

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039807**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.16

(21) Номер заявки
201991464

(22) Дата подачи заявки
2018.01.05

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛО К α -СИНУКЛЕИНУ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/443,151; 10-2018-0001641**

(32) **2017.01.06; 2018.01.05**

(33) **US; KR**

(43) **2020.01.31**

(86) **PCT/KR2018/000239**

(87) **WO 2018/128454 2018.07.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭйБиЭл БИО ИНК. (KR)

(72) Изобретатель:
**Ан Чжинхён, Ан Сонвон, Ким Донин,
Сон Ынсилъ, Ом Джехён, Ли Сан
Хун, Ли Сын-Джэ, Ким Тэ Кён, Чой
Мин Сон, Ю Вонкю, Чон Джехо, Ким
Джухи, Чон Джинвон, Ким Ёнчжу,
Сон Ёнгю, Сон Бёндже (KR)**

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

(56) **US-A1-20140363447
US-A1-20160108113
KR-A-1020110110200
KR-A-1020160010402
KR-A-1020140095074
GenBank: AML30890.1: Immunoglobulin
Heavy Chain Variable Region, Partial [Mus musculus]
(10 March 2016.) See the entire document.**

(57) В настоящем изобретении раскрыты антитела к α -синуклеину, предпочтительно распознающие агрегаты α -синуклеина. Антитела по данному изобретению связываются с агрегатами α -синуклеина с высокой аффинностью и специфичностью и ингибируют накопление или внутриклеточный транспорт агрегатов α -синуклеина и, таким образом, могут использоваться для определения, диагностики, и/или лечения, или предупреждения различных заболеваний, вызванных накоплением агрегатов α -синуклеина.

B1**039807****039807****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителу к α -синуклеину и его применению.

Предшествующий уровень техники

Альфа-синуклеин (α -синуклеин) представляет собой белок, содержащий 140 аминокислот, который экспрессируется преимущественно в пресинаптических окончаниях нейронов. В норме в естественных условиях он представляет собой несвернутый мономер. Известно, что α -синуклеин поддерживает транспорт синаптических везикул к пресинаптическим окончаниям и регулирует высвобождение дофамина, нейротрансммиттера, контролирующего произвольные или непроизвольные движения.

Однако в патологических условиях α -синуклеин претерпевает структурные изменения в результате связывания и взаимодействия с вкраплениями, фосфолипидными бислоями или липидными мембранами и т.д. для образования агрегатов, включая, например, димеры, олигомеры и/или фиброзные молекулы, путем образования свернутой или свернутой α -спиральной вторичной структуры альфа-синуклеина. Известно, что данные агрегаты оказывают токсическое действие на клетки и являются основным компонентом патологических белковых агрегатов телец Леви, которые обнаруживают в нейронах при болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви и различных других заболеваниях. Кроме того, известно, что пост-трансляционные модификации, такие как фосфорилирование или убиквитинирование альфа-синуклеина, также задействованы в агрегации и нейротоксичности α -синуклеина.

Агрегацию α -синуклеина связывают с возникновением болезни Паркинсона (БП), болезни Паркинсона с деменцией (БПД), деменции с тельцами Леви (ДТЛ), множественной системной атрофии (МСА) и различных нейродегенеративных заболеваний, обозначаемых α -синуклеинопатиями, включая множество нейроаксональных заболеваний (Kim et al. *Alzheimer's Research & Therapy* 2014, 6:73).

Кроме того, в образцах цереброспинальной жидкости и плазмы пациентов с болезнью Паркинсона были обнаружены как олигомерные, так и мономерные формы альфа-синуклеина, что указывает на то, что низкомолекулярные агрегаты альфа-синуклеина могут проникать через клеточную мембрану и достигать внеклеточного пространства. Также было показано, что свернутый альфа-синуклеин может высвобождаться из клеток благодаря экзоцитозу и затем транспортироваться из одного участка головного мозга в другой участком посредством внутриклеточного транспорта, подобно белкам-прионам (Brundin P. et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, 11: 301-307).

Таким образом, альфа-синуклеин является мишенью для разработки терапевтических агентов для α -синуклеинопатий, таких как болезнь Паркинсона. Основные стратегии разработок включают ингибирование образования агрегатов, сайленсинг генов и удаление агрегатов. Предшествующий уровень техники включает эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG) (Bieschke J. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 107: 7710-7715), 3-(1,3-бензодиоксол-бромофенил)-1Н-пиразол (anle138b) (Wagner J. et al. *Acta Neuropathol* 2013, 12 795-813), CLR0120 (Prabhudesai S. et al. *Neurotherapeutics* 2012, 9: 464-476) и ингибитор пролилолигопептидазы KYP-20479 (Myohanen TT et al. *Brit J Pharmacol* 2012, 166: 1097-1113). Антитела, которые связываются с альфа-синуклеином, описаны в патентах US 8609820, US 8940276 и т.п.

Низкомолекулярные соединения следует вводить в высокой дозе из-за низкой способности специфично связываться с мишенью и короткого периода полувыведения. В отличие от низкомолекулярных соединений антитело является специфичным к мишени и имеет длительный период полувыведения. Однако для увеличения терапевтического потенциала в отношении заболевания необходимы антитела, которые предпочтительно связываются с агрегатами с высокой аффинностью.

Таким образом, для лечения заболеваний, ассоциированных с аномальным накоплением агрегатов α -синуклеина, необходимо разработать антитела, способные предпочтительно связываться с альфа-синуклеином, в частности с агрегатами альфа-синуклеина.

Описание изобретения

Техническая задача

Задачей данного изобретения является разработка антител, специфически распознающих α -синуклеин, в частности агрегат α -синуклеина, с высокой аффинностью связывания.

Техническое решение

В одном аспекте данного изобретения предложено выделенное антитело, специфически связывающееся с агрегатом α -синуклеина, или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению содержат (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую гипервариабельные участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3 и/или (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую гипервариабельные участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и CDRH1 представляет собой любую, выбранный из SEQ ID NO: 1 - 14; и CDRH2 представляет собой любую, выбранный из SEQ ID NO: 15-28; и CDRH3 представляет собой любую, выбранный из SEQ ID NO: 29-42; и CDRL1 представляет собой любую, выбранный из SEQ ID NO: 43-56; и CDRL2 представляет собой любую, выбранный из SEQ ID NO: 57-70; и CDRL3 представляет собой любую, выбранный из SEQ ID NO: 71-84.

В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению содержит (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую гипервариабельные участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3 и/или (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую гипервариабельные участки

CDRL1, CDRL2 и CDRL3:

(aa) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 1, 15 и 29 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 43, 57 и 71 соответственно;

(ab) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 2, 16 и 30 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 44, 58 и 72 соответственно;

(ac) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 3, 17 и 31 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 45, 59 и 73 соответственно;

(ad) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 4, 18 и 32 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 46, 60 и 74 соответственно;

(ae) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 5, 19 и 33 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 47, 61 и 75 соответственно;

(af) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 6, 20 и 34 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 48, 62 и 76 соответственно;

(ag) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 7, 21 и 35 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 49, 63 и 77 соответственно;

(ah) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 8, 22 и 36 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 50, 64 и 78 соответственно;

(ai) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 9, 23 и 37 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 51, 65 и 79 соответственно;

(aj) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 10, 24 и 38 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 52, 66 и 80 соответственно;

(ak) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 11, 25 и 39 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 53, 67 и 81 соответственно;

(al) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 12, 26 и 40 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 54, 68 и 82 соответственно;

(am) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 13, 27 и 41 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 55, 69 и 83 соответственно; или

(an) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 14, 28 и 42 соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 56, 70 и 84.

В одном воплощении переменная область тяжелой цепи выделенного антитела, специфически связывающегося с агрегатом α -синуклеина, или его антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 85-98, по меньшей мере на 90% или более идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 85-98, или по меньшей мере на 95% или более идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 85-98.

В одном воплощении переменная область легкой цепи выделенного антитела, специфически связывающегося с агрегатом α -синуклеина, или его антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 99-112, по меньшей мере на 90% или более идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 99-112, по меньшей мере на 95% или более идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 99-112.

В воплощении выделенное антитело, специфически связывающегося с агрегатом α -синуклеина, или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению включает любую из переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи, указанных ниже. Последовательности переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи могут включать в себя

SEQ ID NO:

85 и 99; SEQ ID NO: 86 и 100; SEQ ID NO: 87 и 101; SEQ ID NO: 88 и 102; SEQ ID NO: 89 и 103; SEQ ID NO:

90 и 104; SEQ ID NO: 91 и 105; SEQ ID NO: 92 и 106; SEQ ID NO: 93 и 107; SEQ ID NO: 94 и 108; SEQ ID

NO: 95 и 109; SEQ ID NO: 96 и 110; SEQ ID NO: 97 и 111; или SEQ ID NO: 98 и 112.

Некоторые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой моноклональное антитело или фрагмент scFV, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с агрегатом α -синуклеина.

Антитело по данному изобретению может представлять собой человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело.

Моноклональное антитело по данному изобретению может быть антителом IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 типа.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой моноклональное антитело, Fab-фрагмент, Fab' фрагмент, F(ab') фрагмент, диатело или scFV.

В одном воплощении выделенное антитело, специфически связывающееся с агрегатом α -синуклеина, или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению включают любую из тяже-

лых цепей и легких цепей, указанных ниже. Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи представляют собой

SEQ ID NO: 113 и SEQ ID NO: 141; SEQ ID NO: 114 и SEQ ID NO: 142; SEQ ID NO: 115 и SEQ ID NO: 143; SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 144; SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 145; SEQ ID NO: 118 и SEQ ID NO: 146; SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 147; SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 148; SEQ ID NO: 121 и SEQ ID NO: 149; SEQ ID NO: 122 и SEQ ID NO: 150; SEQ ID NO: 123 и SEQ ID NO: 151; SEQ ID NO: 124 и SEQ ID NO: 152; SEQ ID NO: 125 и SEQ ID NO: 153 или SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 154.

константную область IgG2a мыши.

В воплощении выделенное антитело, специфически связывающееся с агрегатом α -синуклеина, или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению включают любую из тяжелых цепей и легких цепей, указанных ниже. Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи представляют собой

SEQ ID NO:

127 и SEQ ID NO: 155; SEQ ID NO: 128 и SEQ ID NO: 156; SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 157; SEQ ID NO: 130 и SEQ ID NO: 158; SEQ ID NO: 131 и SEQ ID NO: 159; SEQ ID NO: 132 и SEQ ID NO: 160; SEQ ID NO: 133 и SEQ ID NO: 161; SEQ ID NO: 134 и SEQ ID NO: 162; SEQ ID NO: 135 и SEQ ID NO: 163; SEQ ID NO: 136 и SEQ ID NO: 164; SEQ ID NO: 137 и SEQ ID NO: 165; SEQ ID NO: 138 и SEQ ID NO: 166; SEQ ID NO: 139 и SEQ ID NO: 167 или SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 168.

Антитело включает константную область IgG1 человека.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению можно использовать для ингибирования внутриклеточного транспорта агрегата α -синуклеина; деградации агрегата α -синуклеина или ингибирования образования агрегата α -синуклеина.

В другом аспекте данного изобретения также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению. Примеры таких полинуклеотидов включают последовательности, представленные SEQ ID NO: 169-224.

В другом аспекте данного изобретения также предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по данному изобретению.

В другом аспекте данного изобретения также предложена прокариотическая или эукариотическая клетка или линия клеток, трансформированных вектором экспрессии по данному изобретению.

В другом воплощении данного изобретения дополнительно предложен способ получения выделенного антитела, специфически связывающегося с α -синуклеином, или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки по данному изобретению в условиях достаточной экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клеточной линии.

В другом воплощении данного изобретения также предложен набор или композиция, включающие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению, где композиция может быть представлена в виде фармацевтической или диагностической композиции. Фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент, а диагностическая композиция может дополнительно содержать реагенты, требующиеся для диагностики или определения.

Фармацевтическая композиция или набор по данному изобретению могут применяться для лечения α -синуклеинопатии. Например, α -синуклеинопатия может быть выбрана из группы, состоящей из болезни Паркинсона (БП), болезни Паркинсона с деменцией (БПД), деменции с тельцами Леви (ДТЛ), варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (ВТЛ), сочетания болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона или множественной системной атрофией (МСА).

В другом воплощении данного изобретения предложен способ определения агрегата α -синуклеина в биологическом образце, включающий предоставление антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению, приведение в контакт антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с биологическим образцом для определения агрегата α -синуклеина. Биологические образцы включают различные образцы, в которых необходимо определить агрегат α -синуклеина, включая, например, цереброспинальную жидкость, кровь, включая плазму, или мочу, а также клетки, ткани или органы. Способ может осуществляться *in vitro* или *in vivo*. Визуализация *in vivo* может осуществляться, например, с применением позитронно-эмиссионной томографии (PET), однофотонной эмиссионной томографии (SPECT), оптической визуализации в ближнем инфракрасном диапазоне (NIR) или магниторезонансной визуализации (MRI).

В другом воплощении данного изобретения предложен способ лечения α -синуклеинопатии у субъекта или регулирование концентрации агрегатов α -синуклеина у субъекта, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению или содержащей их композиции субъекту, который нуждается в лечении α -синуклеинопатии и/или регулировании концентрации агрегата

α -синуклеина.

В другом воплощении данного изобретения предложен способ диагностирования альфа-синуклеинопатии у субъекта, нуждающегося в диагностике альфа-синуклеинопатии, где способ включает измерение/определение концентрации или внутриклеточной локализации агрегата α -синуклеина у субъекта с использованием любого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению и сравнение концентрации или внутриклеточной локализации агрегата α -синуклеина, измеренных у субъекта, с контрольным образцом, где сходство или различие при сравнении с результатом контрольного образца указывает на субъекта с α -синуклеинопатией. В способе контрольная группа может представлять собой нормальный образец или образец пациента с α -синуклеинопатией.

В другом воплощении данного изобретения предложено применение антитела и его антигенсвязывающего фрагмента или содержащей их композиции в лечении α -синуклеинопатии у субъекта, страдающего α -синуклеинопатией, где антитело и его антигенсвязывающий фрагмент или содержащая их композиция ингибирует внутриклеточный транспорт агрегата α -синуклеина, разрушает агрегат α -синуклеина или ингибирует образование агрегата α -синуклеина у субъекта или в головном мозге субъекта.

В другом воплощении данного изобретения предложено применение антитела и его антигенсвязывающего фрагмента или содержащей их композиции в регулировании концентрации агрегата α -синуклеина в клетке головного мозга, где антитело и его антигенсвязывающий фрагмент или содержащая их композиция ингибирует внутриклеточный транспорт агрегата α -синуклеина, разрушает агрегат α -синуклеина или ингибирует агрегат α -синуклеина в головном мозге субъекта.

Полезный эффект

Антитела, описанные в данном документе, предпочтительно связываются с α -синуклеином, особенно с агрегатом α -синуклеина, с высокой аффинностью связывания. Антитело и антигенсвязывающие фрагменты с высокой аффинностью могут уменьшать образование агрегатов α -синуклеина и снижать концентрацию агрегатов в головном мозге. Кроме того, антитело и антигенсвязывающие фрагменты с высокой аффинностью к агрегату α -синуклеина могут уменьшать образование агрегатов α -синуклеина за пределами центральной нервной системы, в результате чего снижается концентрация агрегатов в центральной нервной системе, изменяется состояние равновесия между формами α -синуклеина на границе гематоэнцефалического барьера.

Преимуществом также является возможность введения в низкой дозе благодаря высокой аффинности. Это обеспечивает огромные преимущества в клинической практике, поскольку для достижения достаточной эффективности антитело можно вводить, например, посредством простой подкожной инъекции, не ограничиваясь указанным способом.

Антитела, описанные в данном документе, могут эффективно удалять агрегаты α -синуклеина и способствовать деградации, а также ингибировать внутриклеточный транспорт α -синуклеина и, таким образом, могут найти применение в лечении заболеваний, ассоциированных с накоплением агрегатов α -синуклеина.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлены результаты дот-блоттинга, полученные при исследовании способности моноклонального антитела специфически распознавать нативный α -синуклеин в агрегированной форме, демонстрирующие, что полученное моноклональное антитело предпочтительно связывается с агрегатом α -синуклеина.

На фиг. 2 показаны результаты исследования аффинности моноклонального антитела, полученного в одном воплощении данного изобретения, методом ELISA. Антитело по данному изобретению предпочтительно связывается с агрегатом α -синуклеина с высокой аффинностью, однако аффинность к мономеру не может быть определена, поскольку аффинность к мономеру ниже, чем к агрегату, или связывание с мономером отсутствует. Эти результаты свидетельствуют, что возможно эффективно устранять или подавлять активность агентов, являющихся причиной нейродегенеративных заболеваний, патогенез которых связан с альфа-синуклеином, таких как болезнь Паркинсона.

На фиг. 3а показаны результаты анализа специфичности и аффинности связывания моноклонального антитела, полученного в одном воплощении данного изобретения, с агрегатами α -синуклеина на биосенсоре BIAcore. Результаты показывают, что антитело по данному изобретению предпочтительно связывается с агрегатами α -синуклеина с высокой аффинностью. Эти результаты свидетельствуют, что возможно эффективно устранять или подавлять активность агентов, являющихся причиной нейродегенеративных заболеваний, патогенез которых связан с альфа-синуклеином, таких как болезнь Паркинсона.

На фиг. 3б представлена таблица с результатами, показанными на фиг. 3а.

На фиг. 4 показаны результаты анализа специфичности связывания моноклонального антитела, полученного в воплощении данного изобретения, с агрегатами α -синуклеина на платформе Octet. Результаты показывают, что антитело по данному изобретению предпочтительно связывается с агрегатами α -синуклеина и согласуются с результатами, показанными на фиг. 1. Антитело #274, использованное в группе сравнения, хорошо связывалось с мономерами и агрегатами.

На фиг. 5 представлены результаты исследования способности моноклонального антитела специфически распознавать нативный α -синуклеин в агрегированной форме методом дот-блот, демонстрирующие, что моноклональное антитело, отобранное методом фагового дисплея в одном воплощении данного изобретения, предпочтительно связывается с агрегатами α -синуклеина.

На фиг. 6 показаны результаты анализа на платформе Octet специфичности связывания с агрегатами α -синуклеина того же моноклонального антитела, что и на фиг. 5. Результаты показывают, что антитело по данному изобретению предпочтительно связывается с агрегатами α -синуклеина. Эти результаты свидетельствуют, что возможно эффективно устранять или подавлять активность агентов, являющихся причиной нейродегенеративных заболеваний, патогенез которых связан с альфа-синуклеином, таких как болезнь Паркинсона.

На фиг. 7 показан принцип и результаты анализа способности моноклонального антитела, полученного в одном воплощении данного изобретения, подавлять перемещение α -синуклеина из клетки в клетку. Ядра окрашены в синий цвет, а зеленый цвет соответствует сигналу при высвобождении α -синуклеина из одной клетки и проникновении в другую клетку и образовании агрегатов при столкновении с другим α -синуклеином. Число клеток, демонстрирующих зеленое окрашивание, было существенно снижено при использовании антител 9B11, 3A9 и 11F11 по данному изобретению по сравнению с IgG, служившим в качестве отрицательного контроля. Результаты показывают, что антитело по данному изобретению, специфически связывающееся с агрегатами α -синуклеина с высокой аффинностью, может эффективно подавлять внутриклеточный транспорт α -синуклеина.

На фиг. 8а показаны результаты анализа способности моноклонального антитела, полученного в воплощении данного изобретения, удалять агрегаты α -синуклеина на модели на мышах (TG) со сверхэкспрессией человеческого α -синуклеина при окрашивании ткани головного мозга мышей на р-129 α -синуклеин после введения мышам антитела и его определения. На фигуре HP обозначает гиппокамп, р-129 α -синуклеин представляет собой маркер агрегатов α -синуклеина в фосфорилированной по 129-му остатку форме, а стрелкой указан фосфорилированный α -синуклеин. Результаты показывают, что антитело по данному изобретению способно значительно устранять α -синуклеин. WT и IgG являются отрицательными контролями, а антитело 274, которое связывается как с мономерами, так и с агрегатами, использовали в группе сравнения. Результаты свидетельствуют, что антитело по данному изобретению способно эффективно подавлять накопление агрегатов α -синуклеина и поэтому может эффективно применяться для предупреждения и/или лечения заболеваний, патогенез которых связан с α -синуклеином.

На фиг. 8б представлены результаты такого же эксперимента, как и на фиг. 8а, но с применением антитела против общего α -синуклеина. Стрелкой показан α -синуклеин человека. Антитела 9B11, 11F4 и 11F11 эффективно подавляли накопление α -синуклеина. Выявление α -синуклеина указывает, что антитело по данному изобретению способно элиминировать как сам синуклеин, так и подавлять перемещение α -синуклеина из клетки в клетку. В другом аспекте результаты можно интерпретировать как подавление образования агрегатов из мономеров или удаление всех мономеров.

На фиг. 9а показаны результаты исследования способности моноклонального антитела, полученного в воплощении данного изобретения, снижать микроглиоз *in vivo* при окрашивании ткани головного мозга мышей с использованием антитела к Iba-1 (маркер микроглиоза) после введения мышам антитела и его измерения. Стрелками указана активированная микроглия, результаты указывают, что активация микроглии существенно уменьшается в мозге мышей, которым вводили антитела 3A9, 9B11 и 11F11.

На фиг. 9б показаны результаты анализа способности моноклонального антитела, полученного в воплощении данного изобретения, уменьшать астроглиоз *in vivo* при окрашивании ткани головного мозга мышей с использованием антитела к GFAP (маркер астроглиоза) после введения мышам антитела и его измерения. Стрелками указаны активированные астроциты, результаты свидетельствуют, что антитела 3A9, 9B11 и 11F11 эффективно и существенно подавляют астроглиоз.

На фиг. 9в показаны результаты анализа способности моноклонального антитела, полученного в воплощении данного изобретения, снижать воспалительные цитокины *in vivo* при окрашивании ткани головного мозга мышей с использованием антитела к маркеру IL-1 бета после введения мышам антитела и его измерения. Стрелками указаны клетки, экспрессирующие IL-1 бета. IL-1 бета индуцирует воспаление и гибель различных нервных клеток. IL-1 бета существенно снижен в ткани головного мозга мышей, которым вводили антитело по данному изобретению.

На фиг. 9г показаны результаты анализа способности моноклонального антитела, полученного в воплощении данного изобретения, снижать воспалительные цитокины *in vivo* при окрашивании ткани головного мозга мышей с использованием антитела к маркеру IL-6 после введения мышам антитела и его измерения. Стрелками указаны клетки, экспрессирующие воспалительный цитокин IL-6. Результаты указывают, что IL-6 снижался в ткани головного мозга мышей, которым вводили антитело по данному изобретению.

На фиг. 10а и б показаны результаты определения способности моноклональных антител 3A9 и 11F11, полученных в воплощении данного изобретения, специфически распознавать тельца Леви и ней-

риты Леви соответственно в ткани головного мозга человека. Показано, что антитела по данному изобретению связываются с тельцами Леви (стрелка) и нейритами Леви (нитевидная структура в нижнем левом углу). Результаты свидетельствуют, что антитело по данному изобретению может специфически связываться с агрегатами α -синуклеина в ткани головного мозга человека и может эффективно применяться для предупреждения и/или лечения заболеваний, патогенез которых связан с α -синуклеином.

Фиг. 11 является графическим представлением результатов картирования эпитопа, распознаваемого антителами, полученными в данном изобретении, и антитела по данному изобретению преимущественно связываются с С-концевой областью. Антитела к α -синуклеину, распознающие N-конец, не распознают агрегаты при других заболеваниях, относящихся к синуклеинопатиям, таких как множественная системная атрофия (МСА), однако антитела к α -синуклеину, распознающие С-конец, имеют преимущество в том, что распознают агрегаты не только при болезни Паркинсона, но и агрегаты при различных других синуклеинопатиях.

Вариант осуществления изобретения

Данное изобретение относится к способу определения агрегата α -синуклеина, а также к уменьшению агрегатов α -синуклеина, ингибированию образования агрегатов α -синуклеина и/или ингибированию клеточного транспорта агрегатов α -синуклеина, в основе которого лежит создание антител, способных связываться с агрегатом α -синуклеина с высокой специфичностью.

Термины, использованные в данном разделе, приведены для удобства описания, но не ограничивают данное изобретение.

Если не указано иное, все научные и технические термины, используемые в данном документе, имеют обычное значение, известное специалистам в области техники. Кроме того, термины в единственном числе охватывают термины во множественном числе, а термины во множественном числе охватывают термины в единственном числе, если из контекста не следует противоположное.

Терминология

В данном описании "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" охватывает одноцепочечный или двухцепочечный нуклеотидный полимер. Нуклеотид, содержащий такой полинуклеотид, может представлять собой рибонуклеотид или дезоксирибонуклеотид или их модифицированные формы.

Если не указано иное, левый конец полинуклеотида, упомянутого в данном документе, означает его 5' конец, а его правый конец означает 3' конец.

В данном документе "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" означает геномную ДНК или РНК, или мРНК или кДНК синтетического происхождения, или их комбинации, которые относятся к полинуклеотиду или его фрагменту, которые не ассоциированы с полинуклеотидом, присутствующим в природных условиях, или не являются природными продуктами. В данном изобретении молекула нуклеиновой кислоты, содержащая определенную последовательность нуклеиновой кислоты, не содержится в интактной хромосоме. Вместе с тем, выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая определенную последовательность нуклеиновой кислоты, может содержать, по меньшей мере, несколько дополнительных кодирующих белок последовательностей в дополнение к определенной последовательности или может дополнительно содержать регуляторную последовательность и/или вектор для экспрессии определенной последовательности нуклеиновой кислоты.

В данном документе термин "регуляторная последовательность" означает полинуклеотидную последовательность, которая может влиять на экспрессию и процессинг кодирующей последовательности, будучи функционально связанной с ней. Данное свойство регуляторной последовательности может зависеть от типа хозяев. Например, регуляторная последовательность, используемая в прокариотической клетке, может включать промотор, иногда оператор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции. В эукариотической клетке регуляторная последовательность может содержать промотор, содержащий множество сайтов распознавания, энхансер транскрипции, последовательность полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции. Регуляторная последовательность может дополнительно содержать лидерную последовательность и/или последовательность партнера по слиянию.

В данном документе "вектор" означает любую молекулу, используемую для доставки молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, в клетку-хозяина, содержащую, например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус.

В данном документе "вектор экспрессии" означает вектор, подходящий для трансформации клетки хозяина и содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая функционально связана с вектором экспрессии и регулирует экспрессию гетерологичных последовательностей, кодирующих целевой белок. Данный вектор экспрессии может также быть функционально связан с кодирующей последовательностью, а в случае транскрипции, трансляции и наличия интрона он может содержать последовательность, регулирующую сплайсинг РНК или влияющую на него.

В данном документе "функционально связаны" означает, что последовательности нуклеиновых кислот, которые должны быть связаны, расположены таким образом, чтобы в соответствующих условиях осуществлять направляющую функцию. Например, если в соответствующих условиях транскрипция коди-

рующей последовательности зависит от регуляторной последовательности в составе вектора, содержащего кодирующую последовательность и регуляторную последовательность, они функционально связаны.

В данном документе "клетка-хозяин" означает клетку, способную экспрессировать целевой ген, которая трансформирована или которая должна быть трансформирована целевой последовательностью нуклеиновой кислоты. Термин включает потомков клетки-хозяина, при условии, что они экспрессируют целевой ген независимо от вида клетки-хозяина, ее особенностей и набора генов.

