> 14

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Ser"

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Gly"

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Asp"

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Phe"

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Ser"

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (10)..(10)

<223> /replace="Arg"

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(14)
 <223> /note= "Вариантные остатки, указанные в последовательности,
 не являются предпочтительными по сравнению с остатками,
 указанными в пояснениях к вариантным положениям"

<400> 9
 Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys Tyr Arg Ile Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 11
 <212> ППТ
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser
 1 5 10

<210> 11
 <211> 9
 <212> ППТ
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (4)..(4)
 <223> /replace="Ser"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (5)..(5)
 <223> /replace="Ser"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (7)..(7)
 <223> /replace="Ala"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (9)..(9)
 <223> /replace="Tyr"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(9)
 <223> /note= "Вариантные остатки, указанные в последовательности,
 не являются предпочтительными по сравнению с остатками,
 указанными в пояснениях к вариантным положениям"

<400> 11
 Met Val Trp Asp His Gly Val Trp Val
 1 5

<210> 12
 <211> 452
 <212> ППТ
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

038358

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

038358

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 13
 <211> 366
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(366)

<400> 13
 gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

tca tcc att tcc cac ctt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg 192
 Ser Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

038358

65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg gga ggg gca aac cac ggg aag tac tac tac gga atg gac aag tgg 336
Ala Gly Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp
 100 105 110

ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 366
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14
<211> 122
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Gly Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
<211> 17
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 16
<211> 13
<212> IIPT

038358

<213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys
1 5 10

<210> 17

<211> 221

<212> PPT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95
Met Val Trp Asp His Gly Val Trp Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
115 120 125

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
130 135 140

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
145 150 155 160

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
165 170 175

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
180 185 190

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
195 200 205

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215 220

<210> 18

038358

<211> 345
<212> JHK
<213> Homo sapiens

<400> 18
caggctgtgc tgactcagcc ggttcctc tctcgtctc ctggagcacc agccagtctc 60

acctgcacct tgcgcagfgg ggcgccccctg cogaagata ggalatactg gtaacagcag 120

aagccaggga gtctcccca gtaatcctg aggtacaaat cagacgcaga taaacaccag 180

ggctctggag tccccagccg ctttctgga tccaagalg ctccgcca tgcagggatt 240

ttactcatct ctggctcca gtctgaggat gaggctgact atattgat ggttgggac 300

cacggcgtct gglatttgg cggagggacc aagctgacc tcta 345

<210> 19
<211> 115
<212> IPT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45
Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Met Val Trp Asp His Gly Val Trp Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

Thr Val Leu
115

<210> 20
<211> 14
<212> IPT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys Tyr Arg Ile Tyr
1 5 10

<210> 21
<211> 9
<212> IPT
<213> Homo sapiens

038358

<400> 21

Met Val Trp Asp His Gly Val Trp Tyr

1 5

<210> 22

<211> 452

<212> IIPT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Gly Ala Arg Arg Gly Arg Ile Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu

225 230 235 240

038358

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 23

<211> 366

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 23

gagggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagact 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggagg ggctggagtg ggtctcagct attagtgta gtggtgtag cacatactac 180

038358

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcagagaca attccaagaa cacgctgat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtc gggaggggca 300
cggcgccggc gcatctacta cggaalggac aaatggggcc aagggacaac ggtaaccgtc 360
tctcea 366

<210> 24
<211> 122
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Gly Ala Arg Arg Gly Arg Ile Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25
<211> 5
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 26
<211> 17
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

038358

<210> 27
<211> 13
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Gly Ala Arg Arg Gly Arg Ile Tyr Tyr Gly Met Asp Lys
1 5 10

<210> 28
<211> 221
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Ser Gly Asp Phe Ser Arg
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45
Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Met Val Trp Ser Ser Gly Ala Trp Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
115 120 125

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
130 135 140

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
145 150 155 160

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
165 170 175

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
180 185 190

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
195 200 205

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

038358

210 215 220

<210> 29

<211> 345

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 29

caggctgtgc tgactcagcc ggcttccctc tctcgtctc ctggagcacc agccagctc 60

acctgcacct tgcgcagttc cggggacttc tcccgtata ggatalactg gtaacagcag 120

aagccaggga gtcctcccca gtaactcctg aggtacaaa cagacgcaga taaacaccag 180

ggctctggag tcccagccg cttttcggg tccaaagatg ctccggccaa tgcagggatt 240

ttactcatct ctgggctoca gctcaggat gaggctgact attattgat ggttggtcc 300

agcggcgctt ggtactcgg cggagggacc aagctgaccg tccta 345

<210> 30

<211> 115

<212> ППТ

<213> Homo sapiens

<400> 30

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Ser Gly Asp Phe Ser Arg

20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr

35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile

65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

85 90 95

Met Val Trp Ser Ser Gly Ala Trp Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100 105 110