В данном документе "трансдукция" обычно означает передачу нуклеиновой кислоты от одной бактерии к другой бактерии при помощи бактериофага. Например, она включает передачу нуклеиновой кислоты в эукариотическую клетку с применением ретровируса, который не способен к репликации.

В данном документе "трансфекция" означает, что клетка принимает чужеродную или экзогенную ДНК, и в этом случае ДНК внедряется в клетку-хозяина через клеточную мембрану. Здесь можно упомянуть способы, известные в области техники, например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012), Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates.

В данном документе "трансформация" означает изменение генетических свойств клетки, которая модифицирована таким образом, чтобы содержать новую ДНК или РНК. Например, клетка может быть трансформирована, поскольку изменяются ее генетические свойства, путем введения нового генетического материала посредством трансдукции, трансфекции или других способов. ДНК, трансформированная способами, включающими трансдукцию или трансфекцию и т.д., может присутствовать физически интегрированной в хромосому клетки или может временно находиться в виде эписомы без репликации или в виде реплицируемой плазмиды. Когда вместе с делением клетки-хозяина происходит репликация ДНК, которой она трансформирована, ее считают стабильно трансформированной.

В данном документе "аминокислота" охватывает стандартное понятие, известное в области техники. Двадцать аминокислот естественного происхождения и их аббревиатуры представляют собой обычно используемые в области техники (Immunology-A Synthesis, 2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Green, eds., Sinauer Associates: Sunderland, Mass. 1991). Аминокислоты включают типичные аминокислоты, стереоизомеры типичных 20 аминокислот (D-аминокислоты), аминокислоты, не встречающиеся в природе, например, α,α -двузамещенные аминокислоты, N-алкил-аминокислоты и другие нетипичные аминокислоты. В качестве примеров нетипичных аминокислот можно привести 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксизин, σ -N-метиларгинин и другие схожие аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). Отличительным признаком полипептида, используемого в данном изобретении и в области техники, является аминоконец в левой части последовательности и карбокси-конец в правой части последовательности.

В данном описании "полипептид" или "белок" означает полимер из аминокислотных остатков, и данные термины используются взаимозаменяемо. Они также охватывают не только полимеры аминокислотных остатков естественного происхождения, но и полимеры, содержащие их аналоги или миметики. Кроме того, полипептид или белок может содержать модификации, такие как добавление углеводов для фосфорилирования или гликозилирования и т.д. Кроме того, полипептид или белок можно продуцировать в рекомбинантной клетке или клетке, встречающейся в природе. Кроме того, полипептид или белок может включать такие, в которых осуществлена делеция, вставка и/или замещение части последовательности дикого типа или аминокислотной последовательности. Кроме того, полипептид или белок охватывает антитело, например антитело к α -синуклеину (или обозначаемое анти- α -синуклеиновое антитело), белок, связывающийся с α -синуклеином, или антигенсвязывающий фрагмент или последовательность, в которой осуществлена делеция, вставка и/или замена одной или более чем одной аминокислоты. Кроме того, "полипептидный фрагмент" означает полипептид, имеющий аминоконцевую делецию, карбокси-концевую делецию и/или внутреннюю делецию, по сравнению с полноразмерным белком. Данный фрагмент может также включать модифицированные аминокислоты при сравнении с полноразмерным белком. В одном воплощении фрагмент может иметь длину от 5 до 500 аминокислот, например длину по меньшей мере 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 или более аминокислот. С учетом задач данного изобретения полипептидный фрагмент, который может быть полезен, включает иммунологически функциональный фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий домен. В случае антитела, связывающегося с α -синуклеином, такой полезный фрагмент включает последовательность, содержащую 1, 2 или 3 CDR тяжелых цепей или легких цепей или целую цепь антитела или ее часть, содержащую вариабельную область или константную область тяжелой цепи или легкой цепи, без ограничения.

В данном документе "выделенный полипептид, антитело или белок" является таким, что с ним вместе обычно не обнаруживается какой-либо другой белок, и по меньшей мере примерно 50% или более липидов, углеводов и полинуклеотидов, связанных с ними в природе, удалены. Обычно выделенный белок, полипептид или антитело составляет в определенной композиции по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 25% или по меньшей мере

приблизительно 50%. Данный полипептид может кодироваться геномной ДНК, кДНК, мРНК или другой РНК синтетического происхождения или любыми их комбинациями. В частности, выделенный белок, полипептид или антитело являются по существу свободными от примесей других белков или других полипептидов, которые препятствуют его применению в терапии, диагностике, профилактике, научных исследованиях или применению по другим назначениям.

В данном документе "вариант" полипептида, белка или антитела, например, такой как антигенсвязывающий фрагмент, представляет собой полипептид, в котором вставлен, удален, добавлен и/или заменен один или более чем один аминокислотный остаток по сравнению с другой полипептидной последовательностью, и охватывает слитый белок. Кроме того, вариант белка охватывает вариант, модифицированный путем ферментативного расщепления белка, фосфорилирования или другой посттрансляционной модификации, но сохраняющий биологическую активность антитела по данному описанию, например связывание с α -синуклеином и специфичность. Вариант может быть приблизительно на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81 или 80% идентичен последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе.

"Производное" полипептида означает полипептид, химически модифицированный по одному или более чем одному остатку в результате конъюгации с другой химической группировкой, отличный от варианта со вставкой, делецией, добавлением или заменой.

В данном описании термин "естественного происхождения" по отношению к полипептиду, нуклеиновой кислоте, клетке-хозяину и т.д. означает материал, встречающийся в природе.

В данном описании " α -синуклеин" означает нативный α -синуклеин (NCBI ID: NP_000336), состоящий из 140 аминокислот, кодируемый геном SNCA, и включает различные процессированные формы, а также полноразмерный непроцессированный белок. Кроме того, α -синуклеин охватывает варианты α -синуклеина естественного происхождения, такие как мутанты, сплайс-варианты или аллельные варианты. Помимо белков из 140 остатков, варианты могут включать формы белка из 126 и 112 остатков (CAG3339.1), в которых осуществлена делеция экзона 3 или экзона 5. Также известны специфические полиморфизмы или миссенс-мутации гена SNCA, которые ассоциированы с возникновением болезни Паркинсона (Singleton AB, et al., Science 2003, 302: 841), и такие варианты также охватываются вариантом α -синуклеина, бета-синуклеин и гамма-синуклеин гомологичны α -синуклеину. В одном воплощении антитело по данному изобретению специфически распознает α -синуклеин. Аминокислотная последовательность α -синуклеина приведена в SEQ ID NO: 225.

В данном описании "агрегат α -синуклеина" образуется вследствие изменения конформации α -синуклеина и относится к структуре или агрегату, включающему по меньшей мере одно из перечисленного: олигомера, протофибрилла и/или фибриллы, вследствие изменения конформации α -синуклеина.

В данном документе "идентичность" означает сходство последовательностей двух или более полипептидов или двух или более полинуклеотидов, которое определяют путем выравнивания и сравнения двух или более полипептидов или двух или более полинуклеотидов. Такая идентичность последовательностей обычно выражается в виде "процента идентичности", который означает соотношение идентичных аминокислот или нуклеотидов в сравниваемых молекулах и рассчитывается по отношению к молекуле наименьшего размера среди сравниваемых молекул. Применительно к способам, которые можно использовать для расчета идентичности множества молекул путем выравнивания нуклеиновых кислот или полипептидов, можно упомянуть следующие документы: Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; and Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073.

Когда рассчитывают процент идентичности, сравниваемые последовательности выравнивают таким образом, чтобы обеспечить максимальное совпадение последовательностей, и в выровненных последовательностях могут иметься гэпы, совпадения и несовпадения, которые анализируют при помощи специальной математической модели или компьютерного алгоритма. В одном воплощении данный процент идентичности можно определять с использованием пакета программ GCG, включающего программу GAP, которая выравнивает две последовательности таким образом, чтобы максимизировать совпадение сравниваемых последовательностей и минимизировать число гэпов, используя алгоритм Нидлмана и Вунша (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 1984, 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, USA). Компьютерный алгоритм GAP определяет "совпадающие отрезки", выравнивая две последовательности таким образом, чтобы максимизировать совпадение между ними и минимизировать число гэпов в двух сравниваемых полипептидных или полинуклеотидных последовательностях. Алгоритм также использует штраф за открытие гэпа (он рассчитывается как 3х среднюю диагональ, где "средняя диагональ" представляет собой среднее из диагоналей используемых матриц сравнения, а "диагональ" представляет собой балл или число, присваиваемое за абсолютное совпадение каждой аминокислоты в специальной матрице сравнения) и штраф за продление гэпа (он часто составляет 1/10 от штрафа

за открытие гэпа) и матрицу сравнения, например PAM 250 или BLOSUM 62. В конкретном воплощении использовали стандартную матрицу сравнения (см. Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 1978, 5:345-352 для матрицы сравнения PAM 250; см. Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1992, 89:10915-10919 для матрицы сравнения BLOSUM 62). В одном воплощении рекомендуемые параметры для определения процента идентичности полипептидов или полинуклеотидов, в которых используют программу GAP, являются следующими: алгоритм: Needleman et al., J. Mol. Biol. 1970, 48:443-453; матрица сравнения: BLOSUM 62 (Henikoff et al., 1992, см. выше); штраф за открытие гэпа: 12 (штраф за конечной гэп отсутствует); штраф за удлинение гэпа: 4; пороговое значение степени сходства: 0.

При выравнивании двух последовательностей с использованием определенных параметров результатом может быть совпадение с высокой степенью идентичности на коротком участке последовательности, несмотря на то, что между двумя последовательностями нет существенного родства. В таком случае, чтобы две последовательности были выровнены по меньшей мере на протяжении 50 последовательно расположенных аминокислот, можно скорректировать параметры используемого алгоритма, такого как в программе GAP.

Термин "по существу чистый", используемый в данном документе, означает, что целевая молекула присутствует в преобладающем количестве. Другими словами, это означает более высокую концентрацию в молярном отношении, чем у любой другой отдельно взятой молекулы в составе той же самой смеси. В одном воплощении по существу чистая молекула составляет по меньшей мере приблизительно 50% (в молярном отношении), по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 99% среди всех полимеров, входящих в состав композиции. В другом воплощении целевая молекула является по существу гомогенно очищенной, и другие примеси не определяются стандартными способами, и поэтому композиция содержит один вид гомогенного полимерного вещества.

Один аспект данного изобретения относится к рекомбинантному антителу, специфически связывающемуся с белком α -синуклеином или человеческим белком α -синуклеином, или к его антигенсвязывающему фрагменту. В этом аспекте "рекомбинантный белок" представляет собой белок, получаемый рекомбинантными способами, а именно при помощи экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанной в данном изобретении. Способы и методики продуцирования рекомбинантного белка широко известны в области техники.

В данном документе "аффинность", "степень аффинности" или "аффинность связывания" представляет собой силу взаимодействия между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и антигеном и определяется свойствами антигена, такими как размер, форма и/или заряд антигена, и последовательностями CDR антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Способы определения аффинности известны в области техники, можно упомянуть следующие из них.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обозначают "специфически связывающимися" с их мишенью, такой как антиген, когда константа диссоциации (K_D) составляет 10^{-6} М или менее. Антитело специфически связывается с мишенью с "высокой аффинностью", когда K_D составляет 1×10^{-8} М или менее. Антитело и антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению обладают высокой аффинностью к агрегату, составляющей 1×10^{-9} М или менее, в частности 1×10^{-10} М или менее, или более конкретно 1×10^{-11} М или менее.

В данном описании "предпочтительно связывающийся" охватывает связывание только с агрегатом α -синуклеина или связывание как с мономером α -синуклеина, так и с агрегатом α -синуклеина, при этом аффинность к агрегату выше, чем к мономеру. В воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному описанию специфически связывается с агрегатом с высокой аффинностью, но не связывается с мономером α -синуклеина. В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению могут связываться как с агрегатом, так и с мономером, однако связываются с агрегатом α -синуклеина с более высокой аффинностью по сравнению с мономером α -синуклеина. В одном воплощении аффинность к агрегату α -синуклеина по меньшей мере в два раза выше, чем аффинность к мономеру α -синуклеина, или сила связывания низкая и не может быть охарактеризована как специфическое связывание с антителом, или сила связывания не может быть зарегистрирована в диапазоне концентраций антитела, используемом в эксперименте.

В одном воплощении данного изобретения высокая аффинность антитела или антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению к агрегату α -синуклеина представляет собой K_D $1,0 \times 10^{-8}$ М или менее; K_D $1,0 \times 10^{-9}$ М или менее в другом воплощении; K_D $1,0 \times 10^{-10}$ или менее в следующем воплощении; K_D 1×10^{-11} М или менее; и K_D 1×10^{-12} М или менее в еще одном воплощении. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты с такой высокой аффинностью можно вводить в более низких дозах по сравнению с антителами, имеющими низкую аффинность, например при K_D выше 10^{-7} М или 10^{-8} М, без ограничения. Для клинической практики это является огромным преимуществом, поскольку достаточная эффективность может быть достигнута при введении посредством простой подкожной инъекции. Кроме того, антитела и антигенсвязывающие фрагменты с высокой аффинностью к агрегатам α -синуклеина могут уменьшать образование агрегатов α -синуклеина, в результате чего будет снижаться концентрация агре-

готов в головном мозге. Кроме того, антитело и антигенсвязывающие фрагменты с высокой аффинностью к агрегату α -синуклеина могут уменьшать образование агрегатов α -синуклеина за пределами центральной нервной системы, тем самым изменяя состояние равновесия между формами α -синуклеина на границе гематоэнцефалического барьера, таким образом снижать концентрацию агрегатов в центральной нервной системе.

В данном описании "антигенсвязывающий участок, или сайт" означает белок или часть белка, специфически связывающиеся с определенным антигеном. Например, часть антитела, содержащая аминокислотные остатки, обеспечивающие специфичность и аффинность антитела по отношению к антигену при взаимодействии с антигеном. Антигенсвязывающий участок обычно содержит один или более чем один "гипервариабельный участок (CDR)". Определенный антигенсвязывающий участок также содержит один или несколько каркасных участков (FR). CDR представляют собой аминокислотные последовательности, которые вносят вклад в специфичность и аффинность связывания с антигеном. Каркасные участки способствуют поддержанию надлежащей конформации этих CDR, таким образом, способствуя связыванию между антигенсвязывающим участком и антигеном.

В данном описании "антитело" означает антигенсвязывающий фрагмент, который может конкурировать с интактным антителом за связывание с интактным иммуноглобулином любого изотипа или с антигеном-мишенью. Например, он охватывает химерные, гуманизированные, полностью человеческие антитела и антитела с двойной специфичностью или их антигенсвязывающие фрагменты. Само антитело является одним из видов антигенсвязывающих белков. Интактное антитело обычно содержит по меньшей мере 2 полноразмерных тяжелых цепи и 2 полноразмерных легких цепи, но в некоторых случаях, как у животных семейства Camelidae, антитело может содержать только тяжелые цепи. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может происходить из единственного источника или быть химерным. Химерное антитело содержит часть, происходящую из антител двух различных типов, и описано более подробно ниже. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть произведены гибридомой, с использованием технологии рекомбинантной ДНК или ферментативным или химическим расщеплением интактного антитела. Если не указано иное, антитело охватывает антитело, содержащее 2 полноразмерных тяжелых цепи и 2 полноразмерных легких цепи, а также их производные, варианты, фрагменты и мутанты, примеры которых описаны ниже.

В данном документе "легкая цепь" охватывает полноразмерную легкую цепь, имеющую последовательность вариабельного участка, достаточную для обеспечения специфичности в отношении антигена или эпитопа и его фрагмента. Полноразмерная легкая цепь содержит вариабельный домен VL и константный домен CL. Вариабельный домен легкой цепи находится на аминоконце полипептида легкой цепи. Типы легких цепей включают цепи каппа и лямбда.

В данном документе "тяжелая цепь" охватывает полноразмерную тяжелую цепь, имеющую последовательность вариабельного участка, достаточную для обеспечения специфичности в отношении антигена или эпитопа и его фрагмента. Полноразмерная тяжелая цепь содержит вариабельный домен VH и 3 константных домена CH1, CH2 и CH3. Домен VH присутствует на аминоконце полипептида тяжелой цепи, а домены CH присутствуют на карбокси-конце, из них CH3 располагается ближе всех к карбокси-концу. Тяжелую цепь содержат IgG (включая подтипы IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2) и изотипы IgM и IgE.

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" цепи (тяжелой или легкой цепи) антитела или иммуноглобулина включает часть антитела, которая лишена некоторых аминокислот по сравнению с полноразмерной цепью, но может специфически связываться с антигеном. Данный фрагмент можно считать обладающим биологической активностью в том аспекте, что он может специфически связываться с антигеном-мишенью или может конкурировать с другими антителами или антигенсвязывающими фрагментами за связывание с определенным эпитопом. В одном аспекте такой фрагмент содержит по меньшей мере один CDR, присутствующий в полноразмерной легкой цепи или тяжелой цепи, а в некоторых воплощениях он содержит короткоцепочечную тяжелую цепь и/или легкую цепь или ее часть. Данный биологически активный фрагмент может быть получен при помощи технологии рекомбинантной ДНК или может быть получен, например, путем ферментативного или химического расщепления интактного антитела. Иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина включает Fab, Fab', F(ab')₂, Fv домены антитела и одноцепочечное антитело, но не ограничивается ими и может происходить из организма любого млекопитающего, включая человека, мышь, крысу, верблюда или кролика, но не ограничивается ими. Функциональная часть антитела, такая как один или несколько CDR, описанных в данном документе, может быть связана со вторым белком или низкомолекулярным соединением ковалентной связью, благодаря этому может использоваться в качестве целевого терапевтического агента для определенной мишени.

В данном описании "Fab-фрагмент" состоит из 1 легкой цепи и 1 тяжелой цепи, содержащей только вариабельный участок и CH1. Fab фрагмент не может образовывать дисульфидную связь с другой тяжелой цепью.

В данном описании "Fc фрагмент" содержит фрагменты двух тяжелых цепей, содержащих CH2 и

СНЗ домены антитела. Эти фрагменты 2 тяжелых цепей объединены друг с другом посредством двух или более дисульфидных связей и гидрофобных взаимодействий между доменами СНЗ.

В данном документе "Fab' фрагмент" содержит участок между СН1 и СН2 доменами тяжелой цепи в дополнение к Fab фрагменту и между двумя тяжелыми цепями двух молекул Fab' фрагментов может образовываться дисульфидная связь с образованием $F(ab')_2$

В данном документе " $F(ab')_2$ фрагмент" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие переменную область, СН1 и часть константной области между доменами СН1 и СН2, как указывалось выше, и, таким образом, между 2 тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом, $F(ab')_2$ фрагмент состоит из двух Fab' фрагментов, и два Fab' фрагмента соединены между собой дисульфидной связью.

В данном документе "Fv область" представляет собой фрагмент антитела, который содержит каждую из переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, но не содержит константную область. scFV может быть таким, в котором тяжелая цепь и легкая цепь связаны дисульфидной связью. scFc может быть таким, в котором Fv связана гибким линкером. scFv-Fc может быть таким, в котором Fc связана с scFV. Миниантитело может быть таким, в котором СНЗ связан с scFV. Диатело содержит две молекулы scFV.

В данном документе "одноцепочечное антитело (scAb)" представляет собой единую полипептидную цепь, содержащую по одной переменной области тяжелой цепи и легкой цепи и константную область легкой цепи, где переменные области тяжелой цепи и легкой цепи соединены гибким линкером. Короткоцепочечное антитело может относиться, например, к антителу, описанному в патенте US 5260203, содержание которого включено путем ссылки.

В данном документе "доменное антитело" (dAb) представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только переменный участок тяжелой цепи или переменный участок легкой цепи. В одном воплощении две или более областей VH связаны ковалентной связью с пептидным линкером с образованием двухвалентного доменного антитела. Две области VH такого двухвалентного доменного антитела могут быть нацелены на один и тот же антиген или на различные антигены.

В данном документе "двухвалентный антигенсвязывающий белок" или "двухвалентное антитело" содержит два антигенсвязывающих сайта. Два антигенсвязывающих сайта, содержащихся в таком двухвалентном антителе, могут обладать специфичностью к одному и тому же антигену или могут входить в состав антитела с двойной специфичностью, связываясь по отдельности с разными антигенами.

В данном документе "мультиспецифичный антигенсвязывающий белок" или "мультиспецифичное антитело" направлены против двух или более антигенов или эпитопов.

В данном документе "биспецифичный", или "обладающий двойной специфичностью" антигенсвязывающий белок или антитело представляет собой гибридный антигенсвязывающий белок или антитело, имеющие 2 различных антигенсвязывающих сайта. Такое биспецифичное антитело представляет собой разновидность мультиспецифичного антигенсвязывающего белка или мультиспецифичного антитела и может быть получено различными известными способами, например, такими способами как слияние гибридом или присоединение Fab' фрагмента. Например, можно процитировать Songvilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 1990, 79:315-321; Kostelný et al., J. Immunol. 1992, 148:1547-1553 и др. Два отличающихся друг от друга эпитопа, с которыми связываются два антигенсвязывающих сайта биспецифического антигенсвязывающего белка или антитела, могут располагаться на одном и том же или на различных белках-мишенях.

В данном документе термин "антиген" или "иммуноген" означает молекулу или часть молекулы, с которой, например, может связываться антигенсвязывающий белок (например, антитело или его иммунологически функциональный антигенсвязывающий фрагмент), и может использоваться для продуцирования антитела, с которым может связываться антиген, в организме животного. Антиген может содержать один или более чем один эпитоп, который может взаимодействовать с другим антителом или его фрагментом. В одном воплощении данного изобретения антиген представляет собой полноразмерный белок α -синуклеин или часть белка α -синуклеина с делецией С-конца, содержащий аминокислотные остатки от 1 до 120.

В данном документе "эпитоп" представляет собой часть молекулы, которая связывается или распознается антигенсвязывающим белком или антителом и включает, например, детерминанты молекул, способные специфически связываться с антигенсвязывающим белком, таким как антитело или Т-клеточный рецептор. Эпитоп может быть линейным или нелинейным и, например, может представлять собой аминокислотные остатки, которые имеют разную локализацию и не расположены последовательно в полипептидной последовательности, и связываться с одним антигенсвязывающим белком, как конформационный эпитоп. В одном воплощении эпитоп включает трехмерную структуру, которая схожа с эпитопом, используемым для продуцирования антитела, но может представлять собой миметик в том аспекте, что он не включает все или часть остатков эпитопа, используемого для продуцирования антитела. Обычно эпитоп представляет собой белок, но может представлять собой другие виды веществ, такие как нуклеиновая кислота. Фактор, определяющий эпитоп, может представлять собой химически активную группу, образованную на поверхности молекулы, такую как аминокислота, боковая углеводная цепь, фосфориль-

ная группа или сульфонильная группа, или может иметь определенную трехмерную структуру и/или определенный заряд. В целом, антитело, специфичное в отношении определенного антигена-мишени, может распознавать эпитоп антигена-мишени в белковом и/или полимерном комплексе. Антитело по данному изобретению может распознавать С-конец. В одном воплощении антитело по данному изобретению распознает С-конец α -синуклеина, в частности остатки 110-120 или остатки 111-122 в других воплощениях. В частности, когда антитело распознает остатки от 110 до 122, антитело демонстрирует свойство предпочтительного связывания с агрегатом.

В данном документе "конъюгат" означает молекулу, отличную от антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, в частности химерную молекулу, в частности проходящую через гематоэнцефалический барьер, описанную ниже, или терапевтический агент. В составе конъюгата антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению связаны с другими молекулами посредством ковалентной связи, сил Ван дер Ваальса или гидрофобных взаимодействий, капсулирования, включения или комбинации перечисленного. В составе конъюгата по одному из воплощений антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению могут быть связаны пептидным линкером. Кроме того, в составе конъюгата антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению могут быть связаны с терапевтическим агентом при помощи спиртовой группы, кислотной группы, карбонильной группы, тиоловой группы или аминогруппы с применением стандартных методов химического синтеза (например, US 2010/0028370). В данном описании антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению образуют слитый белок, который связан с другим пептидом при помощи ковалентной связи или пептидного линкера.

В данном описании термин "гематоэнцефалический барьер" или ГЭБ представляет собой барьер, образованный плотными контактами в клеточной мембране эндотелия капилляров головного мозга, который существует между головным мозгом, позвоночным столбом и окружающей их кровеносной системой. Эти барьеры являются очень прочными и ограничивают прохождение в головной мозг низкомолекулярных молекул, имеющих молекулярную массу приблизительно 60 кДа или выше. Гематоэнцефалический барьер, барьер между спинным мозгом и кровеносными сосудами и гемато-ретикулярный барьер представляют собой непрерывный капиллярный барьер с центральной нервной системой и обозначаются общим термином ГЭБ.

Термин "транспорт через ГЭБ" относится к белкам, включая пептиды и полипептиды, нуклеиновые кислоты, антитела или низкомолекулярные соединения, которые могут проходить через гематоэнцефалический барьер и доставлять антитело и антигенсвязывающий фрагмент по данному описанию.

В данном документе "терапевтический агент" означает молекулу, которую необходимо вводить субъекту для желаемого терапевтического эффекта. Субъект охватывает млекопитающих, не являющихся человеком, например приматов, или человека. Примеры терапевтических агентов включают белок, включая пептид и полипептид, нуклеиновую кислоту, антитело или низкомолекулярное соединение. В другом аспекте терапевтический агент, будучи связанным с антителом по данному изобретению, может применяться в качестве терапевтического агента при заболеваниях, связанных с агрегатами α -синуклеина.

В данном описании термин "лечение" означает уменьшение, ослабление, облегчение или излечение повреждения, заболевания или симптома или болезненного состояния; придание пациенту способности противостоять повреждению, заболеванию или симптому или патологическому состоянию; замедление прогрессирования повреждения, заболевания или симптома или патологического состояния или облегчение или излечение повреждения, заболевания или симптома или патологического состояния, включая объективные или субъективные параметры, улучшающие качество жизни пациента психологически или физически. Облегчение или излечение повреждения, заболевания или симптома или патологического состояния можно определять на основании результатов физикального осмотра, оценки различных индексов, относящихся к заболеванию, и визуальной диагностики. В одном воплощении термин охватывает лечение заболеваний, связанных с α -синуклеином, снижение частоты возникновения заболеваний, снижение тяжести заболеваний и/или облегчение симптомов заболевания, связанного с α -синуклеином, способом по данному изобретению.

В данном описании термин "заболевание, связанное с агрегатом α -синуклеина" представляет собой группу нейродегенеративных заболеваний, обозначаемых α -синуклеинопатиями, и характеризуется обнаружением агрегатов α -синуклеина в очагах, включая нейроны и популяции клеток глии, дегенерацией дофаминовой системы, двигательными расстройствами, когнитивными нарушениями и образованием телец Леви и нейритов Леви (Kim et al. *Alzheimer's Research & Therapy* 2014, 6:73; McKeith et al., *Neurology* (1996) 47:1113-24). Заболевания включают болезнь Паркинсона (БП), болезнь Паркинсона с деменцией (БПД), деменцию с тельцами Леви (ДТЛ), вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (ВТЛ), сочетание болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона, множественную системную атрофию (МСА) и другие различные заболевания, связанные с дегенерацией аксонов нервных клеток, но не ограничиваются ими. В одном воплощении антитело по данному изобретению может применяться для лечения болезни Паркинсона.