Thr Val Leu

115

<210> 31

<211> 14

<212> ППТ

<213> Homo sapiens

<400> 31

Thr Leu Arg Ser Ser Gly Asp Phe Ser Arg Tyr Arg Ile Tyr

1 5 10

<210> 32
 <211> 11
 <212> ППТ
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser
 1 5 10

<210> 33
 <211> 9
 <212> ППТ
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Met Val Trp Ser Ser Gly Ala Trp Tyr
 1 5

<210> 34
 <211> 123
 <212> ППТ
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (1)..(1)
 <223> /replace="Val"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (11)..(11)
 <223> /replace="Leu"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (75)..(75)
 <223> /replace="Arg"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(123)
 <223> /note= "Вариантные остатки, указанные в последовательности,
 не являются предпочтительными по сравнению с остатками,
 указанными в пояснениях к вариантным положениям"

<400> 34
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

038358

85 90 95

Ala Arg Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (15)..(15)
 <223> /replace="Gly" or "Ala"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (28)..(28)
 <223> /replace="Arg"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (29)..(29)
 <223> /replace="Arg" or "Thr"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (32)..(32)
 <223> /replace="Thr"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (33)..(33)
 <223> /replace="Ser"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (37)..(37)
 <223> /replace="Gln"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (44)..(44)
 <223> /replace="Ile"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (47)..(47)
 <223> /replace="Ile"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (50)..(50)
 <223> /replace="Glu"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (51)..(51)
 <223> /replace="Asp"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (57)..(57)

<223> /replace="Ile"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (65)..(65)
 <223> /replace="Arg"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (68)..(68)
 <223> /replace="Thr"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (92)..(92)
 <223> /replace="Asn"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (93)..(93)
 <223> /replace="Thr"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (95)..(95)
 <223> /replace="Lys" or "His"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (96)..(96)
 <223> /replace="Pro"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (97)..(97)
 <223> /replace="Trp"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(108)
 <223> /note= "Вариантные остатки, указанные в последовательности,
 не являются предпочтительными по сравнению с остатками,
 указанными в пояснениях к вариантным положениям"

<400> 35
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Arg Gln
 1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Thr Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30

Asn Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
 35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
 85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 36
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (6)..(6)
 <223> /replace="Arg"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (7)..(7)
 <223> /replace="Arg" or "Thr"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (10)..(10)
 <223> /replace="Thr"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (11)..(11)
 <223> /replace="Ser"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(11)
 <223> /note= "Вариантные остатки, указанные в последовательности,
 не являются предпочтительными по сравнению с остатками,
 указанными в пояснениях к вариантным положениям"
 <400> 36
 Gln Gly Asp Ser Leu Thr Ser Tyr Tyr Ala Asn
 1 5 10

<210> 37
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (2)..(2)
 <223> /replace="Glu"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (3)..(3)
 <223> /replace="Asp"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(7)
 <223> /note= "Вариантные остатки, указанные в последовательности,
 не являются предпочтительными по сравнению с остатками,
 указанными в пояснениях к вариантным положениям"
 <400> 37
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 38

<211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (5)..(5)
 <223> /replace="Asn"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (6)..(6)
 <223> /replace="Thr"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace="Lys" or "His"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (9)..(9)
 <223> /replace="Pro"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (10)..(10)
 <223> /replace="Trp"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(11)
 <223> /note= "Вариантные остатки, указанные в последовательности,
 не являются предпочтительными по сравнению с остатками,
 указанными в пояснениях к вариантным положениям"

<400> 38
 Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val
 1 5 10

<210> 39
 <211> 123
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

038358

Ala Arg Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 5
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 40
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 41
<211> 17
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 42
<211> 14
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 42
Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 43
<211> 108
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 43
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

038358

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 44
<211> 11
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 45
<211> 7
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 46
<211> 11
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val
1 5 10

<210> 47
<211> 123
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<223> /note="Bbbt0626 VH"

<400> 47
Gly Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Arg Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

038358

Ala Arg Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48
<211> 122
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Tyr
20 25 30

Ser Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Val Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49
<211> 5
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Thr Tyr Ser Ile Thr
1 5

<210> 50
<211> 17
<212> IIPT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe Gln
1 5 10 15

Gly

038358

<210> 51
<211> 13
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 52
<211> 122
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Tyr
20 25 30