В данном описании "эффективная доза" обычно означает количество, достаточное для снижения тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, в частности заболевания, связанного с α -синуклеином, устранения симптомов заболевания, в частности заболевания, связанного с α -синуклеином, и/или основополагающей причины возникновения заболевания или для предупреждения возникновения симптомов заболевания, в частности заболевания, связанного с α -синуклеином, и/или основополагающей причины, и/или для улучшения или коррекции повреждений вследствие заболевания, в частности заболевания, связанного с α -синуклеином. В некоторых воплощениях эффективная доза представляет собой терапевтически эффективную дозу или профилактически эффективную дозу. "Терапевтически эффективная доза" представляет собой количество, достаточное для лечения заболевания, в частности симптомов или состояний, связанных с α -синуклеином, или для предупреждения, замедления заболевания, в частности симптомов или состояний, связанных с α -синуклеином, или их регрессии. "Профилактически эффективная доза" представляет собой количество для предупреждения или замедления возникновения или рецидива заболевания, в частности заболевания, связанного с α -синуклеином, или симптомов заболевания, в частности заболевания, связанного с α -синуклеином, и снижения его вероятности. Полный терапевтический или профилактический эффект скорее может быть достигнут многократным введением доз, нежели однократным введением дозы. Таким образом, терапевтически или профилактически эффективную дозу можно доставлять путем однократного или многократного введения.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент

В данном изобретении раскрыто антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с белком α -синуклеином, включая человеческий α -синуклеин. Антитело по данному изобретению представляет собой полипептид, содержащий один или более чем один гипервариабельный участок или сайт (CDR), описанный в данном документе.

В одном воплощении CDR находится в "каркасной" области, и каркасная область ориентирует CDR таким образом, что указанные CDR могут обладать надлежащими антигенсвязывающими свойствами.

Антитело по данному изобретению специфически связывается с белком α -синуклеином, обнаруживаемым в головном мозге человека, в частности с агрегатами α -синуклеина, с высокой аффинностью.

В одном воплощении антитело по данному изобретению может предпочтительно связываться с агрегатом α -синуклеина с высокой аффинностью и снижать его концентрацию. Уменьшение или разрушение агрегатов α -синуклеина антителом и его антигенсвязывающим фрагментом по данному изобретению включает эффективное расщепление и разрушение патогена, вызванное комплексом антитело-антиген, для облегчения разрушения агрегатов α -синуклеина лизосомами клетки.

В еще одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно связывается с агрегатом α -синуклеина с высокой аффинностью и, таким образом, может предупреждать дополнительное образование агрегатов α -синуклеина, снижать концентрацию, ингибировать внутриклеточный транспорт и снижать эффективную дозу при разработке лекарства.

В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно связывается с агрегатом α -синуклеина с высокой аффинностью и, таким образом, может ингибировать или предупреждать перемещение агрегатов α -синуклеина из одной клетки в другую.

В одном воплощении антитело охватывает моноклональное антитело, антитело с двойной специфичностью, двойное антитело, мультиспецифическое антитело, множественное антитело, миниантитело, доменное антитело, миметик антитела (или синтетическое антитело), химерное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело или слитое антитело (или конъюгат антитела) и его фрагмент, но не ограничивается ими, и включает различные формы антител, описанных в данном документе.

В одном воплощении фрагмент антитела по данному описанию включает молекулы Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, диатело или одноцепочечную молекулу антитела, в которой тяжелая цепь и легкая цепь соединены спейсером. В другом воплощении антитело по данному описанию может включать полипептид, состоящий только из легких цепей или только из тяжелых цепей, включающих вариабельные области, приведенные в табл. 1а и 1б.

Антитело, раскрытое здесь, имеет общие специфические области или последовательности с другим антителом, раскрытым здесь. В одном воплощении оно может иметь общую константную область антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В другом воплощении оно может иметь общую область Fc. В другом воплощении оно может иметь общий каркасный участок вариабельной области.

Подтвердили, что антитела по данному описанию связываются с агрегатами человеческого α -синуклеина с высокой аффинностью. Как дополнительно описано в примерах, протестировали многочисленные клоны антител и обнаружили, что они распознают эпитоп, расположенный между остатками 110-120 или 111-121 С-конца. Не ограничиваясь какой-то конкретной теорией, полагают, что предпочтительное связывание и высокая аффинность антител по данному изобретению может быть обусловлена распознаванием остатков 110-120, в отличие от стандартных антител, распознающих остатки 121-130 С-конца.

В одном воплощении антитело по данному изобретению имеет обычную структуру антитела,

встречающегося в природе. Животные семейства верблюдовых продуцируют антитело, состоящее только из тяжелой цепи, но структурная единица такого антитела обычно содержит тетрамерный полипептид, где тетрамер содержит две одинаковых пары полипептидных цепей, состоящие из двух различных полипептидных цепей. У типичного антитела каждая пара полипептидных цепей содержит одну полноразмерную легкую цепь (приблизительно 25 кДа) и одну полноразмерную тяжелую цепь (приблизительно от 50 до 70 кДа). Каждая цепь имеет характерный паттерн укладки и состоит из нескольких доменов иммуноглобулинов, состоящих приблизительно из 90-110 аминокислот. Эти домены представляют собой основные единицы, составляющие полипептид антитела. Амино-конец каждой цепи обычно содержит участок, обозначаемый вариательной областью, или V областью, которая представляет собой часть, распознающую антиген. Карбокси-конец является эволюционно более консервативным по сравнению с аминоконцом и содержит участок, обозначаемый константной областью, или С-областью. У человека легкие цепи обычно классифицируют как легкие цепи каппа (κ) или лямбда (λ), и они содержат одну вариательную область и одну константную область соответственно. Тяжелые цепи обычно классифицируют как цепи мю (μ), дельта (δ), гамма (γ), альфа (α) или эpsilon (ϵ), и они определяют изотипы IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG включает IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, но имеет неограниченное число подтипов. Подтипы IgM включают IgM1 и IgM2. Подтипы IgA включают IgA1 и IgA2. У человека изотипы IgA и IgD содержат 4 тяжелых цепи и 4 легких цепи; изотипы IgG и IgE содержат 2 тяжелых цепи и 2 легких цепи, а изотип IgM содержит 5 тяжелых цепей и 5 легких цепей. Константная область тяжелой цепи обычно опосредует эффекторную функцию, при этом содержит один или более чем один домен. Число доменов константной области тяжелой цепи различается в зависимости от изотипов. Тяжелая цепь IgG, например, содержит 3 домена С-области, известные как C_H1, C_H2 и C_H3 соответственно. Антитело, описанное в данном документе, может относиться к любому из указанных изотипов и подтипов. В одном воплощении антитело по данному изобретению относится к подтипу IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 или IgG4.

Вариательная область тяжелой цепи и вариательная область легкой цепи по данному изобретению могут быть связаны по меньшей мере с частью константной области человеческого происхождения. Выбор константной области отчасти может определяться необходимостью антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности, антитело-зависимого клеточного фагоцитоза и/или комплемент-зависимой цитотоксичности. Например, изотипы IgG1 и IgG3 у человека опосредуют комплемент-зависимую цитотоксичность, а изотипы IgG2 и IgG4 человека не опосредуют такой цитотоксичности. Кроме того, IgG1 и IgG3 человека индуцируют клеточно-опосредованную эффекторную функцию сильнее, чем IgG2 и IgG4 человека. Константная область легкой цепи может быть типа лямбда или каппа.

В одном воплощении антитело к α -синуклеину по данному изобретению может быть человеческим антителом, а константная область тяжелой цепи может относиться к типу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В следующем воплощении антитело по данному изобретению относится к типу IgG1 или IgG2.

В полноразмерной легкой цепи и тяжелой цепи вариательная область и константная область соединены "J" сегментом, который имеет длину приблизительно 12 или более аминокислот, а тяжелая цепь также содержит "D" сегмент приблизительно из 10 или более аминокислот. См., например, *Fundamental Immunology*, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press. Обычно вариательные области пары легкая цепь/тяжелая цепь образуют антигенсвязывающий сайт антитела.

Вариательные области цепи иммуноглобулина обычно имеют одинаковую общую структуру и содержат относительно консервативные каркасные области (FR), соединенные 3 гипервариабельными областями, обозначаемыми "гипервариабельными сайтами, областями, или доменами", или CDR (Complementary Determining Region). CDR вариательной области каждой цепи, входящей в состав пары тяжелая цепь/легкая цепь, обычно окружены каркасными областями, таким образом образуя структуру, специфически связывающуюся с определенным эпитопом белка-мишени (α -синуклеина). Эти элементы областей легкой цепи и тяжелой цепи естественного происхождения обычно расположены в следующем порядке от N-конца к С-концу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Положение соответствующих аминокислотных последовательностей в составе вариательной области можно определить согласно системе нумерации Kabat (*Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (1987 and 1991, NIH, Bethesda, MD) или Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 1987, 196:901-917; Chothia et al. 1989, *Nature* 1989, 342:878-883).

Последовательности CDR, входящие в состав вариабельных областей тяжелой и легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению, представлены в табл. 1а и 1б соответственно. В каждой вариабельной области последовательности CDR подчеркнуты и представлены последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно, в порядке от начала к концу. Последовательности CDR в составе вариабельной области подчеркнуты. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 показаны в порядке от начала к концу соответственно.

Таблица 1а

Клон	VH CDR SEQ ID NOs			Вариабельная область тяжелой цепи VH, аминокислотные последовательности и SEQ ID NO	
	H1	H2	H3	NO	АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
1E4	1	15	29	85	<u>EVQLQESGAELVRRPGTSVKVSCKASQYAFTHYLEMYKORPGGGLNIGVIN</u> <u>PGSGGTHYNEKPKGRATLTADRSSSTAYNQLSSLTSDDSAVYPCASQNYDTY</u> <u>NGGGTLVTSSA</u>
9B11	2	16	30	86	<u>EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFTFTHYAMHWYRQAPGKGLHWARI</u> <u>SKSNMYATYYADSVKGRFTISRDDSSQLYLQNNLKTEDTAMYYCVKQDFD</u> <u>YNGGGTLVTSS</u>
3A9	3	17	31	87	<u>EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFTFSSYAMSMYRQTPFKRLHWATIS</u> <u>NGGGTYTYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQNSSLRSEDATAMYYCARHITTVR</u> <u>PTKYFDYNGGGTLVTSS</u>
10F10	4	18	32	88	<u>EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFTFSSYAMSMYRQTPFGNHNLMGYI</u> <u>MYDSSDYSPLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTEDTATYYCVKQDYNG</u> <u>QGTTLVTSS</u>
11F11	5	19	33	89	<u>EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSQFTFSDPYMEYRQPPGKRLNIASR</u> <u>NKANDYTHEYSASVKGRFTISRDTSGSILYLQNNLRAEDTAIYYCARDANG</u> <u>KPPAYNGGGTLVTSSA</u>
AC8	6	20	34	90	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFTFSDYSMSMYRQAPGKGLHWYSQIS</u> <u>SGGSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQNNSLRAEDTAVYYCAKIFPHQFD</u> <u>YNGGGTLVTSS</u>
AE8	7	21	35	91	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFTFSNYAMSMYRQAPGKGLHWYSATIS</u> <u>SGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQNNSLRAEDTAVYYCARREPLYFD</u> <u>YNGGGTLVTSS</u>
AA9	8	22	36	92	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFTFSSYSMSMYRQAPGKGLHWYSATY</u> <u>PGSSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQNNSLRAEDTAVYYCARHAATFD</u> <u>YNGGGTLVTSS</u>
DG5	9	23	37	93	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFTFSNYAMSMYRQAPGKGLHWYSVVIS</u> <u>PGSONIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQNNSLRAEDTAVYYCARVTLACP</u> <u>TIKRCYSNGMDVNGGGTLVTSS</u>
AD2	10	24	38	94	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFTFSNYAMSMYRQAPGKGLHWYSALIS</u> <u>MSGSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQNNSLRAEDTAVYYCARSONMFD</u> <u>YNGGGTLVTSS</u>
AD7	11	25	39	95	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFTFSQYAMSMYRQAPGKGLHWYSALIS</u> <u>PNQGNKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQNNSLRAEDTAVYYCARREPVYFD</u> <u>YNGGGTLVTSS</u>
DG11	12	26	40	96	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFTFSDYAMSMYRQAPGKGLHWYSVIS</u> <u>PGSGSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQNNSLRAEDTAVYYCAKVTISCA</u> <u>RRCRCYSADGMDVNGGGTLVTSS</u>
DG8	13	27	41	97	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFTFSDHAMSMYRQAPGKGLHWYSVIS</u> <u>HGNGSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQNNSLRAEDTAVYYCARVASRCR</u> <u>RRCRCYSDDGMDVNGGGTLVTSS</u>
DA9	14	28	42	98	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFTFSNYAMSMYRQAPGKGLHWYSVIS</u> <u>PSDSNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQNNSLRAEDTAVYYCARVTLSCR</u> <u>ASRCYSNGMDVNGGGTLVTSS</u>

Таблица 16

Клон	VL CDR SEQ ID NOs			Вариабельная область легкой цепи VL, аминокислотные последовательности и SEQ ID NO	
	L1	L2	L3	NO	АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
1E4	43	57	71	99	DIVNTQSP LS LPVSLGDOASISCRSSQSLVMSNONTYLNWYLRPGQSPKLLIYKVSNRFP SGV PDRFSGSGSGTDFTLRISRV EA EDLGVYFC SG STHVPATFGGGTKLEIK
9B11	44	58	72	100	DIVNTQSP LS LPVSLGDOASISCRSSQSLVMSNONTYLNWYLRPGQSPKLLIYKVSNRFP SGV PDRFSGSGSGTDFTLRISRV EA EDLGVYFC SG STHVPATFGGGTKLEIK
3A9	45	59	73	101	DIVNTQSPKFMSTSVGDRVSI TC KASQNVOTTVANYGQRPGQSPKLLIYASNR YTGV PDRFSGSGSGTDFTLTISNQSEDLADYFCQ QY SNYPLTFCAGTKLELR
10F10	46	60	74	102	DIVNTQSP LS LPVSLGDOASISCRSSQSLVMSNONTYLNWYLRPGQSPKLLIYKVSNRFP SGV PDRFSGSGSGTDFTLRISRV EA EDLGVYFC SG STHVPATFGGGTKLEIK
11F11	47	61	75	103	DIVNTQSP LS LPVSLGDOASISCRSSQSLVMSNONTYLNWYLRPGQSPKLLIYKVSNRFP SGV PDRFSGSGSGTDFTLRISRV EA EDLGVYFC SG STHVPATFGGGTKLEIK
AC8	48	62	76	104	QSVLTQPPASAGT PG QRTVISCSSSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDSDQ RPSGV PDRFSGSGSGTSASLAI SG LRSEDEADYFC SG MSDASLSAVYVFGGGTKLT VLG
AE8	49	63	77	105	QSVLTQPPASAGT PG QRTVISCSSSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDSDQ RPSGV PDRFSGSGSGTSASLAI SG LRSEDEADYFC SG MSDASLSAVYVFGGGTKLT VLG
AA9	50	64	78	106	QSVLTQPPASAGT PG QRTVISCSSSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDSDQ RPSGV PDRFSGSGSGTSASLAI SG LRSEDEADYFC SG MSDASLSAVYVFGGGTKLT VLG
DG5	51	65	79	107	QSVLTQPPASAGT PG QRTVISCSSSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDSDQ RPSGV PDRFSGSGSGTSASLAI SG LRSEDEADYFC SG MSDASLSAVYVFGGGTKLT VLG
AD2	52	66	80	108	QSVLTQPPASAGT PG QRTVISCSSSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDSDQ RPSGV PDRFSGSGSGTSASLAI SG LRSEDEADYFC SG MSDASLSAVYVFGGGTKLT VLG
AD7	53	67	81	109	QSVLTQPPASAGT PG QRTVISCSSSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDSDQ RPSGV PDRFSGSGSGTSASLAI SG LRSEDEADYFC SG MSDASLSAVYVFGGGTKLT VLG
DG11	54	68	82	110	QSVLTQPPASAGT PG QRTVISCSSSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDSDQ RPSGV PDRFSGSGSGTSASLAI SG LRSEDEADYFC SG MSDASLSAVYVFGGGTKLT VLG
DG8	55	69	83	111	QSVLTQPPASAGT PG QRTVISCSSSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDSDQ RPSGV PDRFSGSGSGTSASLAI SG LRSEDEADYFC SG MSDASLSAVYVFGGGTKLT VLG
DA9	56	70	84	112	QSVLTQPPASAGT PG QRTVISCSSSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDSDQ RPSGV PDRFSGSGSGTSASLAI SG LRSEDEADYFC SG MSDASLSAVYVFGGGTKLT VLG

В одном воплощении данного изобретения вариабельные области тяжелой и легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента, представленные в табл. 1а и 1б, можно скомбинировать различным образом с получением различных антител. Кроме того, вариабельные области тяжелой и легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента, представленные в табл. 1а и 1б, можно свободно комбинировать, не ограничиваясь каким-либо конкретным способом.

Каждая из вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи, описанных в данном документе, может быть связана с различными целевыми константными областями тяжелой цепи и легкой цепи с образованием тяжелой цепи и легкой цепи интактного антитела соответственно. Кроме того, каждая из последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи, связанная с константными областями таким образом, может быть соединена с образованием структуры интактного антитела.

Любая вариабельная область тяжелой цепи и легкой цепи антитела по данному изобретению могут быть связаны по меньшей мере с частью константной области. Константные области могут быть выбраны в зависимости от того, требуется ли антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, антитело-зависимый клеточный фагоцитоз и/или комплемент-зависимая цитотоксичность и т.д. Например, у человека изотипы IgG1 и IgG3 опосредуют комплемент-зависимую цитотоксичность, а изотипы IgG2 и IgG4 не опосредуют цитотоксичность. IgG1 и IgG3 человека также индуцируют клеточно-опосредованную эффекторную функцию сильнее, чем IgG2 и IgG4 человека. Например, вариабельная область тяжелой цепи может связываться с константными областями IgG, включая IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 и IgG4, а вариабельная область легкой цепи может связываться с константной областью каппа или лямбда. Можно использовать соответствующую константную область, например, человеческого или мышиного происхождения.

В одном воплощении вариабельная область тяжелой цепи, описанная в данном документе, может быть связана с константной областью мышиного IgG2a или константной областью человеческого IgG1, как в SEQ ID NO: 113-126 (включают константную область IgG2a мыши) или SEQ ID NO: 127-140 (включают константную область IgG1 человека) соответственно.

В другом воплощении вариабельные области легкой цепи, описанные в данном документе, могут быть связаны с константной областью каппа-цепи мышиного происхождения или константной областью

каппа-цепи человеческого происхождения, как в SEQ ID NO: 141-154 (константная область каппа цепи мышинового происхождения) и SEQ ID NO: 155-168 (константная область каппа цепи человеческого происхождения).

Кроме того, такие последовательности константных областей, которые можно комбинировать с переменными областями, описанными в данном документе, приведены в качестве примера, и специалисту в области техники известно, что можно использовать и другие константные области, включая константные области, которые модифицированы в целях стабильности, экспрессии, продуцируемости или других целевых свойств.

Данное изобретение охватывает одну или несколько аминокислотных последовательностей, имеющих существенную идентичность последовательности одной или нескольким аминокислотным последовательностям, изложенным в данном документе. Существенная идентичность означает сохранение описанных в данном документе эффектов при наличии вариации последовательностей. В одном воплощении идентичность с переменными областями тяжелой цепи, приведенными в табл. 1а, составляет приблизительно 90, 95 или 99%. В другом воплощении идентичность с переменными областями легкой цепи, приведенными в табл. 1б, составляет приблизительно 90, 95 или 99%. Например, в случае вариантов, обладающих идентичностью 90, 95 или 99% с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по данному изобретению, вариация затрагивает каркасные или переменные участки, а не CDR.

В данном документе изложена нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению или его часть. Нуклеиновая кислота охватывает праймеры для ПЦР или анализа последовательности, использованные для амплификации, исследования, анализа или создания мутантов полинуклеотида, кодирующего каждую цепь антитела или фрагмента антитела, его мутанта, производного или варианта, полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи или тяжелой цепи или только CDR, полинуклеотид, используемый в качестве зонда для гибридизации, и полинуклеотид, кодирующий полипептид. Нуклеиновые кислоты могут иметь любую длину. Например, они могут иметь длину 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000 или 1500 или более полинуклеотидов и/или могут содержать одну или более чем одну дополнительную последовательность, например регуляторные последовательности, и/или могут быть нуклеиновыми кислотами большего размера, например частью вектора. Нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или двуцепочечной и может содержать РНК и/или ДНК полинуклеотид и его искусственный вариант (например, пептидную нуклеиновую кислоту).

В одном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его фрагмент по данному изобретению, представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую CDR, описанный в данном документе, переменную область, содержащую CDR, полноразмерное антитело, содержащее переменную область и константную область. Если установлена аминокислотная последовательность, можно также установить последовательность нуклеиновой кислоты, с учетом известного принципа обратной транскрипции, использования кодонов и т.д. Приведенная в качестве примера последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой SEQ ID NO: 169-182 (тяжелая цепь, включающая константную область IgG2a мыши), SEQ ID NO: 83-196 (тяжелая цепь, включающая константную область IgG1 человека), SEQ ID NO: 197-210 (легкая цепь, включающая константную область каппа-цепи мышинового происхождения) и SEQ ID NO: 211-224 (легкая цепь, включающая константную область каппа-цепи человеческого происхождения).

Данное изобретение также охватывает одну или несколько нуклеиновокислотных последовательностей, существенно идентичных одной или более чем одной нуклеиновокислотной последовательности, изложенной в данном документе. Существенная идентичность означает, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент, кодируемые нуклеиновой кислотой, сохраняют эффект, описанный в данном изобретении, даже при наличии консервативных замен или аминокислотных вариаций, где вариация нуклеиновой кислоты не сопровождается заменой аминокислоты.

Специфичность и аффинность антитела к агрегату

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению, в частности, обладает специфичностью и высокой аффинностью к агрегату α -синуклеина. В одном воплощении согласно фиг. 6 аффинность к агрегату выражается K_D $1,0 \times 10^{-9}$ М или менее; в другом воплощении K_D $1,0 \times 10^{-10}$ М или менее; в еще одном воплощении K_D $1,0 \times 10^{-11}$ М или менее. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению, обладающие высокой аффинностью, имеют то преимущество, что их можно вводить в более низком количестве по сравнению с антителом, имеющим низкую аффинность, например, аффинность 10^{-7} или 10^{-8} М. Это не ограничивает антитело, но, например, поскольку достаточная эффективность может достигаться при более простом способе введения, таком как подкожная инъекция, это является большим преимуществом при клиническом использовании.

Кроме того, антитело и его антигенсвязывающий фрагмент, обладающие высокой аффинностью к агрегату α -синуклеина, могут ингибировать и/или уменьшать образование и/или накопление агрегатов α -синуклеина и/или внутриклеточный транспорт, тем самым снижая концентрацию агрегатов в головном мозге. Кроме того, антитело и антигенсвязывающие фрагменты с высокой аффинностью к агрегату α -

синуклеина, могут уменьшать образование агрегатов α -синуклеина за пределами центральной нервной системы, в результате чего снижается концентрация агрегатов в центральной нервной системе, изменяется состояние равновесия форм α -синуклеина на границе гематоэнцефалического барьера. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, авторы изобретения полагают, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению могут ингибировать образование агрегатов путем удаления мономеров или удаления как мономеров, так и агрегатов.

Вариабельная область антитела

Данное изобретение относится к вариабельной области легкой цепи антитела или вариабельной области тяжелой цепи антитела, приведенным в табл. 1а и 1б (и соответствующим последовательностям нуклеиновых кислот), включая иммунологически функциональный фрагмент, производное, мутантный белок и вариант вариабельных областей легкой цепи и тяжелой цепи.

Изобретение также охватывает последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие вариабельные области, приведенные в табл. 1а и 1б. Последовательности нуклеиновых кислот не раскрыты дополнительно, поскольку они входят в состав полноразмерного антитела, охарактеризованного SEQ ID NO: 169-182 (тяжелая цепь, включающая константную область IgG2a мыши), SEQ ID NO: 183-196 (тяжелая цепь, включающая константную область IgG1 человека), SEQ ID NO: 197-210 (легкая цепь, включающая константную область каппа-цепи мышинного происхождения) и последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих полноразмерное антитело, изложенных в SEQ ID NO: 211-224 (легкая цепь, включающая константную область каппа-цепи человеческого происхождения). Специалист в области техники может легко получить последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белковые последовательности, на основе аминокислотной последовательности вариабельной области, приведенной в табл. 1.

Антитело, в котором вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи по данному изобретению комбинированы различным образом, могут быть представлены в виде VHx/VLy, где "x" соответствует вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO, а "y" соответствует вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO. В одном воплощении вариабельная область по данному изобретению может включать следующие комбинации, при этом не ограничиваясь ими:

VH85/VL99, VH85/VL100, VH85/VL101, VH85/VL102, VH85/VL103, VH85/VL104, VH85/VL105, VH85/VL106, VH85/VL107, VH85/VL108, VH85/VL109, VH85/VL110, VH85/VL111, VH85/VL112; VH86/VL99, VH86/VL100, VH86/VL101, VH86/VL102, VH86/VL103, VH86/VL104, VH86/VL105, VH86/VL106, VH86/VL107, VH86/VL108, VH86/VL109, VH86/VL110, VH86/VL111, VH86/VL112; VH87/VL99, VH87/VL100, VH87/VL101, VH87/VL102, VH87/VL103, VH87/VL104, VH87/VL105, VH87/VL106, VH87/VL107, VH87/VL108, VH87/VL109, VH87/VL110, VH87/VL111, VH87/VL112; VH88/VL99, VH88/VL100, VH88/VL101, VH88/VL102, VH88/VL103, VH88/VL104, VH88/VL105, VH88/VL106, VH88/VL107, VH88/VL108, VH88/VL109, VH88/VL110, VH88/VL111, VH88/VL112; VH89/VL99, VH89/VL100, VH89/VL101, VH89/VL102, VH89/VL103, VH89/VL104, VH89/VL105, VH89/VL106, VH89/VL107, VH89/VL108, VH89/VL109, VH89/VL110, VH89/VL111, VH89/VL112; VH90/VL99, VH90/VL100, VH90/VL101, VH90/VL102, VH90/VL103, VH90/VL104, VH90/VL105, VH90/VL106, VH90/VL107, VH90/VL108, VH90/VL109, VH90/VL110, VH90/VL111, VH90/VL112; VH91/VL99, VH91/VL100, VH91/VL101, VH91/VL102, VH91/VL103, VH91/VL104, VH91/VL105, VH91/VL106, VH91/VL107, VH91/VL108, VH91/VL109, VH91/VL110, VH91/VL111, VH91/VL112; VH92/VL99, VH92/VL100, VH92/VL101, VH92/VL102, VH92/VL103, VH92/VL104, VH92/VL105, VH92/VL106, VH92/VL107, VH92/VL108, VH92/VL109, VH92/VL110, VH92/VL111, VH92/VL112; VH93/VL99, VH93/VL100, VH93/VL101, VH93/VL102, VH93/VL103, VH93/VL104, VH93/VL105, VH93/VL106, VH93/VL107, VH93/VL108, VH93/VL109, VH93/VL110, VH93/VL111, VH93/VL112; VH94/VL99, VH94/VL100, VH94/VL101, VH94/VL102, VH94/VL103, VH94/VL104, VH94/VL105, VH94/VL106, VH94/VL107, VH94/VL108, VH94/VL109, VH94/VL110, VH94/VL111, VH94/VL112; VH95/VL99, VH95/VL100, VH95/VL101, VH95/VL102, VH95/VL103, VH95/VL104, VH95/VL105, VH95/VL106, VH95/VL107, VH95/VL108, VH95/VL109, VH95/VL110, VH95/VL111, VH95/VL112; VH96/VL99, VH96/VL100, VH96/VL101, VH96/VL102, VH96/VL103, VH96/VL104, VH96/VL105,

VH96/VL106, VH96/VL107, VH96/VL108, VH96/VL109, VH96/VL110, VH96/VL111, VH96/VL112;
 VH97/VL99, VH97/VL100, VH97/VL101, VH97/VL102, VH97/VL103, VH97/VL104, VH97/VL105,
 VH97/VL106, VH97/VL107, VH97/VL108, VH97/VL109, VH97/VL110, VH97/VL111, VH97/VL112;
 VH98/VL99, VH98/VL100, VH98/VL101, VH98/VL102, VH98/VL103, VH98/VL104, VH98/VL105,
 VH98/VL106, VH98/VL107, VH98/VL108, VH98/VL109, VH98/VL110, VH98/VL111 или VH98/VL112.