Ser Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Val Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 5
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Thr Tyr Ser Ile Thr
1 5

<210> 54
<211> 17
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 55
 <211> 13
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 56
 <211> 50
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> source
 <223> /note= "Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(50)
 <223> /note= "Данная последовательность может содержать 1-10 повторяющихся единиц 'Gly Gly Gly Gly Ser'"

<220>
 <221> source
 <223> /note= "Замены и предпочтительные воплощения подробно описаны в описании поданной заявки"

<400> 56
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Ser
 50

<210> 57
 <211> 15
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> source
 <223> /note= "Описание искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 57
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 58
 <211> 98

038358

<212> IIPT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys

<210> 59

<211> 11

<212> IIPT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 60

<211> 102

<212> IIPT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ile Asn Val Gly Thr
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Met Ile Trp His Trp Val

100

<210> 61

<211> 10

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<400> 61

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

1 5 10

| Идентификатор клона | Метод | Аффинность – K_D | 95%-й ДИ |
|---------------------|--------|--------------------|------------|
| asyn0087 | Octet | >1,0 мкМ | n/a |
| aslo0452 ngl-1 | Octet | 1,1 нМ | 0,3-2,3 нМ |
| aslo0452 ngl-1 | KinExa | 74 нМ | 15-177 нМ |
| aslo0452 ngl-1 | Octet | 106 нМ | 10-292 нМ |
| aslo0543 | KinExa | 108 нМ | 34-223 нМ |
| aslo0543 | Octet | 113 нМ | 5-333 нМ |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с человеческим α -синуклеином, содержащие:

а) три CDR тяжелой цепи, имеющие последовательности

(i) H-CDR1 SEQ ID NO: 5,

(ii) H-CDR2 SEQ ID NO: 15 и

(iii) H-CDR3 SEQ ID NO: 16, и

б) три CDR легкой цепи, имеющие последовательности

(i) L-CDR1 SEQ ID NO: 20,

(ii) L-CDR2 SEQ ID NO: 10 и

(iii) L-CDR3 SEQ ID NO: 21

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, связывающиеся с человеческим α -синуклеином с K_D менее 500 пМ.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, уменьшающие распространение α -синуклеина *in vivo*.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, связывающиеся с человеческим α -синуклеином, но не с человеческим β -синуклеином или человеческим γ -синуклеином.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, связывающиеся с человеческим α -синуклеином, крысиным α -синуклеином и α -синуклеином яванского макака.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, связывающиеся с нативным эндогенным человеческим α -синуклеином.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, связывающиеся с агрегатами человеческого α -синуклеина.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, связывающиеся с патологическими формами α -синуклеина.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, снижающие уровни α -синуклеина, в частности свободного несвязанного α -синуклеина, в интерстициальной жидкости головного мозга и/или в спинномозговой жидкости.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, содержащие вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, содержащие вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, содержащие вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, содержащие вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, содержащие вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на

95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, содержащие переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15, представляющие собой моноклональное антитело.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, содержащие тройную мутацию L234F/L235E/P331S в Fc-области.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, содержащие тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, содержащие тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 или 18 и 19, содержащие легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 или 18 и 19, содержащие легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

22. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-21 в качестве лекарственного средства.

23. Применение по п.22, где лекарственное средство предназначено для предупреждения или лечения α -синуклеинопатии.

24. Применение по п.23, где α -синуклеинопатия выбрана из болезни Паркинсона (PD), деменции с тельцами Леви (DLB) и мультисистемной атрофии (MSA).

25. Применение по п.24, где α -синуклеинопатия представляет собой болезнь Паркинсона (PD).

26. Применение по п.24, где α -синуклеинопатия представляет собой мультисистемную атрофию (MSA).

27. Способ лечения или предупреждения заболевания центральной нервной системы (CNS) у пациента, включающий введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-21.

28. Способ по п.27, где заболевание представляет собой α -синуклеинопатию.

29. Способ по п.28, где α -синуклеинопатия выбрана из болезни Паркинсона (PD), деменции с тельцами Леви (DLB) и мультисистемной атрофии (MSA).

30. Способ по п.29, где α -синуклеинопатия представляет собой болезнь Паркинсона (PD).

31. Способ по п.29, где α -синуклеинопатия представляет собой мультисистемную атрофию (MSA).

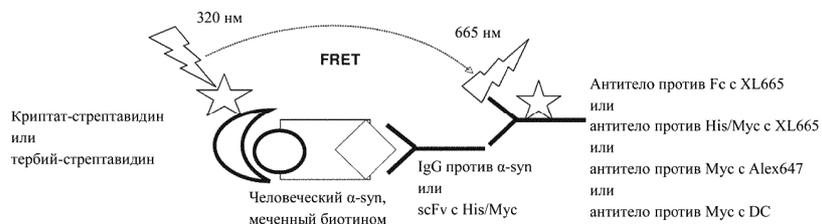
32. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-21 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

33. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-21.

34. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.33, содержащая нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13.

35. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.33, содержащая нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 18.

36. Клетка-хозяин, содержащая вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.33-35.



Фиг. 1

Выравнивание VH

```

                                CDR1                                CDR2
asyn0087  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSATSGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAG
aslo0452  ng1-3  .....S.HL.....
aslo0543  .....
    
```

Выравнивание VL

```

                                CDR1                                CDR2
asyn0087  GAVNIVYIYGMQVWVGGQGTMTVSS
aslo0452  ng1-3  ..NHGK.....K.....T.....
aslo0543  ..RRGRI.....K.....T.....
    
```

Выравнивание VL

```

                                CDR1                                CDR2
asyn0087  QAVLTQFSSLSASPGASASLTCILRSNNVGNVRIYIYQKSGSPFYLLRYSKSDADKHQSGVPSRFSGSKDASANAGILFISGLQSEDEADYYC
aslo0452  ng1-3  .....A.....APLPK.....P.....L.....
aslo0543  .....A.....SGDFSR.....P.....L.....
    
```

Выравнивание VL

```

                                CDR3
asyn0087  MVVHSGAWVFGGKLTVL
aslo0452  ng1-3  ...DH.V.Y.....
aslo0543  ...S...Y.....
    
```

Фиг. 2

```

GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG
E V Q L M E S G G Q Q L V Q P F G Q S L

AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT GCC ATG AGC TGG
R L S C A A S G F T F S S Y A M S W
                                VHCDR1

GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA TCC ATT TCC CAC CTT
V R Q A P G K G L E W V S S I S H L
                                VHCDR2

GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA
G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R

GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC
D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D

ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG GGA GGG GCA AAC CAC GGG AAG TAC TAC TAC GGA
T A V Y Y C A G G A N H G K Y Y Y G
                                VHCDR3

ATG GAC AAG TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
M D K W G Q G T T V T V S S |
    
```

Фиг. 3А

```

CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG GCT TCC CTC TCT GCG TCT CCT GGA GCA TCA GCC
Q A V L T Q P A S L S A S P G A S A

AGT CTC ACC TGC ACC TTG CGC AGT GGG GCG CCC CTG CCG AAG TAT AGG ATA TAC
S L T C T L R S G A P L P K Y R I Y
                                VLCDR1

TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGG AGT CCT CCC CAG TAT CTC CTG AGG TAC AAA TCA
W Y Q Q K P G S P P Q Y L L R Y K S
                                VLCDR2

GAC GCA GAT AAA CAC CAG GGC TCT GGA GTC CCC AGC CGC TTT TCT GGA TCC AAA
D A D K H Q G S G V P S R F S G S K

GAT GCT TCG GCC AAT GCA GGG ATT TTA CTC ATC TCT GGG CTC CAG TCT GAG GAT
D A S A N A G I L L I S G L Q S E D

GAG GCT GAC TAT TAT TGT ATG GTT TGG GAC CAC GGC GTC TGG TAT TTC GGC GGA
E A D Y Y C M V W D H G V W Y F G G
                                VLCDR3

GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA
G T K L T V L
    
```

Фиг. 3В

```

aslo0452 ng1-3  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
IGHV3-23*01  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
Vernier (*)  *.....*
                                VHCDR1

aslo0452 ng1-3  SISHLGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAG
IGHV3-23*01  AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
Vernier (*)  *.....*
                                VHCDR2

aslo0452 ng1-3  GANHGKYYYGMQVWVGGQGTIVTVSS
IGHJH6  WGQGTIVTVSS
Vernier (*)  *
                                VHCDR3
    
```