Различные комбинации переменных областей, как указано выше, могут использоваться в виде интактного антитела и различных форм антител, включая scFV и т.д.

CDR

Антитело по данному изобретению представляет собой полипептид, в котором один или более чем один CDR привиты, встроены и/или присоединены. В одном воплощении антитело может иметь 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR. Так, антитело может иметь, например, один CDR1 тяжелой цепи ("CDRH1"), и/или один CDR2 тяжелой цепи ("CDRH2"), и/или один CDR3 тяжелой цепи ("CDRH3"), и/или один CDR1 легкой цепи ("CDRL1"), и/или один CDR2 легкой цепи ("CDRL2"), и/или один CDR3 легкой цепи ("CDRL3").

Положение аминокислотных последовательностей, соответствующих гипервариабельной области (CDR) и каркасной области (FR) антитела в составе вариабельной области, можно определять по системе Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991)

CDR, входящие в состав тяжелой цепи и легкой цепи антитела по данному изобретению, приведены и табл. 1а, 1б (или CDR H1 тяжелой цепи представлен SEQ ID NO: 1-14, CDR H2 тяжелой цепи представлен SEQ ID NO: 15-28, CDR H3 тяжелой цепи представлен SEQ ID NO: 29-42, CDR L1 легкой цепи представлен SEQ ID NO: 43-56, CDR L2 легкой цепи представлен SEQ ID NO: 57-70, CDR L3 легкой цепи представлен SEQ ID NO: 71-84).

Данное изобретение также охватывает одну или несколько аминокислотных последовательностей, существенно идентичных аминокислотным последовательностям одного или более чем одного CDR, представленных в табл. 1а, 1б. Существенная идентичность означает сохранение описанных в данном документе эффектов при наличии вариации последовательностей.

Структура и свойства CDR антитела природного происхождения являются такими, как описано выше. Так, в обычном антителе CDR встроены в каркасные области вариабельных участков тяжелой цепи и легкой цепи и представляют собой область, которая участвует в связывании и распознавании антигена. Вариабельная область содержит по меньшей мере 3 CDR тяжелой цепи или легкой цепи в каркасной области (Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD; or Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 1987, 196:901-917; Chothia et al. 1989, Nature 1989, 342:877-883). CDR, изложенные в данном документе, определяют структуру антигенсвязывающего домена типичного антитела и, кроме того, как описано в данном документе, могут использоваться в составе различных других полипептидных структур.

Специалисту в области техники понятно, что, когда антитело содержит один или более чем один CDR по данному изобретению, каждый из CDR по данному изобретению может быть выбран независимо от других, и они могут быть скомбинированы друг с другом. Так антитело может иметь 1, 2, 3, 4, 5 или 6 независимо выбранных CDR. Кроме того, специалисту в области техники известно, что, когда CDR выбирают для комбинирования, CDR одного вида не используют несколько раз, например обычно не создают антитело, содержащее две области CDRH2.

Моноклональные антитела

Антитело по данному изобретению охватывает моноклональное антитело, связывающееся с α -синуклеином, в частности с агрегатом α -синуклеина. Моноклональное антитело может быть получено с применением любой известной в области техники методики.

Кроме того, моноклональное антитело может быть получено с применением любой известной в области техники методики. Например, оно может быть получено путем иммортализации спленоцитов, собранных у иммунизированного трансформированного животного. Спленоциты могут быть иммортализованы с применением любой известной в области техники методики, например, путем их слияния с клетками миеломы для создания гибридомы. Клетки миеломы, которые применяют для слияния в процессе создания гибридомы, предпочтительно не являются антитело-продуцирующими, отличаются высокой эффективностью слияния и не способны расти в специальной селективной среде, в которой нет определенных ферментов и которая поддерживает рост только целевых слитых клеток (гибридомы). Примеры клеточных линий, подходящих для слияния с клетками мыши, включают Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC11, MPC11-X45-GTG 1.7 и S194/5XXO Bul, а примеры клеточных линий, используемых для слияния с клетками крысы, включают R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F и 4B210. Другими клеточными линиями, которые можно применять для слияния с клетками, могут быть U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 и UC729-6.

В некоторых случаях гибридные клеточные линии получают путем сбора спленоцитов у животного (например, трансформированного животного, имеющего последовательности иммуноглобулина

человека, иммунизированного иммуногеном α -синуклеином); слияния собранных спленоцитов с клетками миеломы с получением клеток гибридомы; получения стабильной гибридомной клеточной линии из клеток гибридомы и выявления гибридомной клеточной линии, продуцирующей антитело, связывающееся с α -синуклеином.

Моноклональное антитело, секретируемое гибридомной клеточной линией, может быть очищено с применением известной в области техники методики.

Химерные и гуманизированные антитела

Антитело также может быть модифицировано различными способами для различных целей. Можно получить химерное антитело и гуманизированное антитело. Химерное антитело представляет собой антитело, образованное из иммунологически функциональной легкой цепи, тяжелой цепи или их фрагментов, где полипептидные фрагменты происходят из различных антител и связаны ковалентными связями. Как правило, часть легкой цепи и/или тяжелой цепи химерного антитела представляет собой последовательность, относящуюся к определенному биологическому виду или определенному классу или подтипу, а остальная часть последовательности относится к другому биологическому виду или другому классу или подтипу. Способ получения химерного антитела описан, например, в патенте US 4816567 и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855. Пересадка CDR описана, например, в патентах US 6180370, 5693762, 5693761, 5585089 и 5530101.

Как правило, целью создания химерного антитела является максимизация числа аминокислот, обнаруживаемых в организме, в котором будет применяться антитело. Одним из примеров является антитело с "привитыми CDR", где антитело содержит один или более чем один CDR, происходящий из антитела определенного биологического вида или антитела определенного класса или подтипа, а остальная часть происходит из антитела другого биологического вида или антитела другого класса или подтипа.

Например, для применения у человека, варибельная область или CDR человеческого антитела природного происхождения может быть заменена варибельной областью или выбранным CDR мышиного антитела, привитыми на человеческое антитело, или наоборот.

Наиболее практически пригодным типом химерного антитела является "гуманизированное" антитело. Как правило, гуманизированные антитела получают из моноклональных антител, исходно образованных в организме животных, не являющихся человеком. В таком моноклональном антителе конкретный аминокислотный остаток, обычно входящий в состав части антитела, не участвующей в распознавании антигена, модифицируют таким образом, чтобы он был гомологичен соответствующему остатку человеческого антитела соответствующего изотипа. Гуманизацию можно осуществлять различными известными способами, например, путем замены по меньшей мере части варибельной области антитела мышиного происхождения соответствующей областью человеческого антитела (патенты US 5585089 и 5693762; Jones et al., Nature 1986, 321: 522-525; Riechmann et al., Nature 1988, 332: 323-27; Verhoeyen et al., Science 1988, 239: 1534-1536).

В одном аспекте CDR варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи антител по данному изобретению имплантированы в каркасные области (FR) антител, по филогенетическому происхождению относящихся к одному или к разным биологическим видам. Например, CDR варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи, описанные в данном документе, могут быть трансплантированы в консервативные FR человеческого происхождения. Для создания консервативных FR человеческого происхождения консенсусные аминокислотные последовательности FR могут быть получены путем выравнивания нескольких типов аминокислотных последовательностей тяжелых цепей человеческого происхождения или аминокислотных последовательностей легких цепей человеческого происхождения и выведения консервативной последовательности по выровненным последовательностям. В других воплощениях FR тяжелой цепи или легкой цепи, описанные в данном документе, заменены на FR другой тяжелой цепи или легкой цепи. В аспекте изобретения, при том что определенные аминокислоты, обнаруживаемые в FR тяжелой цепи и легкой цепи антитела к α -синуклеину, не замещаются, оставшиеся аминокислоты FR могут быть замещены. Определенные аминокислоты обычно представляют собой аминокислоты, присутствующие в положении, которое отсутствует в FR. В альтернативном варианте варибельную область, привитую с одной тяжелой цепи или легкой цепи, можно использовать с константной областью, которая отличается от константной области конкретной тяжелой цепи или легкой цепи, изложенных в данном документе. В других воплощениях привитая варибельная область может быть частью одноцепочечного антитела scFv. CDR варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи антител по данному изобретению можно применять в трансплантированной форме в любом антителе.

Кроме того, в одном воплощении константную область, происходящую из антител других биологических видов, нежели человек, можно использовать в гибридном антителе с варибельной областью человеческого происхождения.

Полностью человеческие антитела

В данном документе также раскрыты полностью человеческие антитела. Полностью человеческое антитело, специфичное в отношении определенного антигена ("полностью человеческое антитело"),

можно получить без воздействия антигена на человека. Одним способом получения полностью человеческого антитела является "гуманизация" гуморальной иммунной системы мыши. В эндогенный ген Ig неактивированной мыши можно внедрять локусы человеческого иммуноглобулина (Ig) и, таким образом, получать в мышцах полностью человеческое моноклональное антитело (mAb). Применение полностью человеческого антитела позволяет минимизировать иммуногенную реакцию и аллергическую реакцию, которые могут быть вызваны введением человеку мышиногеного или происходящего из организма мыши mAb.

Такое полностью человеческое антитело можно получать путем иммунизации трансформированного животного (обычно мыши), которое может продуцировать человеческое антитело, не продуцируя эндогенный иммуноглобулин. Для этой цели антиген обычно имеет 6 или более последовательных аминокислот и может быть конъюгирован с носителем, например с гаптеном. Например, см. Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555; Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255-258; and Braggermann et al., 1993, Year in Immunol. 7:33. Например, в данном способе трансформированное животное получают путем выключения эндогенных локусов генов иммуноглобулинов мыши, кодирующих тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов, и встраивания локусов, содержащих фрагменты геномной ДНК человека, кодирующие человеческие белки тяжелой цепи и легкой цепи. Путем скрещивания частично модифицированных мышей, содержащих часть локусов генов иммуноглобулинов человека, получают мышь, в которую внедрены все локусы генов иммуноглобулинов человека. Когда животному вводят иммуноген, образуется антитело, иммуноспецифическое в отношении иммуногена, но содержащее вариабельные области, имеющие человеческую аминокислотную последовательность вместо мышинной. Способ описан, например, WO 96/33735 и WO 94/02602. Способ, относящийся к трансформированным мышам для получения человеческих антител, описан, например, в патентах US 5545807; 6713610; 6673986; 6162963; 5545807; 6300129; 6255458; 5877397; 5874299 и 5545806; WO 91/10741, WO 90/04036 и EP 546073 B1.

С использованием гибридной технологии антиген-специфичные человеческие mAb с желаемой специфичностью можно получать в трансгенных мышцах, например, описанных выше, и проводить их отбор. Такие антитела можно клонировать и экспрессировать с помощью соответствующих векторов и клеток-хозяев, либо антитела можно получать из культивируемых клеток гибридом.

Полностью человеческие антитела также можно производить с использованием библиотек фагового дисплея (Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol. 227:381; and Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581). Технология фагового дисплея представляет собой способ, имитирующий иммунный отбор, когда совокупность антител экспонируется на поверхности нитчатого бактериофага, а затем производится отбор фагов, связывающихся с целевым антигеном. Данная методика описана, например, в примерах в данной заявке или в WO 99/10494. В одном воплощении полностью человеческое антитело к α -синуклеину по данному изобретению отбирают при помощи фагового дисплея (Krebbel et al., J. Immunol. Methods. (1997) 201:35].

Биспецифические или бифункциональные антитела

Данное изобретение также относится к антителу, специфически распознающему один или более чем один антиген, помимо α -синуклеина. В одном воплощении антитело, описанное в данном документе, также охватывает биспецифическое или бифункциональное антитело, содержащее один или более CDR или одну или более чем одну вариабельную область, описанные выше. В некоторых случаях биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее 2 различных пары тяжелой цепи/легкая цепь и два различных сайта связывания, и бифункциональное антитело может быть получено различными способами, такими как слияние гибридом или присоединение фрагмента Fab' (Songvilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.).

В одном воплощении, описанном в данном документе, антитело по данному изобретению может быть в форме биспецифического антитела, дополнительно связанного с носителем для доставки через гематоэнцефалический барьер. Один способ доставки лекарств через гематоэнцефалический барьер включает применение естественных систем доставки, таких как переносчики глюкозы и аминокислот, а также рецептор-опосредованного трансцитоза, обеспечиваемого рецептором инсулина или рецептором трансферрина. Примеры рецепторов для рецептор-опосредованного трансцитоза приведены ниже: рецептор инсулина (например, человеческий рецептор инсулина), рецептор трансферрина, LRP (например, LRP1, LRP6 и LRP8), рецептор меланокортина, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, рецептор VACM-1, IGFR, EPCR, EGFR, TNFR, рецептор лептина, M6PR, рецептор липопroteина, NCAM, LIFR, LfR, MRP1, AchR, DTr, переносчик глутатиона, SR-B1, MYOF, TFRC, ECE1, LDLR, PVR, CDC50A, SCARF1, MRC1, HLA-DRA, RAMP2, VLDLR, STAB1, TLR9, CXCL16, NTRK1, CD74, DPP4, рецепторы факторов роста эндотелия 1, 2 и 3, рецептор глюкокортикоидов, ионотропный глутаматный рецептор, рецептор M3, рецептор ароматических углеводов, GLUT-1, рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3), рецептор N-метил-D-аспартата, S1P1, рецептор P2Y, TMEM30A и RAGE.

Различные варианты антител

Антитело, описанное в данном документе, также охватывает вариант антитела, описанного в данном документе. Например, часть антигена содержит консервативные аминокислотные замены одного или более чем одного остатка тяжелой или легкой цепи, вариабельной области или последовательности

CDR, описанных выше. Аминокислоты естественного происхождения можно классифицировать на основании общих свойств боковых цепей следующим образом: 1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; 2) нейтральные, гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; 3) отрицательно заряженные: Asp, Glu; 4) положительно заряженные: His, Lys, Arg; 5) остатки, изменяющие направление цепи: Gly, Pro; и 6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Консервативные аминокислотные замены относятся к заменам на другой остаток, принадлежащий по классификации тому же самому классу. Консервативные аминокислотные замены также могут включать аминокислотные остатки, не встречающиеся в природе, такие как пептидомиметики, и такие остатки обычно внедряют путем химического синтеза, а не с использованием клеток.

Неконсервативные замены включают замены на остаток, относящийся по классификации к другому классу. Такие замены могут быть введены в область антитела, которая гомологична человеческому антителу, или в негомологичную область.

Для введения такой замены в одном воплощении можно принимать во внимание индекс, характеризующий гидрофобность или гидрофильность аминокислоты (индекс гидропатии). Рассчитывают профиль гидрофобности белка (профиль гидропатии), присваивая каждой аминокислоте индекс и затем усредняя данные значения. Каждой аминокислоте присваивают индекс на основании свойств гидрофобности и заряда, как указано ниже: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5).

В области техники известна важность профиля гидрофильности для придания белку биологической функции взаимодействия (Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131). Известно, что конкретную аминокислоту можно заменить другой аминокислотой, имеющей схожее численное значение индекса или балла, при этом может сохраняться схожая биологическая активность. В одном воплощении при осуществлении замены на основании индекса производят замену на аминокислоту с индексом в диапазоне ± 2 , ± 1 или $\pm 0,5$.

Кроме того, замены между схожими аминокислотами можно осуществлять на основании гидрофильности, в частности, когда белок, получаемый в результате замены, представляет собой белок, имеющий иммунологическую активность, описанную в данном документе. В одном воплощении максимальное среднее значение локальной гидрофильности белка, которое определяется гидрофильностью близкой аминокислоты, связано с такими биологическими свойствами белка, как иммуногенность или антигенсвязывающие свойства.

Значения гидрофильности аминокислотных остатков следующие: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспартат (+3,0 $\pm$ 1); глутамат (+3,0 $\pm$ 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5 $\pm$ 1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5) и триптофан (-3,4). В случае замены на основании схожих показателей гидрофильности в одном воплощении производят замену на аминокислоты, у которых значения гидрофильности составляют ± 2 , ± 1 или $\pm 0,5$. Кроме того, на основании гидрофильности можно идентифицировать эпитоп по первичной аминокислотной последовательности. Кроме того, такие области обозначают "кор-области эпитопа".

Примеры консервативных аминокислотных замен показаны в табл. 2.

Таблица 2. Консервативные аминокислотные замены

Исходный остаток	Примеры замен
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Специалист в области техники определит подходящий вариант полипептида, описанного в данном документе, используя известные способы. Специалист в области техники определит сайт, в котором можно осуществить замену без нарушения активности белка, модифицируя область, которая не считается важной для активности полипептида. Специалист в области техники также идентифицирует остаток или участок, которые должны сохраняться у схожих полипептидов. Кроме того, в другом воплощении, в участках, считающихся важными для биологической активности или структуры, можно осуществлять консервативные аминокислотные замены без нарушения биологической активности или отрицательного влияния на структуру полипептида.

Кроме того, специалист в области техники может провести анализ структуры и функции для идентификации остатка, важного для активности или структуры схожего полипептида. В результате такого анализа можно предсказать важный аминокислотный остаток в целевом белке, найдя остаток, соответствующий аминокислотному остатку, играющему важную роль для активности или структуры схожего белка. Специалист в области техники может осуществить замену важного аминокислотного остатка, предсказанного таким образом, на химически схожую аминокислоту.

Кроме того, специалист в области техники может предсказать аминокислотный остаток, связанный с трехмерной структурой антитела, на основании трехмерной структуры схожего полипептида и анализа его аминокислотной последовательности. Специалисты в области техники не осуществляют быструю замену, так как аминокислотный остаток, согласно расчетам располагающейся на поверхности белка, может быть вовлечен в важное взаимодействие с другой молекулой. Более того, специалист в области техники может протестировать варианты, содержащие замену единственной аминокислоты в каждом целевом аминокислотном остатке. Затем проводят скрининг таких вариантов по способности связывать антиген, тем самым собирая информацию о том, какая аминокислотная замена соответствует целям. С использованием такой информации специалист в области техники может легко определить положение, в котором осуществить замену, или положение, в котором следует избегать замен.

Кроме того, положение, в котором осуществить замену, можно определить на основании вторичной структуры белка. Например, одним способом предсказания вторичной структуры является гомологиче-

ское моделирование. Например, 2 полипептида или белка, имеющие последовательности, идентичные более чем на 30% или схожие более чем на 40%, могут иметь схожую структуру (Holm et al., 1999, Nucl. Acid. Res. 27:244-247). Другие способы предсказания вторичной структуры включают "тридинг" ("threading", моделирование на основе слабой гомологии) (Jones, 1977, Curr. Opin. Struct. Biol. 7:377-387; Sippl et al., 1996, Structure 4:15-19), "анализ профиля" (Bowie et al., 1991, Science 253:164-170; Gribskov et al., 1990, Meth. Enzym. 183:146-159; Gribskov et al., 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. 84:4355-4358) и "эволюционные связи" (Holm, 1999, *ibid*; and Brenner, 1997, *ibid*).

В некоторых воплощениях аминокислотная замена приводит к (1) уменьшению подверженности белка деградации, (2) уменьшению подверженности окислению, (3) модификации аффинности связывания для формирования белкового комплекса, (4) модификации аффинности связывания с антигеном и/или (5) модификации для придания белку других физико-химических или функциональных свойств. Например, замена одной или нескольких аминокислот, включая консервативные замены, может представлять собой замену не в домене, участвующем в межмолекулярном контакте, а в других частях. В этом воплощении можно применять консервативную аминокислотную замену, которая не изменяет существенным образом структурные свойства родительской последовательности, например замену одной или более аминокислот, которые не изменяют вторичную структуру антитела. Примеры вторичной и третичной структур полипептидов, известные в области техники, приведены, например, в документах *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed.), 1984, W. H. New York: Freeman and Company; *Introduction to Protein Structure* (Branden and Tooze, eds.), 1991, New York: Garland Publishing; and Thornton et al., 1991, Nature 354:105).

Другие предпочтительные варианты антител включают варианты, последовательность которых имеет делецию одного или более чем одного остатка цистеина или замену остатка цистеина на другие аминокислоты, такие как серин, в родительской последовательности. Вариант, модифицированный по цистеину, в частности, представляет собой структуру, где антитело обладает биологической активностью, и является полезным при необходимости сворачивания заново. Вариант, модифицированный по цистеину, может иметь меньшее количество остатков цистеина по сравнению с родительским антителом и, как правило, может иметь их четное количество для минимизации взаимодействия цистеинов, не имеющих пары.

Тяжелая цепь и легкая цепь, переменные области и CDR, описанные в данном документе, могут применяться для получения полипептида, содержащего антигенсвязывающую область, способную специфически связываться с α -синуклеином. Например, одна или более чем одна CDR, приведенные в табл. 1a-1b, могут быть нековалентно или ковалентно связаны с молекулой, такой как полипептид, и, таким образом, могут применяться в качестве иммуногенной адгезивной молекулы. Такая иммуногенная адгезивная молекула может быть такой, где CDR интегрирован в крупный полимер, или такой, где CDR связан с другим полипептидом. Такая иммуногенная адгезивная молекула обеспечивает специфическое связывание с антигеном, являющимся мишенью для связанного с ней полипептида, или с другим веществом, например с α -синуклеином или с эпитопом.

Также предложены пептидомиметики на основе переменной области и CDR, описанных в данном документе. Миметик может представлять собой пептид, вещество непептидной природы или комбинацию пептида и вещества непептидной природы, см., например, Fauchere, 1986, Adv. Drug Res. 15:29; Veber and Freidinger, 1985, TINS p. 392; and Evans et al., 1987, J. Med. Chem. 30:1229. Пептидомиметик, схожий по структуре с полезным полипептидом, оказывает влияние, схожее с оригинальным полипептидом. Такое соединение можно получить с использованием молекулярного моделирования. Как правило, пептидомиметик структурно схож с антителом, демонстрирующим способность специфически связываться с α -синуклеином, однако в нем одна или более пептидных связей могут быть заменены связями, выбранными из $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}-\text{CH}-$ (цис и транс), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ и CH_2SO , способом, широко известным в области техники. Для получения более стабильного белка один или более чем один остаток в консервативной последовательности может быть замещен на D-аминокислоту того же типа (например, D-лизин вместо L-лизина). Кроме того, молекула, которая может циклизовать пептид, может вводить с внутренней стороны остаток цистеина, образующий поперечную сшивку, таким образом, образуя пептид, накладывающий ограничения на консервативную последовательность (Rizo and Gierasch, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61:387).

В данном изобретении также предложено производное антитела по изобретению. Дериватизированное антитело может включать любую молекулу или вещество, обеспечивающие целевые свойства, например увеличенный период полувыведения антитела или его фрагмента при определенных применениях. Дериватизированное антитело может содержать детектируемый (или меченый) остаток (например, может быть связанным с радиоактивной, колориметрируемой, антигенной молекулой или ферментом, детектируемой частицей (например, магнитной или электронно-плотной (например, золотой) частицей) или с другими молекулами (например, биотином или стрептавидином), остатком терапевтического или диагностического назначения (например, радиоактивным, цитотоксическим или фармацевтически активным остатком) или молекулой, увеличивающей пригодность антитела для специальных применений (на-

пример, введения субъекту, например, человеку, или другим применениям *in vivo* или *in vitro*). Примеры молекул, которые можно использовать для дериватизации антитела, включают альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин) и полиэтиленгликоль (ПЭГ). Связанные с альбумином и пегилированные производные антитела могут быть получены с применением любой методики, широко известной в области техники. Одно воплощение охватывает пегилированный одноцепочечный полипептид. В другом воплощении антитело может быть конъюгировано или связано с транстиретином (ТТР) или вариантом ТТР. ТТР или вариант ТТР могут быть химически модифицированы при помощи химических веществ, выбранных из группы, например, состоящей из декстрана, поли(п-винилпирролидона), полиэтиленгликоля, гомополимера пропиленгликоля, сополимера полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксипропиленового полиола и поливинилового спирта.

Другие производные включают ковалентно присоединенный или агрегирующий конъюгат белка, связывающего α -синуклеин, с другим белком или полипептидом, который можно получить, например, путем экспрессии рекомбинантного слитого белка, содержащего гетерогенный полипептид, слитый с N-концом или C-концом белка α -синуклеина. Например, конъюгированный пептид может представлять собой гетерогенный сигнальный (или лидерный) полипептид, например, альфа-фактор дрожжей, или пептид, например эпитопную метку. Слитый белок, содержащий антитело к α -синуклеину, может содержать пептид, добавленный для облегчения очистки или обнаружения белка, связывающегося с α -синуклеином (например, поли-гистидиновую метку). Белок, связывающийся с α -синуклеином, также может быть связан с пептидом FLAG, как описано Hopp et al., 1988, *Bio/Technology* 6:1204 и в патенте US 5011912. Пептид FLAG обладает превосходной антигенностью и поэтому действует как эпитоп для обратимого связывания со специфичным моноклональным антителом (mAb), тем самым обеспечивая быстрое обнаружение и легкую очистку рекомбинантного белка.

Одно воплощение относится к олигомеру, содержащему множество связывающихся с α -синуклеином полипептидов, связанных посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий с остатками пептида, слитого с белком, связывающим α -синуклеин. Такой связываемый пептид может представлять собой пептидный линкер (спейсер) или лейциновую застежку, обладающую свойством облегчать олигомеризацию. В одном воплощении олигомер содержит 2 или 4 белка, связывающих α -синуклеин. Остаток белка, связывающего α -синуклеин, в составе олигомера может быть в любой вышеупомянутой форме, например в форме варианта или фрагмента. Предпочтительно олигомер содержит связывающий α -синуклеин белок, обладающий α -синуклеин-связывающей активностью.

В одном воплощении олигомер получают с применением полипептида, происходящего из иммуноглобулина. Получение слитого белка, содержащего гетерогенные полипептиды, слитые с различными сайтами (включая Fc домен) полипептида-производного антитела описано, например, Ashkenazi et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535; Byrn et al., 1990, *Nature* 344:677; и Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, страницы 10.19.1-10.19.11.

Другие воплощения относятся к димеру, содержащему 2 слитых белка, в которых α -синуклеин-связывающий белок слит с Fc областью антитела. Димер может быть получен путем встраивания гибридного гена, кодирующего слитый белок, в соответствующий вектор экспрессии, экспрессирования гибридного гена в клетке-хозяине, трансформированной рекомбинантным вектором экспрессии, и обеспечения возможности схожего объединения экспрессированного слитого белка с молекулой антитела, при этом сборка димера осуществляется в результате образования межцепочных дисульфидных связей между остатками Fc.

Термин "полипептид Fc" в данном описании представляет собой полипептид, происходящий из Fc области антитела, и включает формы дикого типа или мутантные формы. Термин также охватывает усеченную форму полипептида, содержащего шарнирный участок, облегчающий димеризацию. Слитый белок, содержащий Fc, или образованный из него олигомер имеют преимущество в том, что их легко разделять при помощи аффинной хроматографии с использованием колонок с белком А или с белком G.

Примеры соответствующих полипептидов Fc описаны, например, в патентах US 5426048 и 5262522, 5457035 и Baum et al., 1994, *EMBO J.* 13:3992-4001. В аминокислотной последовательности такого мутантного белка произведена замена 19 аминокислотного остатка дикого типа Leu на Ala, 20 аминокислотного остатка Leu на Glu и 22 аминокислотного остатка Gly на Ala. У мутантного белка аффинность к Fc рецептору снижена.

В другом воплощении переменная область тяжелой цепи и/или легкой цепи связывающего α -синуклеин белка, описанного в данном документе, может быть замещена и включать переменную область тяжелой цепи и/или легкой цепи другого антитела.

Метки и эффекторные группы

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению могут содержать одну или более чем одну метку. "Метка" означает любое детектируемое вещество. Примеры соответствующих метящих групп включают радиоактивный изотоп или радионуклид (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентную группу (например, FITC, родамин, флуо-

ресцентный субстрат лантаноид), ферментативную группу (например, пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентную группу, биотинилированную группу или некоторые полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательность лейциновой застёжки, сайт связывания вторичного антитела, связывающийся с металлом домен, эпитопная метка), но не ограничиваются ими. В некоторых воплощениях метящая группа присоединена к антителу посредством спейсеров различной длины для уменьшения возможных стерических затруднений. В области техники известны различные способы мечения белка, и специалист в области техники выберет подходящую метку и соответствующий способ для конкретной задачи.

Термин "эффекторная группа" представляет собой вещество, которое должно быть связано или конъюгировано с антителом или веществом для выполнения функции цитотоксического агента. Примеры соответствующих веществ для лечения включают радиоактивные вещества для лечения, такие как радиоактивный изотоп или радионуклид (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I). В некоторых воплощениях эффекторная группа присоединена к антителу посредством спейсеров различной длины для уменьшения возможных стерических затруднений.

Как правило, метки классифицируют в соответствии со способами определения: а) радиоактивная или изотопная метка; б) магнитная метка (например, магнитная частица); в) остаток с окислительно-восстановительной активностью; г) оптический краситель; ферментативная группа (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза); д) биотинилированная группа и е) некоторые полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательность лейциновой застёжки, сайт связывания вторичного антитела, связывающийся с металлом домен, эпитопная метка и т.д.). В некоторых воплощениях метящая группа присоединена к антителу посредством спейсеров различной длины для уменьшения возможных стерических затруднений. В области техники известны различные способы мечения белка.

В одном воплощении метка содержит оптический краситель, включая хромофор, фосфор и флуоресцентное вещество, без ограничения. Флуоресцентное вещество может представлять собой низкомолекулярное флуоресцентное вещество или флуоресцентный белок.

"Флуоресцентная метка" означает любую молекулу, которая будет детектироваться благодаря флуоресцентным свойствам вещества. Примеры флуоресцентных меток включают флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метил-кумарин, пирен, малахитовый зеленый, стилбен, люцифер желтый, каскад синий J, тexasский красный, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC красный 640, Cy 5, Cy 5.5, LC красный 705, Oregon green, краситель alexa-fluor (alexa-fluor 350, alexa-fluor 430, alexa-fluor 488, alexa-fluor 546, alexa-fluor 568, alexa-fluor 594, alexa-fluor 633, alexa-fluor 647, alexa-fluor 660, alexa-fluor 680), каскад синий, каскад желтый и R-фикоэритрин (PE), FITC, Cy5, Cy5.5 и Cy7 и т.д., но не ограничиваются ими. Различные оптические красители описаны в документе *Molecular Probes Handbook*, Richard P. Haugland.

Метки, представляющие собой флуоресцентные белки, включают зеленые флуоресцентные белки, включая GFP видов *Renilla*, *Ptilosarcus* или *Aequorea* (Chalfie et al., 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Labs., Inc., Genbank Accession Number U55762), синие флуоресцентные белки (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc., Quebec, Canada; Stauber, 1998 *Biotechniques* 24:462-471; Heim et al., 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), усиленные желтые флуоресцентные белки (EYFP, Clontech Labs., Inc.), люциферазу (Ichiki et al., 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β галактозидазу (Nolan et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607), но не ограничиваются ими.

Нуклеиновые кислоты

В одном аспекте данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, спаренной с нуклеиновой кислотой по изобретению при определенных условиях гибридизации. Способ гибридизации нуклеиновых кислот хорошо известен в области техники. Например, описан в документе *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Так, при гибридизации в жестких условиях применяют раствор для предварительного промывания, содержащий 5х хлорид натрия/цитрат натрия (SSC), 0,5% SDS, 1,0 мМ EDTA (pH 8,0); буфер для гибридизации, включающий приблизительно 50% формамид, 6х SSC, а температура гибридизации составляет 55°C (или другой схожий раствор для гибридизации, например, раствор, содержащий приблизительно 50% формамид, а температура гибридизации составляет 42°C), а промывание проводят при 60°C с помощью 0,5х SSC, 0,1% SDS. Строгие условия гибридизации представляют собой гибридизацию в 6х SSC при 45°C) а затем в 0,1х SSC при 68°C) с одним или более чем одним промыванием в 0,2% SDS. Кроме того, специалист в области техники выберет подходящие условия гибридизации, необходимые для того, чтобы нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, идентичные по меньшей мере на 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, сохранялись в гибридизованном состоянии.

Основные параметры, влияющие на выбор условий гибридизации и соответствующие условия, описаны, например, в документе Sambrook, Fritsch, and Maniatis, (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., above; and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., section 2.10 and 6.3-6.4. Специалист в области

техники может легко установить такие условия, например, на основании длины и/или состава оснований (конфигурации A, G, C и T (U)) нуклеиновых кислот и т.д.

Раскрытая в данном документе нуклеиновая кислота также охватывает мутантный вариант. Изменение аминокислотной последовательности полипептида (антитела или производного антитела), кодируемого нуклеиновой кислотой, может быть результатом мутации нуклеиновой кислоты. Мутация может быть внедрена любым известным в области техники способом. Например, можно использовать способ направленного мутагенеза, случайного мутагенеза. Среди нуклеиновых кислот, полученных таким образом, отбирают те, которые кодируют полипептид, обладающий целевыми свойствами.

Введение мутации в нуклеиновую кислоту может не сопровождаться существенным изменением биологической активности полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой. Например, можно осуществить нуклеотидную замену, которая вызывает аминокислотную замену в аминокислотном остатке, который не является существенным. В альтернативном варианте в нуклеиновую кислоту можно внедрить одну или более чем одну мутацию, которые избирательно изменяют биологическую активность полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой. Например, мутация может изменять биологическую активность количественно или качественно. Примеры количественных изменений включают увеличение, снижение или устранение активности. Примеры качественных изменений включают изменение специфичности антитела к антигену. В воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая любое антитело или его фрагмент по данному изобретению, может быть мутирована с применением способа молекулярной биологии, широко известного в области техники, таким образом, что произойдет модификация аминокислотной последовательности.

Кроме того, в другом аспекте данное изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, подходящей для применения в качестве праймера или гибридизующегося зонда для обнаружения последовательности нуклеиновой кислоты по данному изобретению. Нуклеиновая кислота может содержать часть последовательности полноразмерной нуклеиновой кислоты, например фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующей полноразмерный полипептид, или фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующей активную часть полипептида (часть, связывающую α -синуклеин), для применения в качестве зонда или праймера.

Праймер и зонд, полученные на основе последовательности нуклеиновой кислоты, могут применяться для определения транскриптома или полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой по данному изобретению или схожей нуклеиновой кислотой. В одном воплощении данный зонд может применяться для обнаружения клетки, экспрессирующей полипептид по данному изобретению. Праймер или зонд могут быть мечены такой меткой как радиоактивный изотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента.

Кроме того, в другом аспекте данного изобретения предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид или его часть (например, фрагмент, содержащий одну или более чем одну CDR или один или более чем один домен варибельной области) по данному изобретению. Примеры векторов включают плазмиду, вектор на основе вируса, неэписомный вектор для млекопитающих и (рекомбинантный) вектор экспрессии и т.д., без ограничения. Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать подходящую форму нуклеиновой кислоты для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Рекомбинантный вектор экспрессии содержит одну или более чем одну регуляторную последовательность в зависимости от клетки-хозяина, которую предполагается использовать для экспрессии, и такие регуляторные последовательности функционально связаны с последовательностью нуклеиновой кислоты, которую следует экспрессировать. Регуляторные последовательности включают, например, ранний энхансер гена SV40, промотор, такой как промотор вируса саркомы Рауса и промотор цитомегаловируса, которые могут контролировать экспрессию нуклеотидной последовательности в клетках-хозяевах разных типов; или, например, тканеспецифичную регуляторную последовательность, которая контролирует экспрессию нуклеотидной последовательности только в определенной клетке-хозяине (Voss et al., 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287, Maniatis et al., 1987, Science 236:1237), и промотор металлотioneина, работающий в клетках млекопитающих, и тетрациклин-активируемый и/или стрептомицин-активируемый промотор, работающий как в прокариотических, так и в эукариотических системах, регулирующий индуцибельную экспрессию нуклеотидной последовательности в ответ на определенное воздействие или условия. Специалисты в области техники выберут соответствующий вектор и регуляторную последовательность, с учетом таких факторов как тип клетки-хозяина, которую следует трансформировать, степень экспрессии целевого белка. Выбранный вектор экспрессии может быть доставлен в клетку-хозяина и может использоваться для продукции белка, кодируемого нуклеиновой кислотой, описанной в данном документе.

В другом аспекте данного изобретения предложена клетка-хозяин, в которую введен рекомбинантный вектор экспрессии. Клетка-хозяин может быть любой прокариотической (например, *E. coli*) или эукариотической клеткой (например, клеткой дрожжей, насекомого или млекопитающего). ДНК вектора может быть введена в прокариотическую или эукариотическую клетку при помощи известного метода трансформации или трансфекции. Известно, что в случае стабильной трансфекции клеток млекопитающего только небольшое число клеток может интегрировать в свой геном ДНК, доставленную при трансфекции, в зависимости от типа использованного вектора экспрессии и способа трансформации. Поэтому

для обнаружения и отбора трансфицированной клетки в клетку-хозяина наряду с целевым геном обычно вводят ген, кодирующий селективируемый маркер, такой как маркер устойчивости к антибиотику. Предпочтительные селективируемые маркеры включают, например, придающие устойчивость к лекарствам, например, G418, гигромицину и метотрексату. Отбор клетки, в которую стабильно введена целевая нуклеиновая кислота, может осуществляться путем отбора клеток, выживших при воздействии лекарства.

Получение антитела

Антитело, не являющееся человеческим, может происходить, например, из любого животного, продуцирующего антитела, например мыши, крысы, кролика, козы, осла или нечеловекообразных приматов (например, обезьян, таких как яванский макак или макака резус) или антропоидов (например, шимпанзе). Антитело, не являющееся человеческим, может быть получено путем иммунизации животного способом, известным в области техники. Антитело может быть поликлональным, моноклональным или может быть синтезировано в клетке-хозяине, экспрессирующей рекомбинантную ДНК. Полностью человеческое антитело может быть получено путем введения антигена трансформированному животному, содержащему локусы генов иммуноглобулинов человека, или взаимодействия библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей совокупность человеческих антител, с антигеном и последующего отбора антитела, представляющего интерес.

Моноклональное антитело (mAb) может быть получено различными способами, включая стандартный способ получения моноклональных антител, например, стандартный способ гибридизации соматических клеток, описанный в документе Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256:495. В альтернативном варианте можно применять, например, способ трансформации В-лимфоцита вирусом или опухолевым геном. В качестве животной системы для производства клеток гибридомы широко применяют мышей. Протокол иммунизации и способ выделения спленоцитов иммунизированной мыши для слияния хорошо известны в области техники. В этом способе осуществляют слияние В-клетки, происходящей из иммунизированной мыши, например, с иммортализованной клеткой-партнером по слиянию, такой как клеточная линия миеломы мыши. При необходимости вместо мыши можно иммунизировать крысу или других млекопитающих, и для получения гибридомы можно осуществлять слияние В-клеток, происходящих от этих животных, с клеточной линией миеломы мыши. В альтернативном варианте для слияния можно использовать линию клеток миеломы животных, отличных от мыши. Процесс слияния для получения такой гибридомы также широко известен.

Единое антитело, описанное в данном документе, может быть получено путем присоединения фрагментов переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи (Fv областей) с помощью аминокислотных швов (коротких пептидных линкеров). Такой одноцепочечный Fv (scFv) может быть получен путем слияния ДНК, кодирующей пептидный линкер, между ДНК, кодирующими полипептиды 2 переменных доменов (V_L и V_H). Полученный полипептид при сворачивании может образовывать антигенсвязывающий мультимер или может образовывать полимер (например, димер, тример или тетрамер) в зависимости от длины гибкого линкера между 2 переменными доменами (Kortt et al., 1997, *Prot. Eng.* 10:423; Kortt et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18:95-108). При комбинировании различных V_L и V_H -содержащих полипептидов может образоваться полимерный scFv, связывающийся с различными эпитопами (Kriangkum et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18:31-40). Кроме того, в следующих документах описан способ получения дополнительного одноцепочечного антитела: патент US 4946778; Bird, 1988, *Science* 242:423; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879; Ward et al., 1989, *Nature* 334:544; de Graaf et al., 2002, *Methods Mol Biol.* 178:379-387. Одноцепочечное антитело, описанное в данном документе, включает scFv, содержащий комбинацию доменов переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, описанных в табл. 1a и 1b, или комбинацию переменных доменов легкой цепи и тяжелой цепи, содержащих CDR, описанных в табл. 1, но не ограничивается ими.

Антитело, описанное в данном документе, также может быть модифицировано в антитело другого подтипа путем переключения класса. Так, IgG антитело может, например, быть получено из IgM антитела, возможно и обратное. Таким способом получают новое антитело, имеющее такие же антигенсвязывающие свойства, как и родительское антитело, но имеющее биологические свойства, характерные для другого подтипа, отличающиеся от родительского антитела. Для такого переключения можно использовать технологию рекомбинантной ДНК. Например, для получения такого антитела можно использовать ДНК, кодирующую константный домен антитела целевого изотипа. См., например, Lantto et al., 2002, *Methods Mol Biol.* 178:303-316. Кроме того, в случае переключения IgG4 для уменьшения склонности к образованию дисульфидных связей в тяжелой цепи, которые могут привести к гетерогенности антител IgG4, может быть предпочтительным введение точечной мутации (CPSCP->CPPCP) в шарнирную область, как описано в документе Bloom et al., 1997, *Protein Science* 6:407.

Таким образом, антитело, описанное в данном документе, содержит комбинацию переменных доменов антитела, изотип которого переключен на целевой (например, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE и IgD).

Кроме того, также известен способ получения антитела, имеющего различные свойства, как антитела, обладающего различной аффинностью к антигену. Таким способом является, например, цепочечный шаффлинг, осуществляемый путем презентации репертуара генов переменного домена иммуноглобулина на поверхности филаментного бактериофага, под названием фаговый дисплей. Дополнительные

способы описаны, например, Marks et al., 1992, BioTechnology 10:779.

Для получения белка, связывающего α -синуклеин, обладающего предпочтительными функциональными и биохимическими свойствами, можно осуществлять консервативные модификации переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, описанных в табл. 1а и 1б, или CDR, описанных в табл. 1б (и соответствующие модификации кодирующей нуклеиновой кислоты) Способ осуществления таких модификаций описан выше.

Антитело к α -синуклеину может быть дополнительно модифицировано различными способами. Например, при использовании в целях терапии для увеличения времени полужизни в сыворотке или улучшенной доставки белка оно может быть конъюгировано с полиэтиленгликолем, а именно пегилировано. В альтернативном варианте переменная область антитела или его фрагмента по данному изобретению могут быть слиты с Fc областью молекулы другого антитела. Fc область, использованная для этой цели, не связывается с комплементом, и поэтому при применении слитого белка в качестве терапевтического агента его модифицируют таким образом, чтобы уменьшить возникновение клеточного лизиса у пациента. Кроме того, антитело или его функциональный фрагмент по данному изобретению может быть конъюгирован с человеческим сывороточным альбумином для улучшения времени полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в сыворотке. Другим используемым партнером по связыванию для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента является транстиретин (ТТР). ТТР обладает способностью образовывать тетрамер, и, таким образом, слитый белок антитело-ТТР может образовывать мультивалентное антитело, у которого avidность связывания с белком увеличена.

В альтернативном варианте существенная модификация функциональных и/или биохимических свойств антитела, описанного в данном документе, может быть достигнута благодаря замене в аминокислотной последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, что существенно влияет, например, (а) на структуру молекулярного остова в месте замены, такую как слой или спираль, (б) степень заряда или гидрофобность в целевом сайте молекулы или (в) размеры боковой цепи.

Специалист в области техники может осуществить аминокислотную замену (консервативную или неконсервативную) антитела по данному описанию, используя стандартный метод. Аминокислотная замена может использоваться для обнаружения важного остатка антитела по данному описанию, или для увеличения или уменьшения аффинности антитела к человеческому α -синуклеину, или для изменения аффинности связывания другого антитела, описанного в данном документе.

Способ экспрессии антитела

Данное изобретение также относится к системе экспрессии и конструкции в форме плазмиды, вектора экспрессии, транскрипционной или экспрессионной кассеты, содержащей по меньшей мере один полинуклеотид, указанный выше, и к клетке-хозяину, содержащей систему экспрессии или конструкцию, а также к способу получения антитела с применением системы экспрессии или клетки-хозяина.

Антитело, описанное в данном документе, может быть получено с применением вышеупомянутого способа. Например, антитело к α -синуклеину можно получать с применением рекомбинантной системы экспрессии согласно способу, известному в области техники, как описано в документе Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al. (eds.) Plenum Press, New York (1980); and Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)

Антитело можно экспрессировать в гибридной клеточной линии или экспрессирующей клеточной линии, отличной от гибридной. Конструкция для экспрессии, кодирующая антитело, может применяться для трансформации клетки хозяина-млекопитающего, насекомого или микроорганизма. Для введения полинуклеотида в клетку-хозяина различными известными способами, указанными выше, может использоваться такая конструкция, как плазида. Детали способов могут различаться в зависимости от типа клетки-хозяина. Способ введения гетерогенного полинуклеотида в клетку млекопитающего широко известен в области техники, и введение может осуществляться, например, посредством декстранопосредованной трансфекции, кальций-фосфатной преципитации, полибрен-опосредованной трансфекции, слияния протопластов, электропорации, капсулирование доставленного полинуклеотида с использованием липосомы, смешивания нуклеиновой кислоты и положительно заряженного липида и непосредственной микроинъекции ДНК в ядро, но не ограничиваться перечисленным.

Рекомбинантная структура для экспрессии обычно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий одно или более из следующего: одну или более чем одну CDR, описанные в данном документе, константную область легкой цепи, переменную область легкой цепи, переменную область тяжелой цепи, константную область тяжелой цепи (например, CH1, CH2 и/или CH3); и/или другую часть остова антитела к α -синуклеину. Последовательность нуклеиновой кислоты встроена в соответствующий вектор экспрессии с применением стандартной методики лигирования. В одном воплощении константная область тяжелой цепи или легкой цепи связана с С-концом переменной области тяжелой цепи или легкой цепи, специфической к α -синуклеину, и лигирована в вектор экспрессии. Вектор выбран таким образом, чтобы функционировать в специфической клетке-хозяине, в которой применяется вектор. Другими словами, вектор должен амплифицировать и/или экспрессировать

ген, содержащийся в векторе, задействуя механизмы клетки-хозяина, которая будет применяться. В одном воплощении вектор применяют с использованием комплементационного анализа фрагментов белков с использованием белкового репортера, например дигидрофолатредуктазы, как описано в патенте US 6270964. Надлежащий вектор экспрессии может быть приобретен из коммерческих источников, например, в такой компании как Life Technologies или BD Biosciences. Примеры других векторов, которые могут применяться для клонирования и экспрессии антитела и фрагмента, можно найти в документе Bianchi and McGrew, 2003, Biotech. Biotechnol. Bioeng. 84:439-44; Methods Enzymol., vol. 185 (D. V. Goeddel, ed.), 1990, New York: Academic Press.

Обычно вектор экспрессии, используемый в любой клетке-хозяине, может содержать основную последовательность, необходимую для поддержания плазмиды, клонирования и экспрессии экзогенной нуклеотидной последовательности. В конкретном воплощении такая основная последовательность обычно содержит одну или более из следующих нуклеотидных последовательностей: промотор, одну или более чем одну последовательность энхансера, ориджин репликации, последовательность терминации транскрипции, полную интронную последовательность, содержащую донорный и акцепторный сайты сплайсинга, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида, сайт связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, область полилинкера для встраивания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который необходимо экспрессировать, и последовательность селективируемого маркера.

Выборочно, вектор может содержать последовательность, кодирующую "метку", иными словами, олигонуклеотидную молекулу, расположенную в направлении 5'- или 3'-конца относительно последовательности, кодирующей белок, связывающий α -синуклеин; олигонуклеотидная последовательность может кодировать полигистидин (например, гексагистидин) или другую "метку", присутствующую в антителе, доступном для приобретения, например FLAG®, HA (гемагглютинин вируса гриппа) или мус. Как правило, указанные метки могут быть слиты с полипептидом и экспрессироваться, служить для аффинной очистки или для определения белка, связывающего α -синуклеин, при его выделении из клетки-хозяина. Аффинную очистку можно осуществлять, например, при помощи колоночной хроматографии с использованием антитела к метке в качестве аффинной матрицы. Выборочно у очищенного белка, связывающего α -синуклеин, можно удалять указанные метки различными способами, включая применение специфической пептидазы.

Вышеупомянутая основная последовательность может быть гомогенной, гетерогенной или гибридной, синтетической или естественной. Так основная последовательность может происходить из любого прокариота или эукариота, любого позвоночного или беспозвоночного, или любого растения, при условии, что она может быть активирована и функционировать в клетке-хозяине.

Подходящая основная последовательность, входящая в состав вектора, может быть получена различными способами, широко известными в области техники. Как правило, основную последовательность, используемую в данном изобретении, предварительно верифицируют путем картирования и/или рестрикционного анализа и, таким образом, ее можно выделить из подходящего источника ткани при помощи соответствующего рестрикционного фермента. В некоторых случаях может быть известна общая нуклеотидная последовательность основной последовательности, и основная последовательность может быть синтезирована с использованием способа синтеза нуклеиновых кислот или клонирования, описанных в данном документе.

Независимо от того, известна ли основная последовательность полностью или частично, основная последовательность может быть собрана при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или скрининга геномной библиотеки с помощью соответствующего зонда, например олигонуклеотида и/или фрагмента основной последовательности из того же самого или другого биологического вида. Если основная последовательность неизвестна, фрагмент ДНК, содержащий основную последовательность, может быть выделен, например, из кодирующей последовательности или даже большего фрагмента ДНК, которая может содержать другой (другие) ген(ы). Целевой фрагмент может быть выделен путем обработки рестрикционным ферментом, очистки в агарозном геле и колоночной хроматографии или другими способами, известными специалистам в области техники. Очевидно, что специалисты в области техники могут выбрать фермент, подходящий для выполнения такой задачи.

Ориджин репликации необходим для амплификации вектора в клетке-хозяине и, как правило, он содержится в доступных для приобретения векторах экспрессии для прокариот. Если выбранный вектор не содержит ориджин репликации, он может быть химически синтезирован на основе известной последовательности и лигирован в вектор. Например, ориджин репликации плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) подходит для большинства грамотрицательных бактерий, а для клонирования вектора в клетке млекопитающих применяют различные ориджины вирусов (например, SV40, вируса полиомы, аденовируса, вируса везикулярного стоматита (VSV) или вируса папилломы, например, HPV или BPV). Для вектора, экспрессируемого в клетках млекопитающих, ориджин репликации, как правило, не требуется (может также применяться, например, ориджин SV40, поскольку он содержит ранний промотор вируса).

Как правило, последовательность терминации транскрипции расположена в направлении 3'-конца от области, кодирующей полипептид, и предназначена для окончания транскрипции. Обычно последовательность терминации транскрипции у прокариот представляет собой фрагмент, богатый G-C, после которого следует последовательность поли-Т. Такая последовательность может быть легко клонирована из библиотеки, или приобретена коммерческим путем, или собрана при помощи метода синтеза нуклеиновых кислот, описанного в данном документе.

Ген селективируемого маркера кодирует белок, необходимый для выживания и роста клетки-хозяина в селективной культуральной среде. Ген типичного селективируемого маркера кодирует белок (а) придающий устойчивость к антибиотикам или иным токсинам, например, в случае прокариотической клетки-хозяина, к ампициллину, тетрациклину или канамицину; (б) компенсирующий дефицит, обусловленный ауксотрофией клетки, или (в) обеспечивающий важными питательными веществами, которые не могут быть получены из комплексной среды или среды определенного состава. В одном воплощении селективируемый маркер представляет собой ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину. Для селекции в прокариотических и эукариотических клетках-хозяевах также может применяться ген устойчивости к неомицину.

Для амплификации гена, который необходимо экспрессировать, также можно применять другой селективируемый маркерный ген. Амплификация представляет собой процесс, в котором ген, требующийся для продуцирования белка, важного для роста или выживания клетки, серийно воспроизводится в хромосоме или рекомбинантной клетке последующего поколения. Примеры селективируемых маркеров, подходящих для клеток млекопитающих, включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) и ген тимидинкиназы, не имеющие промотора. Создают селективное давление на трансформированные клетки млекопитающего, что позволяет выживать только трансформантам, получившим селективируемый ген, присутствующий в векторе. Селективное давление можно создавать, постепенно увеличивая концентрацию селективного агента, содержащегося в среде, и культивируя клетки в условиях, обеспечивающих амплификацию всех генов, кодирующих антитело, связывающееся с α -синуклеином. Так количество полипептида, экспрессируемого амплифицированной ДНК, например антитела, может увеличиваться.

Сайт связывания рибосомы обычно необходим для инициации трансляции мРНК и характеризуется последовательностью Шайн-Дальгарно (прокариоты) или последовательностью Козак (эукариоты). Он обычно расположен в направлении 3' от промотора и в направлении 5' от кодирующей последовательности полипептида, который необходимо экспрессировать.

Когда для системы экспрессии в эукариотической клетке-хозяине требуется гликозилирование, для улучшения гликозилирования или выхода могут быть созданы различные пре- или постпоследовательности. Например, может быть модифицирован сайт расщепления пептидазой определенного сигнального пептида или может быть добавлена пропоследовательность, влияющая на гликозилирование. Конечный белок-продукт может иметь одну или более чем одну дополнительную аминокислоту в положении -1 (как первую аминокислоту зрелого белка), поскольку эти аминокислоты полностью не удаляются. Например, конечный белок-продукт может иметь на аминоконце 1 или 2 добавленных аминокислотных остатка, обнаруживаемых в сайте расщепления пептида. В альтернативном варианте, при применении фермента, расщепляющего белок, в случае, когда целевой белок содержит сайт расщепления, может продуцироваться расщепленная форма белка.