Фиг. 3С

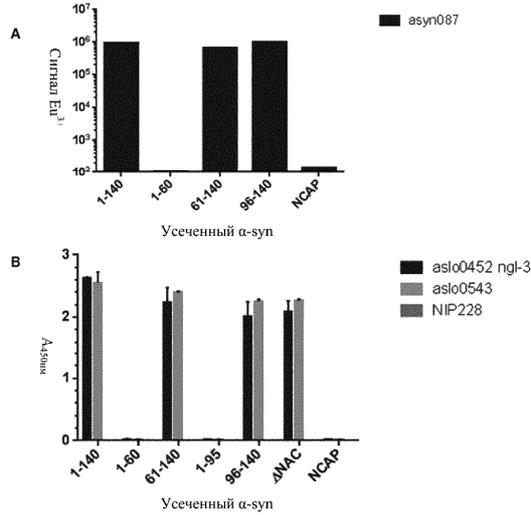
```

aslo0452 ngl-3  QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRSGAPLPKYRIYWYQQKFGSPQYLLR
IGLV5-45*01    QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRSGINVTYRIYWYQQKFGSPQYLLR
Vernier (*)    * * * * *
                                VLCDR1

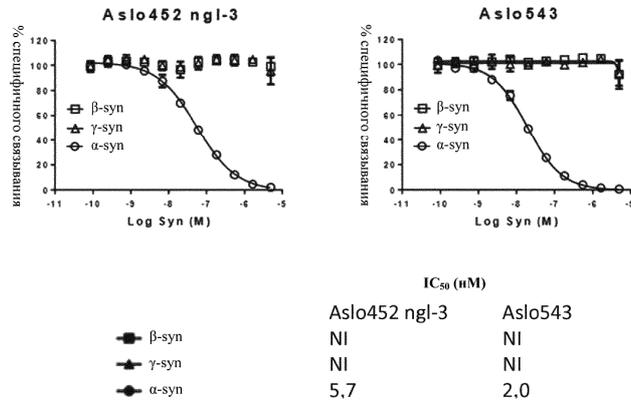
aslo0452 ngl-3  YKSDADKHQGSQVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYCMVWDHGVMY
IGLV5-45*01    YKSDSDKQQGSQVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYCMVWH...WV
Vernier (*)    * * * * *
                                VLCDR2                                VLCDR3

aslo0452 ngl-3  FGGGTKLTV---L
IGJL2, 3       FGGGTKLTV---L
Vernier (*)    *
    
```