Экспрессия и клонирование обычно могут включать применение промотора, функционально связанного с молекулой, кодирующей белок, связывающий α -синуклеин, распознаваемого организмом-хозяином. Промотор расположен перед иницирующим кодоном структурного гена, регулирует транскрипцию структурного гена (обычно от 100 до 1000 пн), и представляет собой нетранскрибируемую последовательность, расположенную в направлении 5'. Промоторы подразделяют на индуцибельные промоторы и константные промоторы. Индуцибельный промотор отвечает на изменения условий культивирования, например, присутствие или отсутствие определенного ингредиента среды или изменение температуры, и иницирует и регулирует транскрипцию присоединенной к нему ДНК. Напротив, константный промотор не регулирует транскрипцию функционально связанного с ним гена и экспрессируется постоянно. Широко известно множество промоторов, распознаваемых различными клетками-хозяевами. Соответствующий промотор функционально связан с ДНК, кодирующей белок, связывающий α -синуклеин, содержащий тяжелую цепь или легкую цепь, в результате встраивания его в вектор после удаления промотора ДНК-матрицы с применением рестрикционного фермента.

В области техники также широко известны промоторы, подходящие для применения в хозяевах-дрожжах. Кроме промотора для дрожжей также может применяться энхансер для дрожжей. Промотор, подходящий для применения в клетках хозяев-млекопитающих включает промоторы, полученные из генома вируса, например, вируса полиомы, вируса, поражающего глотку, аденовируса (например, аденовируса 2), вируса папилломы крупного рогатого скота, вируса саркомы птиц, цитомегаловируса, ретровируса, вируса гепатита В и вируса обезьян 40 (SV40), но не ограничивается перечисленными. Примеры других промоторов, подходящих для клеток млекопитающих, включают гетерогенный промотор млекопитающих, например, промотор теплового шока и промотор актина.

Дополнительные промоторы включают ранний промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); промотор CMV (Thornsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A* 81:659-663); промотор, содержащийся в 3' длинном концевом повторе вируса саркомы Payca (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); промотора тимидинкиназы вируса герпеса (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 78:1444-1445); промотор и регуляторную последовательность гена металлотионина (Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); и промотор прокариот, например, бета-лактамазный промотор (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 75:3727-3731); или tac-промотор (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 80:21-25), но не ограничиваются перечисленными. Кроме того, могут применяться следующие регулирующие транскрипцию области, используемые для трансформированного животного, демонстрирующие тканевую специфичность: регуляторная область гена эластазы I, которая активна в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); регуляторная область гена инсулина, которая активна в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); регуляторная область гена иммуноглобулина, которая активна в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); регуляторная область гена вируса опухоли молочной железы мышей, которая активна в тестикулах, молочной железе, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); регуляторная область гена альбумина, которая активна в печени (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); регуляторная область гена альфа-фетопroteина, которая активна в печени (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58); регуляторная область гена альфа 1-антитрипсина, которая активна в печени (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); регуляторная область гена бета-глобина, которая активна в клетках костного мозга (Mogran et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); регуляторная область гена основного белка миелина, которая активна в олигодендроцитах головного мозга (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); регуляторная область гена легкой цепи 2 миозина, которая активна в скелетных мышцах (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); и регуляторная область гена гонадотропин-высвобождающего гормона, которая активна в гипоталамусе (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

Последовательность энхансера может быть встроена в вектор для улучшения транскрипции ДНК, кодирующей легкую цепь или тяжелую цепь человеческого белка, связывающего α -синуклеин, в высших эукариотах. Энхансер представляет собой действующий в цис-положении фактор ДНК, обычно имеющий длину 10-300 пн, который действует на промотор и усиливает транскрипцию. Энхансер обнаруживается в 5' и 3' положениях транскрипционной единицы и относительно не зависит от положения и направления. Известны энхансерные последовательности различных генов млекопитающих (например, глобина, эластазы, альбумина, альфа-фетопroteина и инсулина). Однако, как правило, используют энхансер, происходящий из вируса. Примеры энхансеров для активации промотора, известные в области техники, включают энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы и энхансер аденовируса. Энхансер для активации промотора эукариот может быть расположен в 5'- или 3'-направлении от кодирующей последовательности в составе вектора, но обычно расположен в 5' сайте промотора. Для облегчения внеклеточной секреции антитела в вектор экспрессии может быть интегрирована последовательность, кодирующая подходящую естественную или гетерогенную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид). Выбор сигнального пептида или лидерной последовательности определяется типом клетки-хозяина, в которой продуцируется антитело, и естественная сигнальная последовательность может быть замещена гетерогенной сигнальной последовательностью. Примеры функциональных сигнальных пептидов для клеток хозяев-млекопитающих включают сигнальную последовательность для интерлейкина 7 (IL-7), описанную в патенте US 4965195; сигнальную последовательность для рецептора интерлейкина-2, описанную в документе Cosman et al., 1984, *Nature* 312:768; сигнальную последовательность для рецептора интерлейкина-4, описанную в патенте EP 0367566; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа I, описанный в патенте US 4968607; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа II, описанный в патенте EP 0460846.

Вектор экспрессии может быть создан с использованием вектора, имеющегося в продаже. Такой вектор экспрессии может содержать целевую основную последовательность целиком или ее часть или совсем не содержать ее. Когда одна или более основных последовательностей, описанных в данном документе, изначально отсутствуют в составе вектора, они могут быть по-отдельности собраны и лигированы в вектор. Способ сборки каждой последовательности, входящей в состав основных последовательностей, хорошо известен специалистам в области техники.

После получения вектора и встраивания молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь и тяжелую цепь, содержащей последовательность легкой цепи, тяжелой цепи или антигенсвязывающего фрагмента антитела к α -синуклеину, в надлежащий сайт вектора, такой рекомбинантный вектор, можно вводить в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Введение вектора для экспрессии антитела в выбранную клетку-хозяина может осуществляться таким способом, как трансфекция, инфекция, копреципитация с фосфатом кальция, электропорация, микроинъекция, липо-

фекция, ДЭАЭ-декстран-опосредованная трансфекция или другими хорошо известными способами. Способ введения главным образом определяется в зависимости от типа используемой клетки-хозяина. Такие способы хорошо известны специалистам в области техники и, например, описаны в вышеупомянутом документе Sambrook et al., 2001.

Затем, после культивирования клетки-хозяина в надлежащих условиях, антитело собирают из культуральной среды (в случае, когда клетка секретирует антитело в среду) или непосредственно из продуцирующей его клетки-хозяина (в случае, когда антитело не секретируется). Выбор надлежащей клетки-хозяина может зависеть от различных факторов, например, от целевого уровня экспрессии, модификации полипептида, предпочтительной или необходимой для его активности (например, гликозилирования или фосфорилирования) и легкости сворачивания для образования биологически активной молекулы и т.д.

Линии клеток млекопитающих, доступные для экспрессии, хорошо известны в области техники и включают, например иммортализованные клетки, которые можно приобрести в АТСС (Американской коллекции типовых культур), например клетки яичника китайского хомячка (СНО), клетки HeLa, клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки карциномы печени человека (например, Нер G2) и различные другие клеточные линии, без ограничения. В одном воплощении выбор клеточной линии определяется необходимостью экспрессии антитела, обладающего свойством связывать α -синуклеин, с высоким уровнем экспрессии. В другом воплощении клеточная линия может быть выбрана из системы В-клеток, способной продуцировать и секретировать гетерогенное антитело, однако не способной продуцировать собственное антитело.

Роль α -синуклеина в заболевании

Альфа-синуклеин (α -синуклеин) представляет собой белок, состоящий из 140 аминокислот, который экспрессируется преимущественно в пресинаптических окончаниях нейронов. Он существует в виде мономера, который в нормальных условиях находится в цитоплазме в несвернутой форме. Точная функция α -синуклеина еще не установлена, и полагают, что он играет роль в поддержании доставки синаптических везикул к зрелым пресинаптическим окончаниям, поскольку он обнаруживается только после развития синапсов (Murphy DD et al. J Neurosci 2000, 20: 3214-3220). α -синуклеин может регулировать высвобождение дофамина, регулируя произвольные или непроизвольные движения или может влиять на память и когнитивную функцию (Kokhan VS et al. Behav Brain Res 2012, 231: 226230). В частности, функция α -синуклеина важна, поскольку активность синапсов увеличивается и изменяется со временем, и является важным фактором при нейродегенерации.

При патологии α -синуклеин претерпевает структурные изменения, связываясь и взаимодействуя с каплями липидов, фосфолипидными бислоями или липидными мембранами с формированием свернутой α -спиральной вторичной структуры, в результате чего образуются агрегаты, включая димеры, олигомеры и фибриллярные формы.

В частности, агрегация α -синуклеина связана с патогенезом группы нейродегенеративных заболеваний под названием α -синуклеинопатии, включая болезнь Паркинсона (БП), болезнь Паркинсона с деменцией (БПД), деменцию с тельцами Леви (ДТЛ), множественную системную атрофию (МСА) и многие нейроаксональные заболевания, и также обнаруживается при болезни Альцгеймера (Kim et al., Alzheimer's Research & Therapy 2014, 6:73).

Кроме того, в образцах цереброспинальной жидкости и сыворотки пациентов с болезнью Паркинсона обнаруживают как олигомерные, так и мономерные формы альфа-синуклеина, что указывает на то, что низкомолекулярные агрегаты альфа-синуклеина могут проникать через клеточную мембрану и достигать внеклеточного пространства. Также было показано, что неправильно свернутый альфа-синуклеин может высвобождаться из клеток посредством экзоцитоза и затем транспортироваться из одного участка головного мозга в другой участок при помощи внутриклеточного транспорта, как белки-прионы (Brundin P. et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2010, 11: 301-307).

α -Синуклеинопатии представляют собой группу нейродегенеративных заболеваний, отличающихся наличием в клетках включений или телец, содержащих агрегаты α -синуклеина. Эти тельца в некоторой степени отличаются внешним видом, в зависимости от заболевания, и обозначаются тельцами Леви при болезни Паркинсона (БП) и деменции с тельцами Леви (ДТЛ), нейронными цитоплазматическими включениями при множественной системной атрофии (МСА) и аксональными сфероидными при нейроаксональных заболеваниях. Антитела по данному изобретению предпочтительно и специфично распознают агрегаты α -синуклеина и, таким образом, распознают такие тельца.

Болезнь с тельцами Леви (БТЛ) или заболевание с поражением нейронов, ассоциированным с альфа-синуклеином, характеризуется дегенерацией дофаминергической системы, двигательными нарушениями, когнитивными нарушениями и образованием телец Леви (ТЛ) (McKeith et al., Neurology 1996, 47: 1113-24). Тельца Леви представляют собой сферические скопления белка, обнаруживаемые в нервных клетках. Тельца Леви нарушают нормальную функцию головного мозга, препятствуя действию в головном мозге химических медиаторов, включая ацетилхолин и дофамин. Болезни с тельцами Леви включают болезнь Паркинсона (включая идиопатическую болезнь Паркинсона (БП)), болезнь диффузных телец Леви (БДТЛ), также обозначаемую деменцией с тельцами Леви, сочетанную болезнь Альцгеймера и бо-

лезнь Паркинсона и множественную системную атрофию. БДТЛ имеет те же симптомы, что и болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, но местонахождение телец Леви отличается от такового при болезни Паркинсона. При БДТЛ тельца Леви в основном присутствуют в коре, а при болезни Паркинсона преимущественно находятся в черной субстанции.

Другие заболевания с тельцами Леви включают идиопатическую ортостатическую гипотензию, расстройство с тельцами Леви (дисфагию), сопутствующую БТЛ (incidental LBD), наследственную БТЛ (Inherited LBD) (например, мутации гена α -синуклеина и генов PARK3 и PARK4) и множественную системную атрофию (МСА, например, оливомостомозжечковую атрофию, стриатонигральную дегенерацию и синдром Шая-Дрейджера).

Антитело к α -синуклеину по данному изобретению, специфически распознающее агрегат α -синуклеина с высокой аффинностью, может применяться для диагностики или выявления таких заболеваний. Кроме того, антитело к α -синуклеину по данному изобретению, специфически распознающее агрегат α -синуклеина, ингибирует образование агрегатов α -синуклеина или разрушает агрегат и ингибирует внутриклеточный транспорт агрегата, тем самым подавляя α -синуклеинопатию, в частности болезни с тельцами Леви и болезнь Паркинсона.

Применение антитела к α -синуклеину человека в целях диагностики и лечения

Антитела, раскрытые в данном документе, можно использовать для обнаружения α -синуклеина, в частности, агрегатов α -синуклеина, таких как тельца Леви, и выявления в биологическом образце клеток или тканей, содержащих агрегаты α -синуклеина. Например, антитело к α -синуклеину может применяться для диагностирования, например, для обнаружения и/или количественного анализа агрегатов α -синуклеина в биологическом образце, таком как кровь, содержащая сыворотку, цереброспинальная жидкость или моча, или агрегатов α -синуклеина, экспрессируемого в ткани или клетках, и/или диагностирования α -синуклеинопатии на этом основании.

В частности, антитела по данному изобретению, специфически связывающиеся с агрегатами, могут применяться для лечения заболеваний, связанных с агрегатами α -синуклеина у субъектов, нуждающихся в лечении, диагностике и/или выявлении заболеваний, связанных с агрегатами α -синуклеина. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению может эффективно применяться для лечения заболеваний, связанных с агрегатами α -синуклеина, описанными выше, ингибируя образование, способствуя разрушению и ингибируя внутриклеточный транспорт агрегатов α -синуклеина.

Способ диагностики

Антитело, раскрытое в данном документе, может эффективно применяться для обнаружения, диагностирования или мониторинга заболеваний или симптомов, связанных с α -синуклеином.

В одном воплощении способ по данному изобретению представляет собой способ диагностирования α -синуклеинопатии у субъекта, нуждающегося в диагностике α -синуклеинопатии, где способ включает измерение концентрации или внутриклеточной локализации агрегата α -синуклеина у субъекта с использованием антитела и антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению и сравнение концентрации или внутриклеточной локализации агрегата α -синуклеина, измеренных у субъекта, с результатами в контрольном образце, где сходство или различие с результатом контрольного образца указывает на то, что субъект страдает α -синуклеинопатией.

В указанном способе субъект включает пациентов, у которых отсутствуют симптомы или у которых симптомы еще не возникли. В одном воплощении в качестве контроля можно использовать пациентов с α -синуклеинопатией, включая БП, ДТЛ или МСА, где сходство с контрольной группой на стадии сравнения позволяет диагностировать у субъекта α -синуклеинопатию. В другом воплощении, когда контрольный образец представляет собой образец, взятый у нормального человека, различие с контрольной группой на стадии сравнения, например, увеличение концентрации агрегатов, позволяет диагностировать у субъекта α -синуклеинопатию. В другом воплощении возраст субъекта и контроля могут быть сопоставимы. Способ может осуществляться *in vivo* или в биологическом образце, полученном у субъекта, таком как кровь, цереброспинальная жидкость или моча.

Способ можно осуществлять с визуализацией *in vivo*. Визуализацию *in vivo* можно осуществлять, например, с применением позитронно-эмиссионной томографии (PET), однофотонной эмиссионной томографии (SPECT), оптической визуализации в ближнем инфракрасном диапазоне (NIR) или магниторезонансной визуализации (MRI).

Способ можно осуществлять *in vitro*. Способ можно осуществлять с использованием Вестерн-блоттинга, иммунопреципитации, ELISA, радиоиммунного анализа (RIA) или иммуногистохимических методов, которые хорошо известны специалистам в области техники, например, см. Tijssen, 1993, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Vol 15 (Eds R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam); Zola, 1987, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc.); Jalkanen et al., 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985; Jalkanen et al., 1987, J. Cell Biol. 105:3087-3096). Определение α -синуклеина можно осуществлять *in vivo* или *in vitro*. Кроме того, способ охватывает иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммунный анализ (RIA).

Для применения с целью определения или диагностики, антитело может быть мечено детектируемым метящим веществом. Подходящие метящие вещества включают радиоактивный изотоп или радионуклид (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентное вещество (например, FITC, родамин, флуоресцентный субстрат лананоид), фермент (например, пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентную группу, биотинилированную группу или полипептидный эпитоп, распознаваемый вторичным репортером (например, последовательность лейциновой застевки, сайт связывания вторичного антитела, связывающий металлы домен, эпитопную метку), но не ограничиваются перечисленными. В некоторых воплощениях метящий субстрат может быть присоединен к антителу посредством спейсеров различной длины для уменьшения возможных стерических затруднений. В области техники известны различные способы мечения белка, и они могут применяться в данном изобретении.

В другом аспекте антитело по данному изобретению можно использовать для идентификации ткани, включающей агрегат α -синуклеина. В конкретном воплощении антитело мечено метящим веществом, и определяют связывание меченого антитела с агрегатом α -синуклеина. В одном воплощении связывание антитела с агрегатом α -синуклеина определяют *in vivo*.

В другом аспекте данного изобретения раскрыто определение или сортировка исследуемых веществ, конкурирующих с антителом по данному изобретению за связывание с агрегатом α -синуклеина. Например, включена стадия определения количества свободных антител в растворе, содержащем агрегат α -синуклеина, в присутствии или в отсутствие исследуемых веществ. Увеличение концентрации свободного антитела, т.е. антитела, которое не связано с агрегатом α -синуклеина, может указывать, что исследуемая молекула может конкурировать с антителом за связывание с α -синуклеином. В одном воплощении антитело мечено метящей группой. В альтернативном варианте исследуемые вещества являются мечеными, а количество свободных исследуемых веществ отслеживают по наличию или отсутствию антитела.

Кроме того, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, имеют различное применение. Например, их можно применять в анализе специфического связывания, способе аффинной очистки α -синуклеина или способе скрининга антагонистов α -синуклеина.

Способ лечения: фармацевтическая композиция, способ введения

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению является полезным при лечении заболеваний, связанных с агрегатами α -синуклеина, как описано выше, ингибируя образование, способствуя разрушению и ингибируя внутриклеточный транспорт агрегатов α -синуклеина.

Соответственно в изобретении также предложены способы лечения с использованием антитела и антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению. В одном воплощении антитело вводят пациенту. Заболевания и пациенты, которых можно эффективно лечить с помощью антитела и антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению, описаны выше.

В одном воплощении антитело по данному изобретению можно использовать в связанной с носителем для доставки форме для переноса через гематоэнцефалический барьер. Описано множество способов доставки лекарственных средств через гематоэнцефалический барьер. Например, существует способ нарушения осмотического давления ГЭБ путем использования способа Brad quinine или высокоинтенсивного фокусированного ультразвука (HIGU). Они также включают применение клеточных систем доставки, например, переносчиков глюкозы и аминокислот, а также транцитоз инсулина или трансферрина, опосредованный рецептором, либо блокирование эффлюксного переносчика гликопротеинов. Примеры рецепторов в системах рецептор-опосредованного транцитоза перечислены ниже: рецептор инсулина (например, человеческий рецептор инсулина), рецептор трансферрина, LRP (например, LRP1, LRP6 и LRP8), рецептор меланокортина, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, рецептор VACM-1, IGFR, EPCR, EGFR, TNFR, рецептор лептина, M6PR, рецептор липопroteина, NCAM, LIFR, LfR, MRP1, AchR, DTr, переносчик глутатиона, SR-B1, MYOF, TFRC, ECE1, LDLR, PVR, CDC50A, SCARF1, MRC1, HLA-DRA, RAMP2, VLDLR, STAB1, TLR9, CXCL16, NTRK1, CD74, DPP4, рецепторы факторов роста эндотелия 1, 2 и 3, рецептор глюкокортикоидов, ионотропный глутаматный рецептор, рецептор M3, рецептор ароматических углеводов, GLUT-1, рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3), рецептор N-метил-D-аспартата, S1P1, рецептор P2Y, TMEM30A и RAGE.

В еще одном воплощении антитело по данному изобретению можно использовать в связанной с другими терапевтическими агентами форме для лечения заболеваний, ассоциированных с агрегатами α -синуклеина.

Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективную дозу антитела и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, растворитель, эмульгатор, консервант и/или добавку. Кроме того, изобретение охватывает, например, способ лечения онкологического пациента путем введения такой фармацевтической композиции. Термин "пациент" включает пациента-человека, заболевание которого связано с α -синуклеином.

Приемлемый ингредиент композиции является нетоксичным для реципиента в используемом объеме и концентрации. В конкретном воплощении предложена фармацевтическая композиция, которая содержит терапевтически эффективную дозу антитела к α -синуклеину человека.

В конкретном воплощении приемлемый ингредиент композиции предпочтительно является нетоксичным в используемом объеме и концентрации. В одном воплощении, например, фармацевтическая композиция может содержать определенный ингредиент для pH, осмоляльности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, аромата, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, модификации, поддержания или сохранения абсорбции или проникновения композиции. В данном воплощении подходящий ингредиент включает аминокислоту (например, глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин), противомикробное вещество; антиоксидант (например, аскорбиновую кислоту, сульфит натрия или бисульфит натрия); буфер (например, боратный, бикарбонатный, Tris-HCl, цитратный, фосфатный или содержащий другие органические кислоты); объемообразующее вещество (например, маннит или глицин); хелатирующее вещество (например, этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA)); комплексообразующее вещество (например, кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнитель; моносахарид; дисахарид и другие углеводы (например, глюкозу, маннозу или декстрин); белок (например, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулин); краситель, корригент и разбавитель; эмульгатор; гидрофильный полимер (например, поливинилпирролидон); низкомолекулярный полипептид; солеобразующий противоион (например, натрий); консервант (например, хлорид бензалкония, бензойную кислоту, салициловую кислоту, мертиолят, фенилэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновую кислоту или пероксид); растворитель (например, глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарный спирт (например, маннит или сорбит); суспензию; супернатант или смачивающее вещество (например, Плуроники, ПЭГ, сложный эфир сорбитана, полисорбат, например, полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапол); стабилизатор (например, сахарозу или сорбит); улучшающее прочность вещество (например, галид щелочного металла, предпочтительно, хлорид натрия или хлорид калия, маннит, сорбит); носитель для доставки, разбавитель; эксципиент и/или вспомогательное вещество, но не ограничивается перечисленным. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

В конкретном воплощении специалист в области техники может установить, какая фармацевтическая композиция будет оптимальной в зависимости, например, от целевого способа введения, способа доставки и целевого объема (см. выше REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES). В конкретном воплощении данная композиция может влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и клиренс *in vivo* антитела, описанного в данном документе. В конкретном воплощении основная несущая среда или носитель в составе фармацевтической композиции могут быть водными или неводными. Например, соответствующая несущая среда или носитель могут представлять собой воду для инъекций, физиологический раствор с добавлением других стандартных веществ в композицию для парентерального введения. Кроме того, в качестве носителя может использоваться нейтральный буферный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином. В конкретном воплощении фармацевтическая композиция может содержать Tris буфер с pH приблизительно 7,0-8,5 или ацетатный буфер с pH приблизительно 4,0-5,5 и может дополнительно содержать сорбит или подходящие заменители. В конкретном воплощении композиция антитела к α -синуклеину человека может быть приготовлена путем смешивания выбранной композиции, имеющей целевую чистоту, в форме лиофилизированной массы или водного раствора с любым препаратобразующим веществом для хранения (см. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES). Кроме того, в конкретном воплощении антитело к α -синуклеину человека может быть лиофилизировано с использованием подходящего эксципиента, например сахарозы.

Фармацевтическую композицию можно вводить парентерально. В альтернативном варианте композицию можно вводить путем ингаляции или через пищеварительный тракт, например перорально. Приготовление такой фармацевтически приемлемой композиции известно в уровне техники.

Компоненты, требуемые для композиций, предпочтительно присутствуют в концентрации, подходящей для места введения. В конкретном воплощении для поддержания композиции при физиологических значениях pH или несколько ниже или, как правило, в диапазоне pH от приблизительно 5 до приблизительно 8 используют буфер.

В случае парентерального введения терапевтическая композиция содержит целевой белок, связывающий человеческий α -синуклеин, в фармацевтически приемлемой несущей среде, и может быть представлена в форме апирогенного водного раствора, подходящего для парентерального введения. Несущая среда, которая особенно подходит для парентеральных инъекций, представляет собой стерильную дистиллированную воду, и в данном изобретении антитело к α -синуклеину человека составлено в должным образом консервированном стерильном изотоническом растворе. В конкретном воплощении такая композиция может сопровождаться композицией, в которой используют агент, обеспечивающий контролируемое высвобождение или пролонгированное высвобождение композиции, которая может быть введена посредством инъекции-депо, например, микросфер для инъекций, биodeградируемых частиц, полимерного соединения (например, полимолочной кислоты или полигликолевой кислоты), частицы или липосомы. В конкретном воплощении можно использовать гиалуроновую кислоту, увеличивающую время

нахождения в крови. В конкретном воплощении для доставки целевого антитела также можно применять имплантируемые устройства для доставки лекарственного средства.

Кроме того, фармацевтическая композиция может быть приготовлена в ингаляционной форме. В некоторых воплощениях антитело к α -синуклеину человека приготовлено в виде порошка для ингаляций. В конкретном воплощении раствор для ингаляций с антителом к α -синуклеину человека также может быть приготовлен в виде пропеллента для введения в виде аэрозоля. В конкретном воплощении раствор можно распылять. Введение в легкие и способы приготовления композиций дополнительно описаны в заявке PCT/US 94/001875. Некоторые композиции можно вводить перорально. Антитело к α -синуклеину человека, вводимое таким способом, может быть приготовлено в виде твердой лекарственной формы, например с носителем, обычно используемым для очистки и приготовления капсул, или без такого носителя. В конкретном воплощении капсула может быть разработана таким образом, чтобы высвобождать активный компонент композиции в участке желудочно-кишечного тракта, где биодоступность максимальна, а пресистемный метаболизм минимален. Для улучшения абсорбции антитела к α -синуклеину человека может быть включено вспомогательное вещество. Также можно использовать разбавитель, корригент, воск с низкой температурой плавления, растительное масло, смазывающее вещество, суспензию, разрыхлитель для приготовления таблеток и связывающее вещество.

Некоторые фармацевтические композиции содержат эффективную дозу антитела к α -синуклеину человека, смешанного с нетоксичным эксципиентом, подходящим для изготовления таблеток. Посредством растворения таблетки в стерильной воде или других надлежащих несущих средах можно получать раствор для введения в разовой дозе. Надлежащие эксципиенты включают неактивный разбавитель, например карбонат кальция, карбонат натрия, бикарбонат натрия, лактозу или фосфат кальция; или связывающее вещество, например крахмал, желатин или гуммиарабик; или смазывающее вещество, например стеарат магния, стеариновую кислоту или тальк, без ограничения.

Специалистам в области техники очевидны дополнительные фармацевтические композиции, включая композицию, содержащую другое антитело к α -синуклеину человека, в том числе композицию с пролонгированным или контролируемым высвобождением. Другие средства, обеспечивающие пролонгированную или контролируемую доставку, например методики приготовления носителя для липосом, биоразлагаемой частицы или пористой частицы и вещества для инъекции-депо, также известны специалистам в области техники. Например, можно упомянуть PCT/US 93/00829, где описано контролируемое высвобождение пористых полимерных частиц. Вещество, обеспечивающее пролонгированное высвобождение, может содержать формованный продукт, например полупроницаемую полимерную матрицу в форме пленки или микрокапсулы. Матрица, обеспечивающая пролонгированное высвобождение, может содержать полиэфир, гидрогель, полилактид (описано в патенте US 3773919 и EP 058481), сополимер L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), поли(2-гидроксиэтил-метакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277; and Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, см. выше) или поли-D(-)-3-гидроксibuтировую кислоту (EP 133,988). Композиция с пролонгированным высвобождением может также содержать липосому, полученную одним из многочисленных способов, известных в области техники. Например, можно упомянуть Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; EP 036676; EP 088046 и EP 143949.