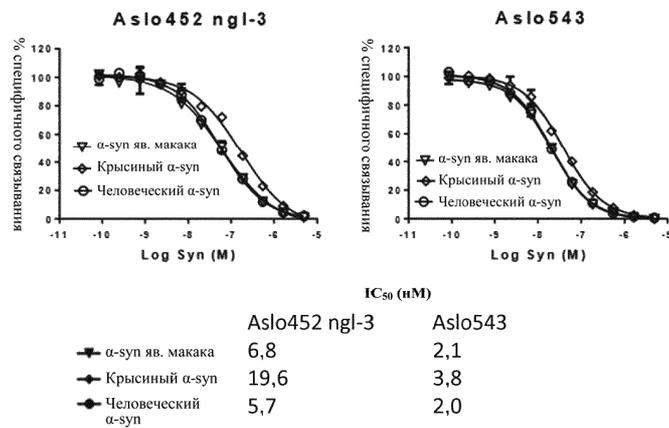
Фиг. 3D



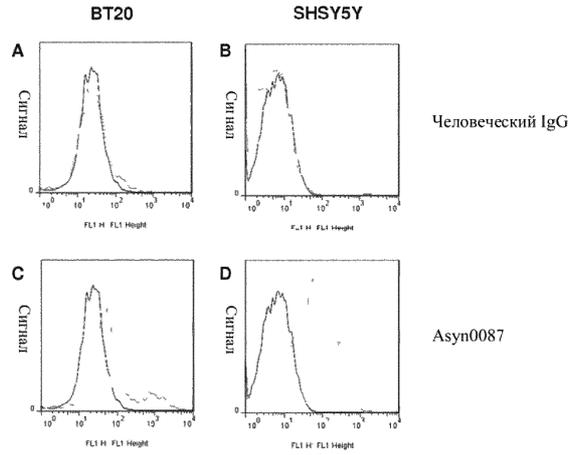
Фиг. 4



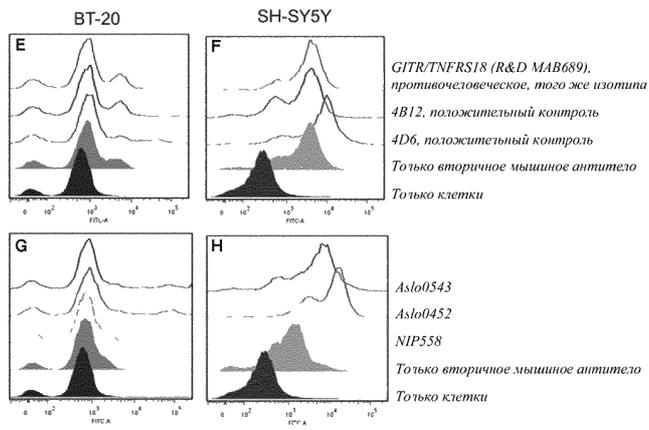
Фиг. 5



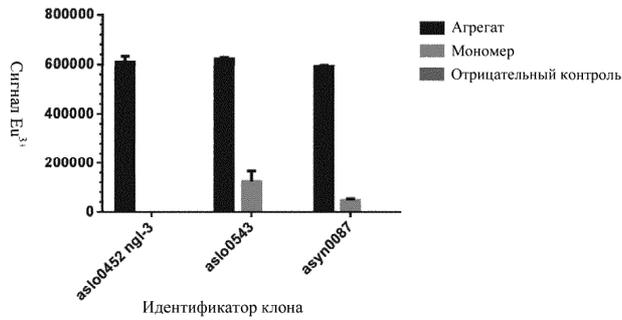
Фиг. 6



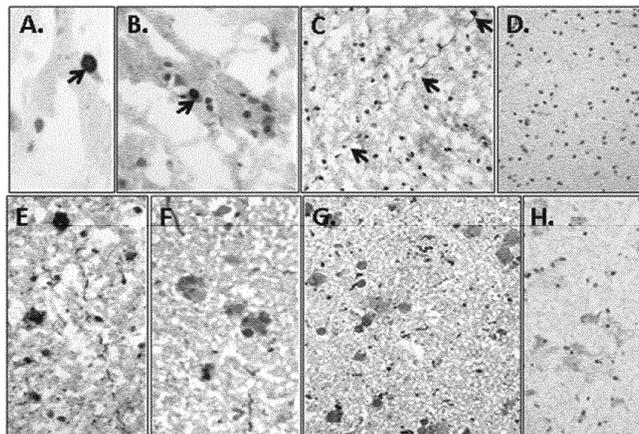
Фиг. 7А



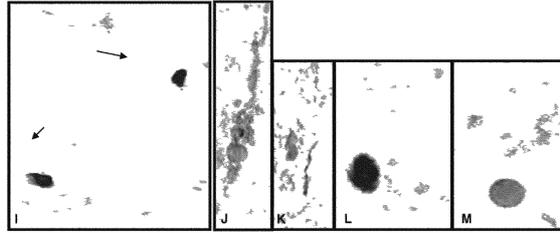
Фиг. 7В



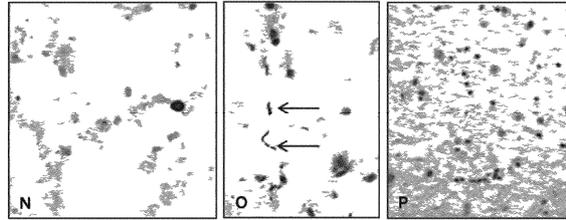
Фиг. 8



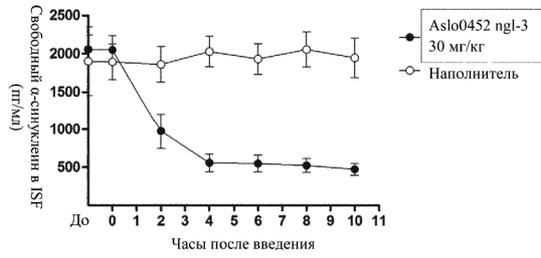
Фиг. 9А



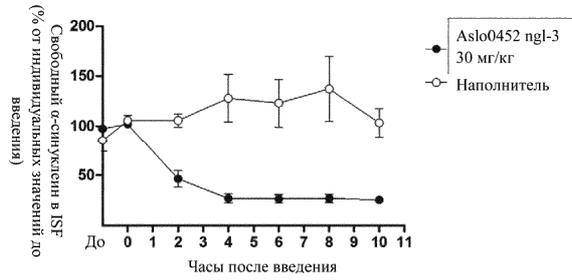
Фиг. 9В



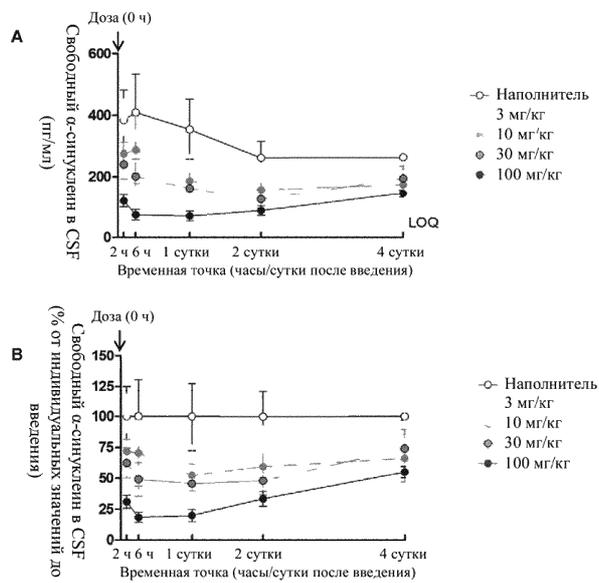
Фиг. 9С



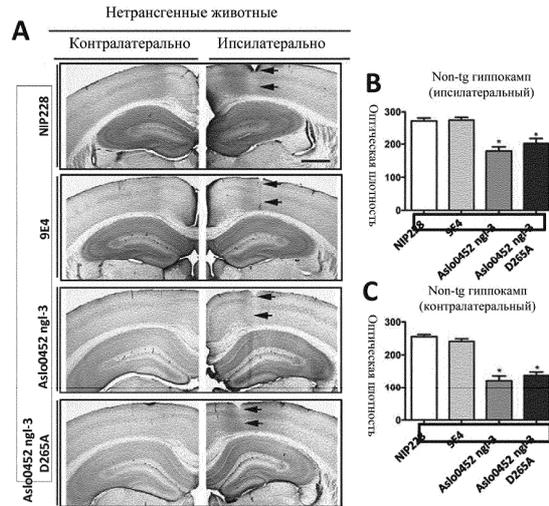
Фиг. 10А



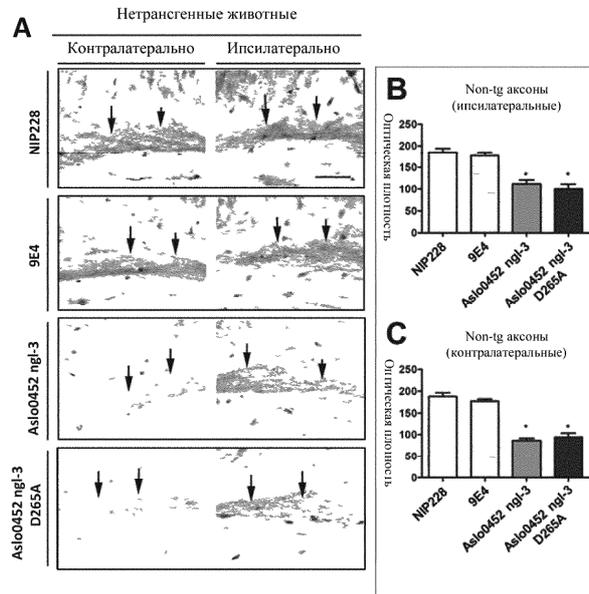
Фиг. 10В



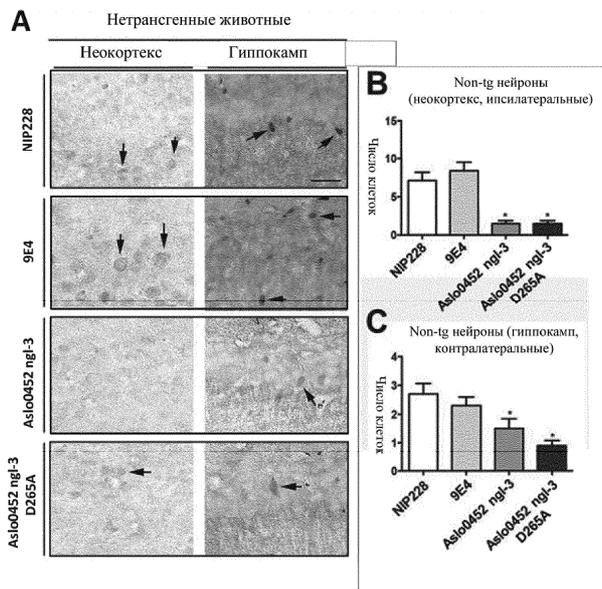
Фиг. 11



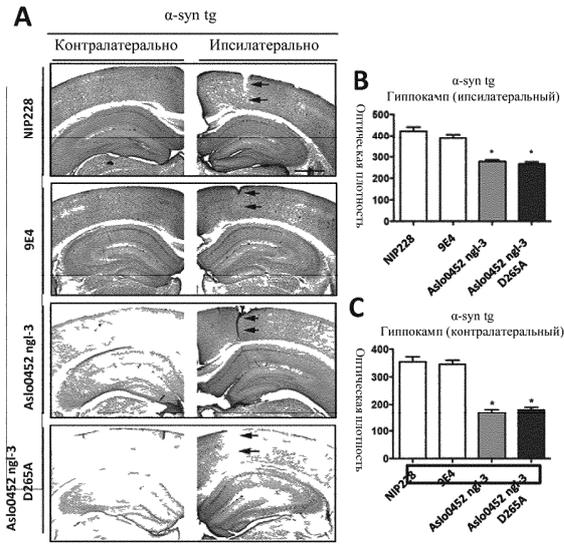