Фармацевтическая композиция, используемая для введения *in vivo*, как правило, представлена в стерильном виде. Стерильность может достигаться фильтрованием через мембрану для стерилизующую фильтрации. Когда композиция является лиофилизированной, способ ее растворения, а также способ лиофилизации должны осуществляться в стерильных условиях. Композиция для парентерального введения может храниться в лиофилизированной форме или в растворе. Например, композиция для парентерального введения обычно содержится в контейнере, обеспечивающем стерильный доступ, такой как флакон с крышкой, через которую может пройти игла для подкожных инъекций, или пакет с раствором для внутривенного введения.

В конкретном воплощении клетка, экспрессирующая рекомбинантное антитело, описанная в данном документе, может быть инкапсулирована для доставки (Invest. Ophthalmol Vis Sci 43:3292-3298, 2002; and Proc. Natl. Acad. Sciences 103:3896-3901, 2006).

В конкретной композиции антитело может иметь концентрацию, например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или 150 мг/мл. Некоторые композиции содержат буфер, сахарозу и полисорбат. Один пример композиции содержит 50-100 мг/мл антитела, 5-20 mM ацетата натрия, 5-10% мас./об. сахарозы и 0,002-0,008% мас./об. полисорбата. Конкретная таблетка содержит, например, 65-75 мг/мл антитела в 9-11 mM натрий-ацетатном буфере, 8-10% мас./об. сахарозы и 0,005-0,006% мас./об. полисорбата. У данной конкретной композиции pH находится в диапазоне 4,5-6. Другие композиции имеют pH 5,0-5,5 (например, pH 5,0, 5,2 или 5,4).

После составления фармацевтические композиции могут храниться в стерильном флаконе в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого, кристаллического или дегидратированного или лиофилизированного порошка. Такие композиции могут храниться в форме, подходящей для немедленного при-

менения, или в форме, подготавливаемой непосредственно перед введением (например, в лиофилизированной). Также предложен набор для приготовления доз препарата для однократного введения. Набор содержит первый контейнер, в котором находится лиофильно высушенный белок, и второй контейнер, в котором содержится водная композиция. В конкретном воплощении предложен набор, содержащий предварительно заполненный однокамерный и многокамерный шприц. Используемая терапевтически эффективная доза фармацевтической композиции, содержащей антитело к α -синуклеину человека, может зависеть, например, от терапевтической ситуации и назначения. Специалисты в области техники поймут, что доза, необходимая для лечения, может отличаться по меньшей мере отчасти, в зависимости от заболевания, при котором применяют антитело к α -синуклеину человека, способа введения и характеристик организма пациента (массы, поверхности тела или размера органов) и/или состояния (возраст и общее состояние здоровья). В конкретном воплощении клиницист может определить оптимальную дозу и изменить способ введения для получения оптимального терапевтического эффекта.

Типичная доза может быть в диапазоне от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 30 мг/кг или более, с учетом вышеупомянутых факторов. В конкретном воплощении доза может быть в диапазоне от 10 мкг/кг до приблизительно 30 мг/кг, в частности от 0,1 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, или, в альтернативном варианте, от 0,3 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг. В некоторых случаях доза составляет от 0,5 до 20 мг/кг. В некоторых случаях вводят 0,3, 0,5, 1, 3, 10 или 20 мг/кг антитела.

Частота введения может зависеть от фармакокинетических показателей используемой композиции антитела к α -синуклеину человека. Как правило, клиницист вводит композицию до тех пор, пока не будет достигнута доза, обеспечивающая целевой эффект. Так, композицию можно вводить в течение времени в виде однократной дозы или 2-кратной или более доз, или можно осуществлять введение посредством непрерывной инфузии при помощи имплантированного устройства или катетера. Соответствующая доза может быть верифицирована с помощью надлежащей кривой доза-ответ. В конкретном воплощении антитело можно вводить пациенту в течение длительного времени. Длительное введение антитела может минимизировать вредные иммунологические реакции или аллергические реакции, которые, как правило, сопровождают введение антитела, не являющегося полностью человеческим, например, антитела, полученного к человеческому антигену у животного, не являющегося человеком, например, не полностью человеческое антитело или не являющееся человеческим антитело, полученное у животного, не являющегося человеком.

Введение фармацевтической композиции можно осуществлять любым известным способом, например, перорально, внутривенной, внутривенной, интрацеребральной (интерстициальной), внутрижелудочковой, внутримышечной, внутриглазной, внутриартериальной инъекцией, введением через катетер или внутривенным введением, при помощи системы, обеспечивающей пролонгированное высвобождение, или имплантированного устройства. В конкретном воплощении композицию можно непрерывно вводить посредством болюсной инъекции или инъекции или при помощи имплантированного устройства.

Кроме того, композицию можно вводить локально, посредством имплантации мембраны, губки или другого соответствующего вещества, в котором абсорбирована или инкапсулирована целевая молекула. В конкретном воплощении в случае применения имплантированного устройства, устройство может быть имплантировано в любую соответствующую ткань или орган, а доставка целевой молекулы может достигаться благодаря диффузии, спланированного по времени болюсного введения или непрерывного введения.

Кроме того, может быть предпочтительно применение фармацевтической композиции, содержащей антитело к α -синуклеину человека, *in vitro*. В данном случае клетка, ткань или орган, удаленные у пациента, могут подвергаться воздействию фармацевтической композиции, содержащей антитело к α -синуклеину человека, а затем клетку, ткань и/или орган имплантируют пациенту.

В частности, антитело к α -синуклеину человека может быть введено путем имплантации конкретной клетки, генетически модифицированной способами, описанными в данном документе, для экспрессии и секреции полипептида. В конкретном воплощении такая клетка может быть клеткой животного или клеткой человека, и может быть аутологичной, неаутологичной или гетерогенной. В конкретном воплощении клетка может быть иммортализована. В другом воплощении для уменьшения иммунологических реакций клетка может быть инкапсулирована, чтобы избежать проникновения в окружающую ткань. В дополнительном воплощении материал капсулы, как правило, обеспечивает высвобождение белковых продуктов, но является биосовместимой полупроницаемой полимерной вставкой или мембраной, предотвращающей разрушение клеток под влиянием других повреждающих факторов со стороны иммунной системы или окружающей ткани пациента.

Далее приведены предпочтительные примеры, облегчающие понимание данного изобретения. Данные примеры предназначены исключительно для лучшего понимания данного изобретения, и объем данного изобретения не ограничен приведенными примерами.

Термины и методики, использованные в данном изобретении, относящиеся к культуре клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетике, химии белков и нуклеиновых

кислот, а также гибридизации, широко применяются и хорошо известны в области техники. При прочих равных условиях способы и методики, описанные в данном документе, могут осуществляться с использованием стандартных методик, находящихся в компетенции специалиста в области клеточной биологии, культуры клеток, молекулярной биологии, технологии генетической трансформации, микробиологии, технологии рекомбинантной ДНК, иммунологии и т.п. Более подробное описание стандартных методик может быть найдено в следующих книгах и публикациях. Общие методы молекулярной биологии и биохимии: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001); *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); *DNA Cloning*, Volumes I and II (Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (Gait ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (Hames and Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (Hames and Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (Freshney and Alan, Liss, Inc., 1987); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller and Calos, eds.); *Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd Edition (Ausubel et al., eds.); and *Recombinant DNA Methodology* (Wu, ed., Academic Press); Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

Проведение реакций белков и способы очистки являются рутинными процедурами в области техники или осуществляются согласно инструкциям производителя, как описано в данном документе. В данном изобретении термины, относящиеся к аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, лабораторные методики и способы хорошо известны и широко применяются в области техники. Стандартные методики могут применяться для химического синтеза, химического анализа, получения фармацевтических средств, фармацевтических композиций, а также введения, лечения пациентов и т.п.

Пример 1. Получение антитела к α -синуклеину

Пример 1-1. Мышиное моноклональное антитело.

Иммунизация.

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

Затем 200 мкл полученной смеси вводили путем подкожной инъекции самкам мышей BALB/c в возрасте от 5 до 7 недель. Через 2 недели выполняли бустерную инъекцию 200 мкл полученной смеси подкожно. Через одну неделю после бустерной инъекции собирали кровь и определяли титр антител методом ELISA с использованием введенного антигена. Затем выполняли третью бустерную инъекцию путем подкожного введения одного только антигена.

Получение гибридомы.

Селезенку иммунизированных мышей удаляли и из селезенки получали клетки селезенки. Клетки селезенки суспендировали в среде Hybridoma-SFM (Thermo Fisher Scientific, USA) с добавлением 10% FBS. Для получения гибридомы клетки селезенки и клетки миеломы мыши SP2/0-Ag14 смешивали в среде Hybridoma-SFM без сыворотки и затем центрифугировали для удаления среды. Затем добавляли ПЭГ для получения осадка клеток и инкубировали при 37 °C в течение 1 мин для индукции слияния клеток.

Клонирование одиночных клеток.

После слияния в течение 2 недель верифицировали слияние с В-клетками мыши, продуцирующими антитела, методом ELISA с использованием антигена, введенного мышам, и кондиционированной среды. Затем проводили клонирование одиночных клеток с использованием гибридомы для отбора 16 гибридом, продуцирующих моноклональные антитела. Клоны 1E4 и 9B11 (IgG1 каппа, IgG3 каппа и IgG3 каппа соответственно) получали с использованием в качестве антигена агрегата полноразмерного (140 остатков) α -синуклеина, а клоны 3A9, 10F10 и 11F11 (IgG2b каппа, IgG2a каппа, IgG2b каппа, соответственно) получали с использованием в качестве антигенов агрегатов α -синуклеина с отщепленными 21 С-концевыми остатками.

Очистка антител.

Каждую из гибридом культивировали в среде RPMI1640, содержащей 10% FBS. Для получения антител культуральную среду заменяли на бессывороточную среду (SFM) и культивировали приблизительно в течение 4 дней. Культуральную надосадочную жидкость отделяли, центрифугировали, фильтровали через фильтр 0,22 мкм и очищали на колонке с белком G для IgG1 и на колонке с белком A для остальных антител.

Определение последовательности вариабельной области.

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

Аминокислотные последовательности приведены в табл. 1, а нуклеотидные последовательности приведены в табл. 2.

Пример 1-2. Скрининг библиотеки фагового дисплея.

Получение библиотеки фагового дисплея 1×10^{10} компетентных клеток, экспрессирующих одноцепочечные варьируемые фрагменты (ScFv) человеческого происхождения (получены из EHWА WOMANS UNIVERSITY), обладающие разнообразием, инокулировали в среду 2X YT [17 г триптона (CONDA, 1612.00), 10 г дрожжевого экстракта (CONDA, 1702.00) и 5 г NaCl (Sigma, S7653)], содержащую 34 мкг/мл хлорамфеникола (Sigma, C0857), 2% глюкозы (Sigma, G5400) и 5 мМ $MgCl_2$ (Sigma, C0857) и культивировали при 30°C в течение 3 ч до достижения оптической плотности OD₆₀₀ 0,5-0,7. Затем клетки инфицировали фагом-хелпером и культивировали в среде 2X YT, содержащей 34 мкг/мл хлорамфеникола, 5 мМ $MgCl_2$, 70 мкг/мл канамицина (Sigma, K1876) и 1 мМ IPTG (ELPISBIO, IPTG025) при 30°C в течение 6 ч для индукции упаковки фага. Культуральный раствор центрифугировали при 4500 об/мин при 4°C в течение 15 мин. К культуральной надосадочной жидкости добавляли 4% PEG 6000 (Fluka, 81253) и 3% NaCl (Sigma, S7653) и инкубировали в течение 1 ч на льду. Продукт центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20 мин при 4°C, а затем осадок суспендировали в PBS и центрифугировали вновь при 4°C при 12000 об/мин в течение 10 мин для получения надосадочной жидкости, содержащей библиотеку фагового дисплея. Полученную надосадочную жидкость хранили при 4°C до последующего применения.

Пэннинг библиотеки фагового дисплея

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

Бычий сывороточный альбумин (BSA) добавляли к клеткам в концентрации 3% в пробирке при 4°C в течение ночи, добавляя 10 мкг/мл агрегатов и мономеров рекомбинантного α -синуклеина к PBS в имунотрубке (maxisorp 444202) раствор был добавлен в пробирку, и на поверхности которой агрегаты и мономеры α -синуклеина не были адсорбированы, была защищена. После опустошения пробирки, библиотеку фагов антител из 10^{12} КОЕ, диспергированных в 3%-ном растворе BSA, помещали в имунотрубку, в которой агрегаты и мономеры α -синуклеина были адсорбированы, и взаимодействие происходило в течение 1 ч (отрицательный отбор). Затем собирали фаги, не связавшиеся с агрегатами и мономерами α -синуклеина, и оставляли прореагировать в течение 2 ч при комнатной температуре с адсорбированным агрегатами и мономерами α -синуклеина. Фосфатно-солевой буферный раствор с 0,05% Tween 20 (PBS-T) использовали для восстановления 100 мкМ раствора триэтиламина, который был восстановлен с использованием раствора PBS-T. *E. coli* при 37°C в течение 1 ч, и инфицированные *E. coli* засевали на агаризованную среду 2X YT (pH 7,4) и культивировали при 37°C в течение ночи, они были инфицированы ER2537. На следующий день культуру *E. coli* суспендировали в 4 мл культуральной среды 2X YT, содержащей карбенициллин, и добавляли 15% глицерин, часть хранили при -80°C, а остальное использовали для получения фагов для следующих экспериментов. Повторяя данную процедуру всего в течение 3 циклов, осуществляли амплификацию и обогащение пула фагов, специфических в отношении антигена α -синуклеина. С каждым раундом пэннинга количество отмывок с помощью PBS-T увеличивали для амплификации и увеличения концентрации антиген-специфических фагов.

Скрининг одиночных клонов

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

Для выделения одиночных клонов из концентрированного пула, после высаживания пула фагов на агаризованную среду LB, содержащую тетрациклин/карбенициллин, и культивирования отбирали одиночные колонии. После инокуляции одиночных клонов в 96-луночные глубокие планшеты, в которые помещали 400 мкл среды 2X YT-тетрациклин/карбенициллин на лунку, и культивирования в течение ночи, 10 мкл культурального раствора переносили в новый 96-луночный глубокий планшет, в котором находилось 390 мкл среды 2X YT-тетрациклин/карбенициллин, и культивировали при 37°C в течение 4 ч. В культуральный раствор вносили 1 мМ IPTG и культивировали при 30°C в течение ночи. После культивирования в течение ночи культуральный раствор центрифугировали для отделения надосадочной жидкости.

Затем отбирали одиночные клоны, экспрессирующие растворимый scFv, связывающийся с агрегатом синуклеина, при помощи метода ELISA, как описано Steinberger. Rader and Barbas III. 2000. Phage display vectors. В Phage Display Laboratory Manual. 1st ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY. USA. pp.11.9-11.12. В частности, отобранное в примере 1-1 антитело 7B7 вносили в 96-луночный планшет (Nunc-Immuno Plates, NUNC, USA) и оставляли для иммобилизации при 4°C в течение ночи. В каждую лунку добавляли 3% BSA в количестве 200 мкл и затем проводили блокирование при 37°C в течение 2 ч. Затем вносили агрегаты и мономеры синуклеина в концентрации 100 нг/лунку, оставляли прореагировать при 37°C в течение 2 ч и промывали пять раз 300 мкл PBS-T. Надосадочную жидкость, полученную от одиночных клонов, смешивали с 3% BSA в объемном соотношении 1:1 (об./об.) и добавляли по 100 мкл раствора в лунки планшета с иммобилизованными агрегатами и мономерами, с последующим взаимодействием в течение 2 ч при 37°C. Клетки промывали пять раз 300 мкл PBS-T и инкубировали при 37°C в те-

чение 1 ч с антителом к НА, конъюгированному с HRP, после чего промывали пять раз PBS-T. После добавления 100 мкл тетраметилбензидина (TMB, Sigma, T0440) останавливали реакцию добавлением 50 мкл 1 N H₂SO₄ для измерения поглощения при 450 нм. Клоны с абсорбцией 0,5 и выше считали положительными в отношении связывания и исключали клоны, неспецифически связывающиеся с BSA.

Соответственно отбирали клоны антител AC8, AE8, AA9, DG5, AD2, AD7, DG11, DG8 и DA9, которые специфически связывались с агрегатами синуклеина, и выполняли секвенирование белковых и нуклеотидных последовательностей. Нуклеотидные последовательности клонов представлены в SEQ ID NO: 169-224.

Пример 2. Анализ специфичности и аффинности связывания с антигеном с использованием антитела к α -синуклеину

Пример 2-1. Дот-блоттинг с использованием мышинного моноклонального антитела к α -синуклеину.

Эксперименты с дот-блоттингом проводили для исследования способности антитела по данному изобретению связываться с мономерами или агрегатами в нативном состоянии. Для эксперимента 50 нг или 100 нг α -синуклеина в виде мономера или фибриллярного белка (полученного проф. Lee Seung-jae, Seoul National University; Bae et al., J. Neurosci 32: 13454, 2012) наносили на нитроцеллюлозную мембрану в виде пятен. Мономерные или фибриллярные белки в двукратном разведении последовательно наносили на мембрану в направлении от правого конца к левому (12,5, 25, 50, 100 нг). Мембрану блокировали 5% раствором обезжиренного сухого молока в TBST в течение 1 ч при комнатной температуре. 1 мг/мл антитела к α -синуклеину, полученного в примере 1, добавляли к TBST, содержащему 1% бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывания TBST регистрировали сигналы с использованием и хемилюминесцентного субстрата (NEN) и вторичного антитела, конъюгированного с HRP (пероксидазой хрена) согласно инструкциям производителя. Для визуализации люминесцентных сигналов использовали систему анализа изображений LAS-3000 (FUJIFILM Life Science). Результаты показаны на фиг. 1. Как свидетельствуют результаты, антитело к α -синуклеину по данному изобретению предпочтительно связывалось только с агрегатами, а не с мономерами α -синуклеина. В частности, 1E4, 9B11, 3A9 и 11F11 связывались только с агрегатами, а 10F10 связывалось как с агрегатами, так и с мономерами. Антитело 274 (Bae et al., J Neurosci. 2012 Sep 26; 32 (39): 13454-13469) использовали в качестве антитела сравнения, связывающегося с мономерами и с агрегатами.

Пример 2-2. ELISA с использованием мышинного моноклонального антитела к α -синуклеину.

Анализ методом ELISA проводили для количественного анализа аффинности связывания антитела по данному изобретению с антигеном. Для этого антитело к альфа-синуклеину по данному изобретению иммобилизовали на поверхности 96-луночного планшета в концентрации 1 мг/мл и вносили фибриллярные агрегаты альфа-синуклеина в концентрации 10, 100, 1000 и 10000 нг/мл. После промывания PBS вносили вторичное антитело, конъюгированное с биотином, и стрептавидин, конъюгированный с HRP, и затем проводили реакцию с субстратом TMB. Регистрировали абсорбцию. Результаты показаны на фиг. 2. Как свидетельствуют результаты, антитела по данному изобретению предпочтительно связывались с агрегатами с высокой аффинностью. Результаты ELISA показали, что антитела, предпочтительно связывающиеся с агрегатами, имели аффинность $0,1 \sim 2 \times 10^{-9}$ М, тогда как антитела, связывающиеся как с мономерами, так и с агрегатами, демонстрировали более высокие значения $\sim 1 \times 10^{-10}$ М.

Пример 2-3. Анализ на биосенсоре BIAcore с использованием мышинного моноклонального антитела к α -синуклеину.

Проводили количественный анализ связывания антитела к альфа-синуклеину, полученного в примере 1, с мономерным и агрегированным антигеном на биосенсоре BIAcore.

Использовали инструмент T200 (GE Healthcare, S/N: 1565888). Использовали чип с иммобилизованным белком A (GE Healthcare, Cat. 29-1275-56). 10 mM глицин-HCl, pH 1,5 (GE Healthcare, Cat. BR-1003-54) использовали в качестве буфера для регенерации. В качестве проточного буфера, буфера для разведения аналитов и разведения образцов использовали HBS-EP. Антитела к α -синуклеину (3A9, 9B11 и 11F11), полученные в примере 1, разводили 1x HBS-EP (GE Healthcare, Cat. BR-1006-69), мономер альфа-синуклеина (1 мг/мл) и фибриллярный белок (3 мг/мл) последовательно разводили и анализировали в дубликатах в 6 концентрациях (0, 0,39, 1,56, 6,25, 25, 100 нМ), включая 0 нМ. Для захвата иммобилизовали мономер до уровня 800 RU (расчетный) и фибриллярный белок до уровня 100 RU (расчетный). Фазу захвата осуществляли в течение 60 с со скоростью тока 30 мкл/мин, а период стабилизации составлял 180 с. Фазу ассоциации проводили при скорости тока 30 мкл/мин и времени ассоциации 120 с. Фазу диссоциации проводили при скорости тока 30 мкл/мин и времени диссоциации 360 с. Фазу регенерации проводили двукратно при скорости тока 30 мкл/мин в течение 240 с (первичная) и 60 с (вторичная). Для аппроксимации кривых использовали модель связывания 1:1, для анализа использовали программу BIAcore T200 Evaluation (GE healthcare). Результаты показаны на фиг. 3а и 3б. Из четырех проанализированных антител к альфа-синуклеину антитела 3A9, 9B11 и 11F11, предпочтительно связывавшиеся с агрегатами в исследованиях другими методами, описанными выше, в исследовании на биосенсоре BIAcore связывались только с агрегатами с высокой аффинностью, составлявшей приблизительно от 1 до 3×10^{-9} М.

Пример 2-4. Анализ на платформе Octet с использованием мышинового моноклонального антитела к α -синуклеину.

Проводили количественный анализ связывания антител к альфа-синуклеину (3A9, 9B11, 11F11), полученных в примере 1, с мономерным и агрегированным антигеном на платформе Octet.

В частности, проточным буфером служил 1x KB буфер (cat. 18-1092) или 1x PBS буфер при 1000 об/мин, а буфером для иммобилизации служил ацетат натрия, pH 5 (10 mM, Cat 18-1068). Для тестирования антител в качестве иммобилизованного антигена использовали мономеры или фибриллы α -синуклеина. Целевые концентрации составляли 20 мкг/мл для мономера и 0,4 мкг/мл для фибрилл. Для исследования кинетики готовили последовательные двукратные разведения, начиная с концентрации 50 нМ для мономеров и 100 нМ для фибрилл соответственно, чтобы всего получить 7 точек для построения кривой. Время ассоциации/диссоциации составляло 5 мин/20 мин для мономеров и 5 мин/25 мин для фибрилл. В качестве биосенсора использовали ARG2, для аппроксимации применяли модель 1:1.

Результаты показаны на фиг. 4. Как свидетельствуют данные, 3A9, 9B11 и 11F11 демонстрировали слабое связывание с мономерами (красный пунктирный график) и хорошее связывание с агрегатами (восходящий красный пунктирный график). Результаты, полученные методами дот-блоттинг, Octet и ELISA, аналогичны или согласуются. Таким образом, из четырех протестированных антител к α -синуклеину антитела 3A9, 9B11 и 11F11, которые демонстрировали предпочтительное связывание с агрегатами в других методах, также связывались только с агрегатами при анализе на платформе Octet.

Пример 2-5. Дот-блоттинг с применением антитела к α -синуклеину в формате ScFV.

Дот-блоттинг выполняли, как описано в примере 2-1, используя антитела к α -синуклеину в формате ScFV, отобранные в примере 1-2. Антигены наносили в порядке 6,25, 12,5, 25 и 50 нг, начиная с первого левого ряда. Антитела использовали в концентрации 1 мкг/мл и для детекции использовали вторичное антитело к Fc-фрагменту иммуноглобулина человека, конъюгированное с HRP.

Результаты показаны на фиг. 5. М означает мономерный антиген, а А означает агрегированный антиген. Избирательное связывание каждого антитела с мономерами или агрегатами показано в таблице справа. Показано, что AA9, AD2, AD7, AC8, DG8, DG11, DA9 и DG5 связывались только с агрегатами, тогда как AE8 предпочтительно связывалось с агрегатами и слабо связывалось с мономерами.

Пример 2-6. Анализ на платформе Octet с использованием антитела к α -синуклеину в формате ScFV.

Анализ на платформе Octet выполняли, как описано в примере 2-4, используя антитела к α -синуклеину в формате ScFV, отобранные в примере 1-2. Результаты показаны на фиг. 6. Обнаружили, что эти антитела обладали высокой аффинностью к агрегату α -синуклеина, составлявшей от $\sim 10^{-9}$ до $\sim 10^{-11}$ М.

Пример 3. Ингибиторный эффект мышинового моноклонального антитела к α -синуклеину на клеточно-опосредованный транспорт агрегатов альфа-синуклеина

Поскольку внутриклеточный транспорт агрегатов альфа-синуклеина представляется патогенетическим фактором, лежащим в основе заболеваний, связанных с агрегатами альфа-синуклеина, антитела, способные подавлять его, могут найти применение в качестве терапевтических агентов. С этой целью в анализе использовали метод бимолекулярной комплементации флуоресценции (BiFC). Принцип BiFC схематически изображен в верхней части фиг. 7.

Культура клеток для анализа BiFC

Клетки линии SH-SY5Y нейробластомы человека, экспрессирующие альфа-синуклеин и половину флуоресцентного белка Venus (Venus 1- α -синуклеин (VIS) и α -синуклеин-Venus2 (SV2)), соответственно культивировали, как описано ранее (Lee HJ et al., J. Neurosci. 2004; 24: 1888-1896). Перед экспериментом 180000 клеток, экспрессирующих VIS и SV2, смешивали на покровном стекле и культивировали в течение 3 дней. Осуществляли пассажи совместной культуры каждые 48 ч для обеспечения непрерывной внутриклеточной миграции альфа-синуклеина. Поскольку в отдельном эксперименте степень переноса была максимальной на пассаже номер 6 (данные не приведены), ингибиторный эффект антитела на транспорт из клетки в клетку анализировали с использованием совместной культуры на шестом пассаже.

Эксперимент BiFC/воздействие антител

За день до визуализации в совместную культуру добавляли 50 мкг/мл IgG или исследуемого антитела (3A9, 9B11, 11F11). Флуоресцентный сигнал белка Venus в каждой совместной культуре соответствует агрегатам, образованным в результате агрегации альфа-синуклеина, при этом считали, что агрегаты образовывались в результате миграции α -синуклеина из одной клетки в другую клетку. Эти сигналы анализировали автоматически на анализаторе IN Cell (настройки инструмента: размер точки: 0,1-0,4 мкм, интенсивность: 4000-7000).

Результаты показаны на фиг. 7. Как показано на рисунке, синий цвет соответствует ядру, а зеленый цвет указывает, что α -синуклеин из одной клетки и α -синуклеин из других клеток образовали агрегаты. График в правой части показывает интенсивность сигнала. Под воздействием 9B11, 11F11 и 3A9 количество клеток, у которых регистрировался зеленый сигнал при сравнении с отрицательным контролем IgG, снижалось. Результаты указывают, что антитела по данному изобретению могут эффективно ингибировать внутриклеточный транспорт агрегатов.

Пример 4. Анализ влияния мышинового моноклонального антитела к α -синуклеину на удаление агрегатов α -синуклеина *in vivo*

Для исследования *in vivo* влияния антитела к α -синуклеину, полученного в данном изобретении, 10 мг/кг альфа-синуклеину человека или IgG вводили внутривенно трансгенным мышам (mThy-1 human α -synuclein, UC San Diego) каждую неделю на протяжении 3 месяцев трансгенным мышам, сверхэкспрессирующим человеческий альфа-синуклеин (mThy-1 human α -synuclein, UC San Diego). Использовали по шесть мышей на группу, в качестве контрольных животных использовали нетрансгенных сородичей. Перфузию осуществляли, как описано ниже.