Фиг. 12



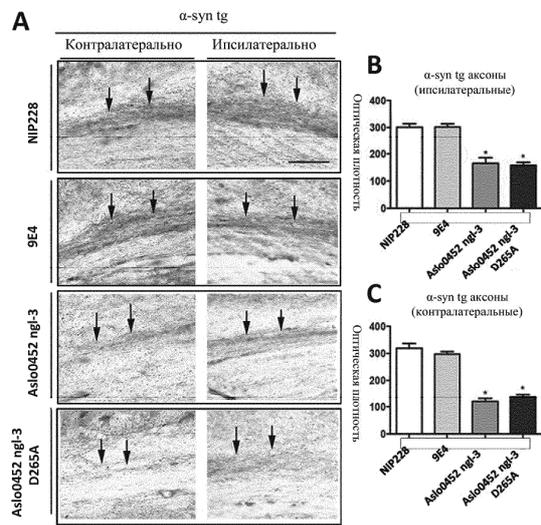
Фиг. 13



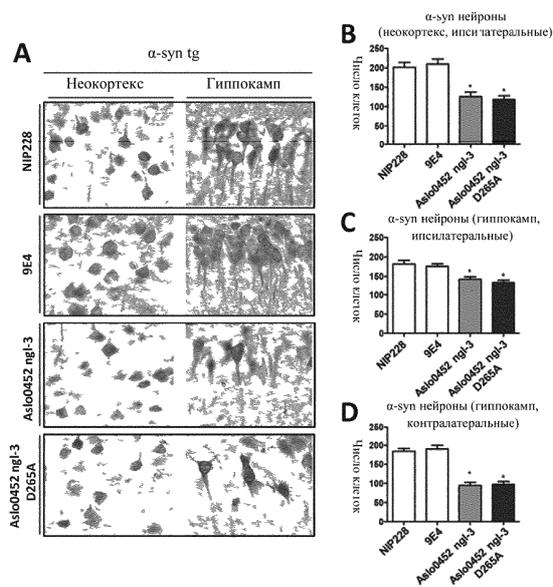
Фиг. 14



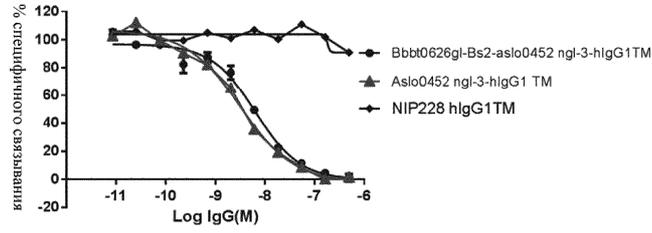
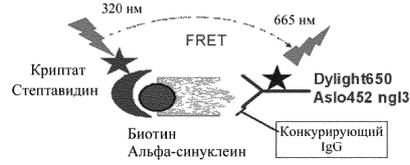
Фиг. 15



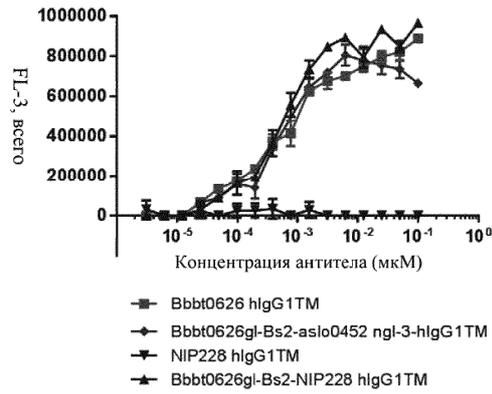
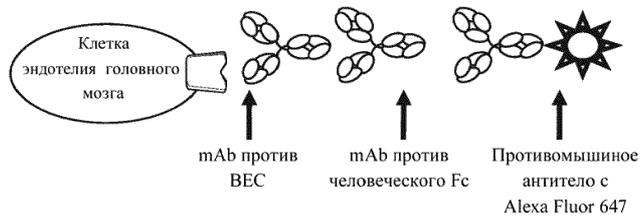
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