По окончании последнего введения, для патологического анализа головного мозга животным делали анестезию хлоралгидратом в соответствии с гуманитарными принципами, а затем кардиопульмонарную перфузию 0,9% солевым раствором. Сагитальные срезы перфузированного головного мозга хранили в 4% параформальдегиде (pH 7,4, 4°C) в фосфатном буфере до последующего анализа, а другую половину хранили в замороженном виде (70°C).

Патологический анализ выполняли следующим образом. Из половины головного мозга, зафиксированной в параформальдегиде, делали серийные срезы толщиной 40 мкм на вибраторе свободноплавающим методом. Для подтверждения уровня экспрессии α -синуклеина в головном мозге животных, получавших введения, срезы, включавшие кору, полосатое тело и гиппокамп, инкубировали с антителом к α -синуклеину (с антителом к α -синуклеину p129, который является маркером агрегатов, abcam, ab59264, или с антителом к общему α -синуклеину, Cell Signaling Technology, # 2642) в течение ночи при 4°C. Для выявления активности астроцитов или активности микроглии нарезанные образцы инкубировали с антителом к GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок) (AB5804, millipore) или Iba1 (019-19741, Wako) (019-19741, Wako), соответственно. Для определения степени нейровоспаления, нарезанные образцы инкубировали с антителом к IL-6 (NB600-1131, Novus Biologicals) или IL-1 β (ab9722, abcam), соответственно. После инкубации с первичным антителом проводили инкубацию с козым антителом к IgG кролика, конъюгированным с биотином (1:100, Vector Laboratories), и конъюгатом авидин D - пероксидаза хрена (1: 200, ABC Elite, Vector Laboratories) и проводили детекцию с применением диаминобензидина (DAB). Каждый срез после иммуноокрашивания исследовали при помощи светопольной микроскопии для определения оптической плотности.

Результаты показаны на фиг. 8а и б. На фиг. 8а показан график, демонстрирующий результаты исследования антитела к α -синуклеину p-129 (антитела, распознающего α -синуклеин, фосфорилированный по Ser 129), который является маркером агрегатов α -синуклеина. В результате у трансгенных мышей (TG) наблюдалось существенное снижение уровней агрегатов в CA1 и CA3 коры и гиппокампа по сравнению с контрольными мышами, которым вводили только IgG (соответствующая зона показана стрелками на образце с введением IgG). На фиг. 8б показаны результаты окрашивания антителом к общему α -синуклеину. Повышение человеческого α -синуклеина у мышей TG эффективно устранялось после введения антител. Результаты свидетельствуют, что антитело по данному изобретению эффективно уменьшает агрегаты α -синуклеина и может эффективно применяться для лечения α -синуклеинопатии, такой как болезнь Паркинсона.

Пример 5. Анализ уменьшения микроглиоза и астроглиоза и уменьшения высвобождения воспалительных цитокинов под влиянием мышинового моноклонального антитела к α -синуклеину

Глиоз представляет собой неспецифическую реакцию глиальных клеток в ответ на повреждение центральной нервной системы, индуцированное повреждением ГЭБ, TGF-бета или интерлейкинами. Репрезентативные примеры включают микроглиоз и астроглиоз, маркерами которых являются белки Iba-1 и GFAP соответственно.

Как описано в примере 4, у мышей исследовали влияние антитела по данному изобретению на высвобождение воспалительных цитокинов и индуцированные им микроглиоз и астроглиоз.

Результаты показаны на фиг. 9а, б, в и г. По сравнению с контролем, антитела по данному изобретению снижали микроглиоз и астроглиоз и высвобождение воспалительных цитокинов IL-1 бета и IL-6, индуцирующих микроглиоз и астроглиоз.

Пример 6. Определение телец Леви в ткани головного мозга человека с применением мышинового моноклонального антитела к α -синуклеину

Тельца Леви и нейриты Леви в заключенных в парафин срезах головного мозга, полученных у пациентов, скончавшихся от болезни Паркинсона, толщиной десять микрон (Dr. Halliday, University of Sydney) окрашивали с применением антител по данному изобретению в примере 5 следующим образом. Для демаскировки антигена срезы ткани инкубировали с 90% муравьиной кислотой в течение 3 мин и затем ингибировали пероксидазную активность ткани при помощи 1% H₂O₂ (50% этанол). Затем инкубировали с 10% нормальной лошадиной сывороткой для предупреждения неспецифического связывания с тканями. После промывания фосфатным буфером прилегающие срезы инкубировали с антителами по данному изобретению 3A9, 11F11 и 11F11 при 4°C в течение ночи. После промывания фосфатным буфером проводили инкубацию с антителом к IgG человека, конъюгированным с биотином, при 37°C в течение 30 мин, и

для образования комплекса авидин-биотин проводили реакцию при комнатной температуре в течение 30 мин (набор Vectastatin Elite; Vector Laboratories). Затем, после добавления DAB, содержащего 0,005% H_2O_2 , развивалось окрашивание. Каждый срез окрашивали 0,5% крезилвиолетом для различения клеток.

Результаты показаны на фиг. 10а и б. Как свидетельствуют результаты, антитело по данному изобретению эффективно связывалось с тельцами Леви и нейритами Леви (показано стрелкой). Этот результат означает, что оно способно эффективно связываться с агрегатами α -синуклеина, компонентом телец Леви в ткани головного мозга. Показано, что антитела, проникая в человеческий головной мозг, могут эффективно и специфически связываться с агрегатами α -синуклеина.

Пример 7. Анализ эпитопов мышинового моноклонального антитела к α -синуклеину

Для анализа пептидов проводили картирование эпитопов антител 3A9 и 11F11 по данному изобретению в компании PEPSCAN (The Netherlands).

Результаты показаны на фиг. 11. Как показано на фиг. 11, антитело по данному изобретению распознавало С-концевую часть, в частности участок между аминокислотными остатками 110 и 122, как описано выше, с предпочтительным связыванием с агрегатами.

Специалистам в области техники очевидно, что возможны различные модификации формы и деталей изобретения, не изменяющие суть и объем данного изобретения, которые определяются следующей формулой.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с агрегатом α -синуклеина, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую гиперпеременные участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и (ii) переменную область легкой цепи, содержащую гиперпеременные участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3,

где последовательность CDRH1, CDRH2 и CDRH3 переменной области тяжелой цепи и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 переменной области легкой цепи является следующей:

CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 1, 15 и 29 соответственно и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 43, 57 и 71 соответственно.

2. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с агрегатом α -синуклеина, по п.1, где переменная область тяжелой цепи представляет собой

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85,

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% или более идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85, или

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или более идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85.

3. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с агрегатом α -синуклеина, по п.1, где переменная область легкой цепи представляет собой

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99,

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% или более идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 99, или

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или более идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 99.

4. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с агрегатом α -синуклеина, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую гиперпеременные участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и (ii) переменную область легкой цепи, содержащую гиперпеременные участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3,

где последовательность CDRH1, CDRH2 и CDRH3 переменной области тяжелой цепи и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 переменной области легкой цепи является следующей:

CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 3, 17 и 31 соответственно и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 45, 59 и 73 соответственно.

5. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с агрегатом α -синуклеина, по п.4, где переменная область тяжелой цепи представляет собой

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87,

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% или более идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 87, или

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или более идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 87.

6. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с агрегатом α -синуклеина, по п.4, где переменная область легкой цепи представляет собой

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101,

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% или более идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 101, или

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или более идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 101.

7. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с агрегатом α -синуклеина, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую гиперпеременные участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и (ii) переменную область легкой цепи, содержащую гиперпеременные участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3,

где последовательность CDRH1, CDRH2 и CDRH3 переменной области тяжелой цепи и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 переменной области легкой цепи является следующей:

CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 5, 19 и 33 соответственно и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 47, 61 и 75 соответственно.

8. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с агрегатом α -синуклеина, по п.7, где переменная область тяжелой цепи представляет собой

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89,

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% или более идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 89, или

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или более идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 89.

9. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с агрегатом α -синуклеина, по п.7, где переменная область легкой цепи представляет собой

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103,

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% или более идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 103, или

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или более идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 103.

10. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9.

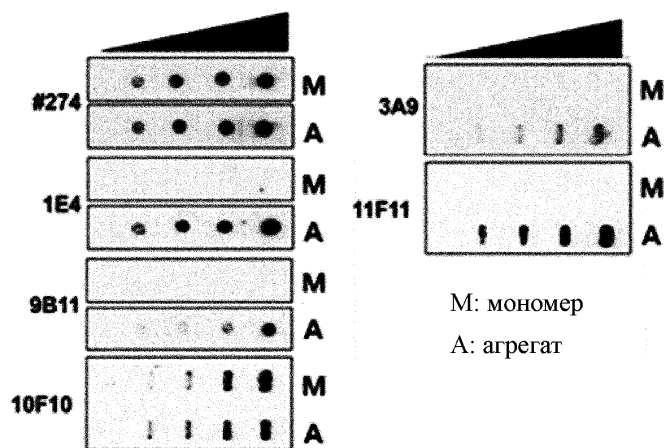
11. Композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, используемая для лечения α -синуклеинопатии и дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

12. Способ определения агрегата α -синуклеина в биологическом образце *in vivo* или *in vitro*, включающий стадию приведения в контакт биологического образца, в котором необходимо определить агрегат α -синуклеина, с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-9.

13. Способ регулирования концентрации агрегата α -синуклеина у субъекта, включающий введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9 субъекту, нуждающемуся в лечении α -синуклеинопатии или регулировании концентрации агрегата α -синуклеина.

14. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9 или композиции, содержащей указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, для лечения заболеваний α -синуклеинопатии у субъекта, страдающего α -синуклеинопатией, где антитело и антигенсвязывающий фрагмент или содержащая их композиция ингибируют внутриклеточный транспорт агрегата α -синуклеина, разрушают агрегат α -синуклеина или ингибируют образование агрегата α -синуклеина в головном мозге субъекта.

15. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9 или композиции, содержащей указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, для регулирования концентрации агрегатов α -синуклеина в клетках головного мозга, где антитело и антигенсвязывающий фрагмент или содержащая их композиция ингибируют внутриклеточный транспорт агрегата α -синуклеина, разрушают агрегат α -синуклеина или ингибируют образование агрегата α -синуклеина.



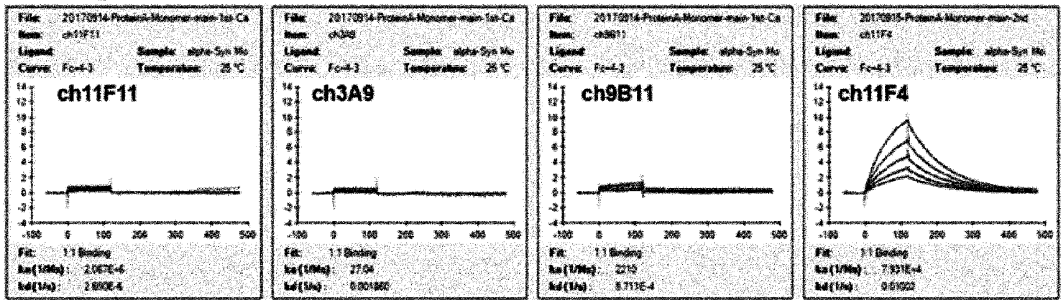
Фиг. 1

Клоны	EC50 (нг/мл)		EC50 (нМ)	
	мономеры	фибриллы	мономеры	фибриллы
1E4	-	24.47	-	0.163
3A9	-	319.4	-	2.129
9B11	-	184.9	-	1.233
10F10	23.30	13.12	0.155	0.087
11F11	-	326.5	-	2.177
274	26.82	15.13	0.179	0.101

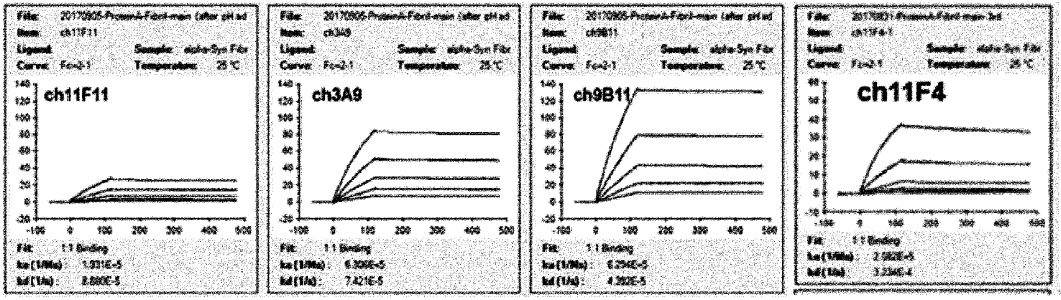
-: исследовали, но нет данных

Фиг. 2

Сенсограммы с мономерами



Сенсограммы с фибриллами

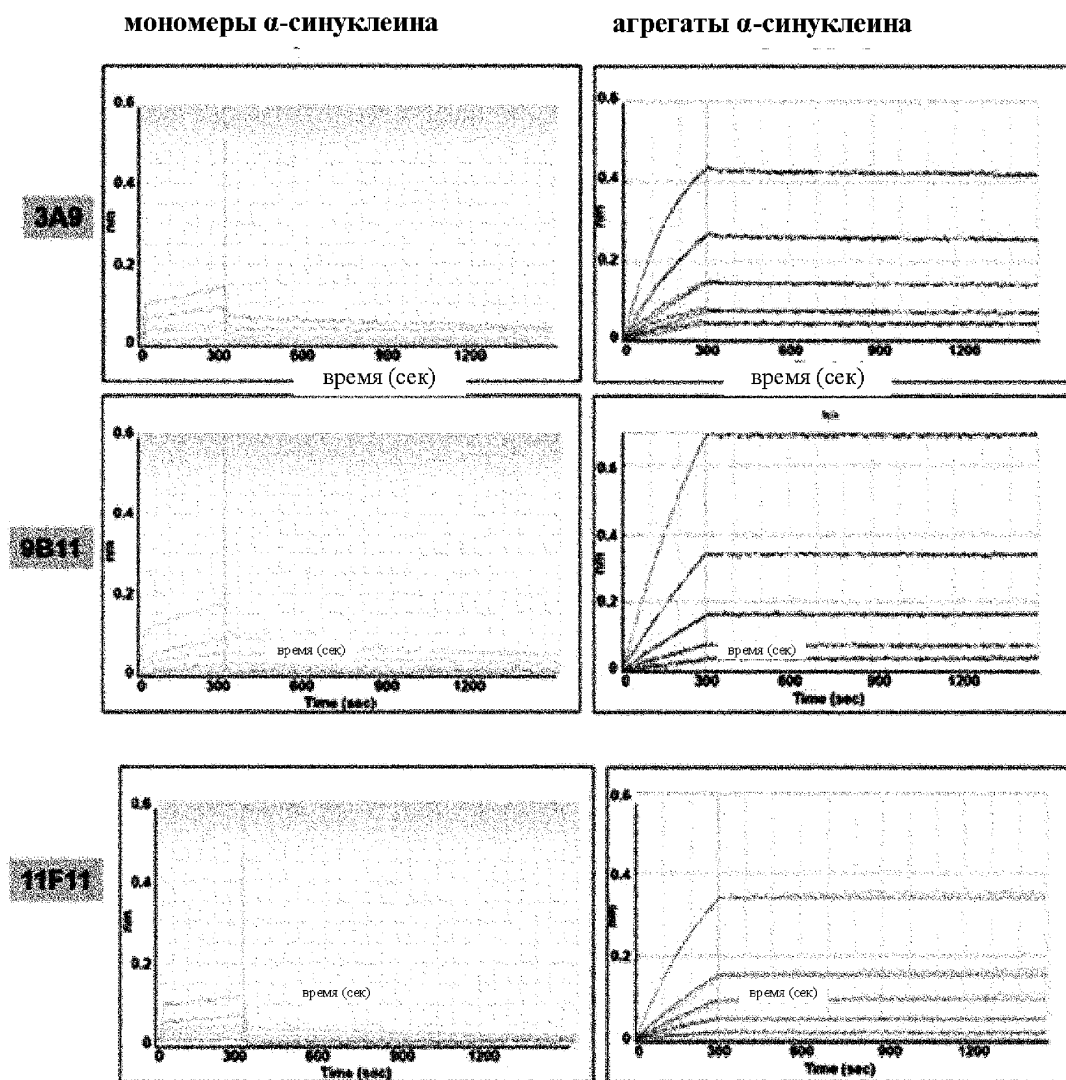


Фиг. 3а

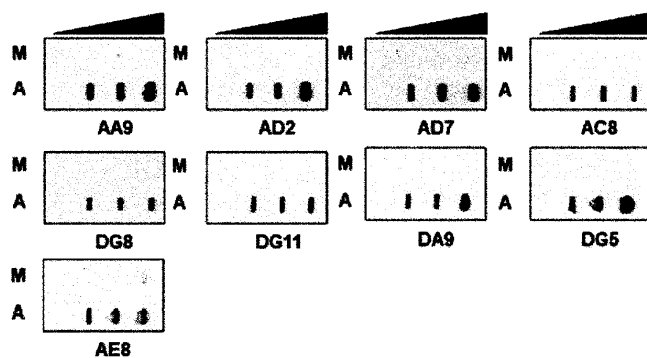
Клоны	KD ($M, \times 10^{-9}$)	
	мономеры	фибриллы
3A9	-	1.320
9B11	-	0.904
11F11	-	2.873

«-» исследовали, но нет данных

Фиг. 36



Фиг. 4



М: мономер, А: агрегаты

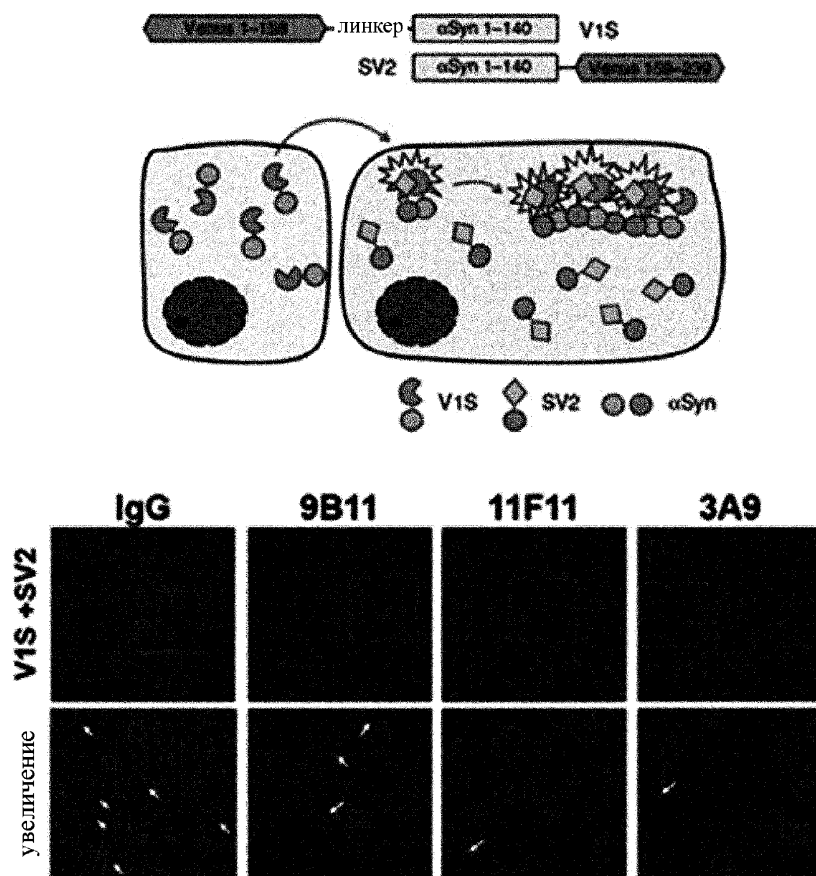
Внесение антигена от 500 нг, 2-кратное разведение

Фиг. 5

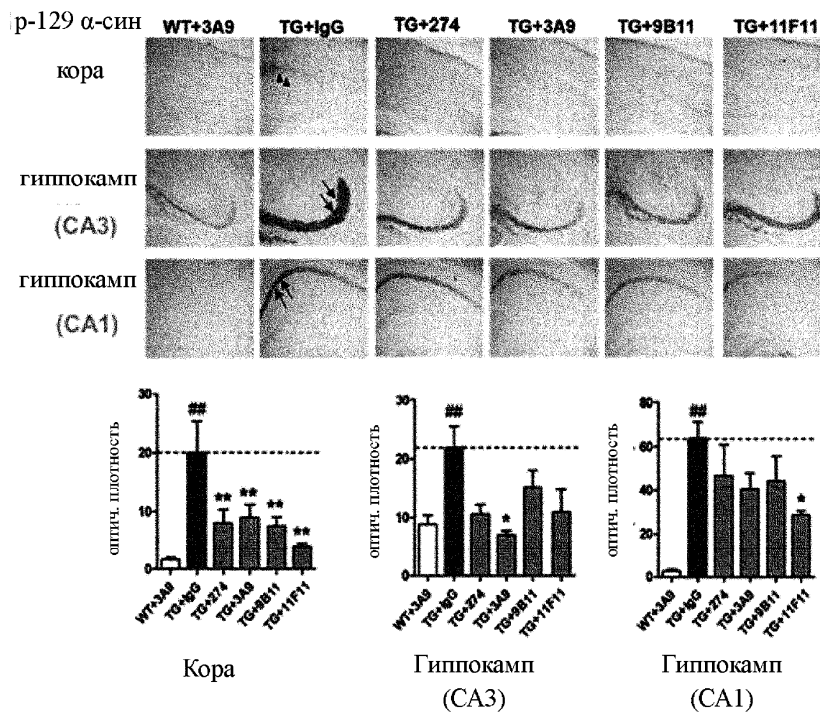
Клоны	Селективность
AA9	Агрегаты
AD2	Агрегаты
AD7	Агрегаты
AC8	Агрегаты
DG8	Агрегаты
DG11	Агрегаты
DA9	Агрегаты
DG5	Агрегаты
AE8	Агрегаты и момеры

Клоны	KD (10^{-9} M)	Клоны	KD (10^{-9} M)
1E4	0.18	AA9	0.88
10F10	0.81	DG5	1.26
11F4	0.14	AD2	1.67
3A9	0.13	AD7	0.17
9B11	0.018	DG11	2.66
11F11	0.16	DG8	3.80
AC8	0.24	DA9	4.31
AE8	0.39		

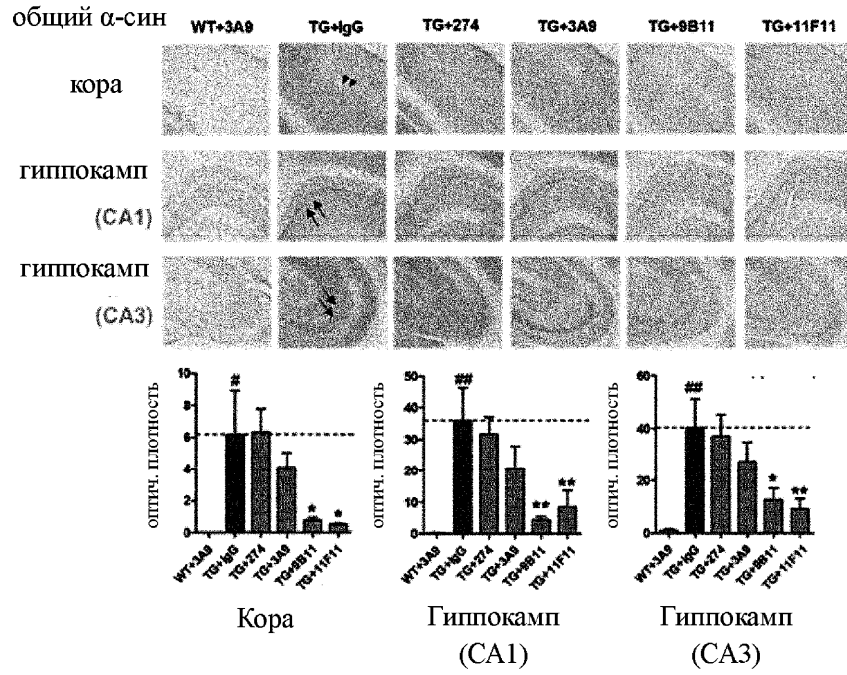
Фиг. 6



Фиг. 7

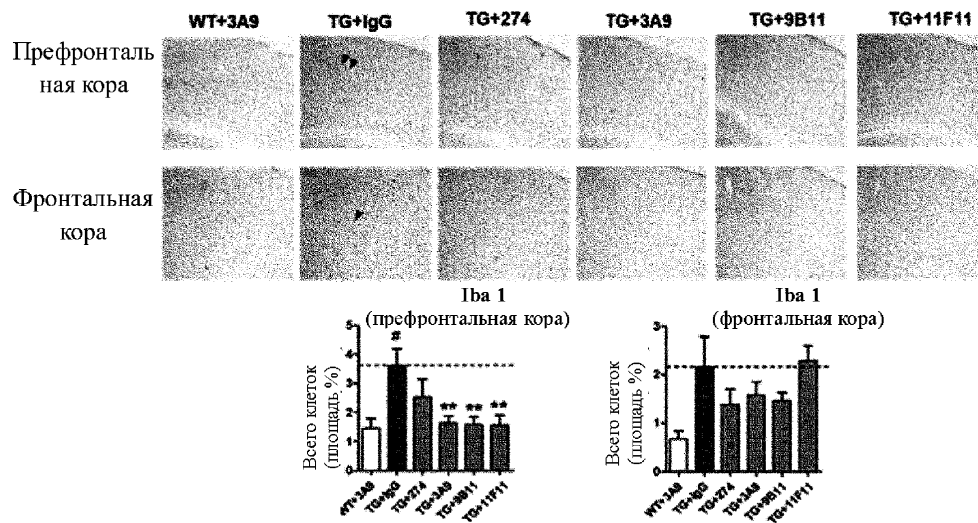


Фиг. 8а



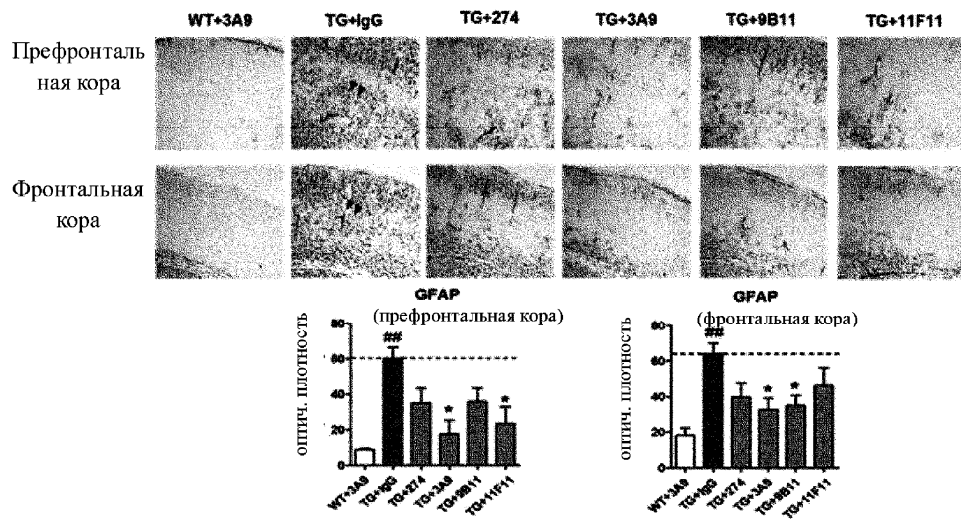
Фиг. 8б

Маркер: Iba-1 (микроглиоз); зона: кора



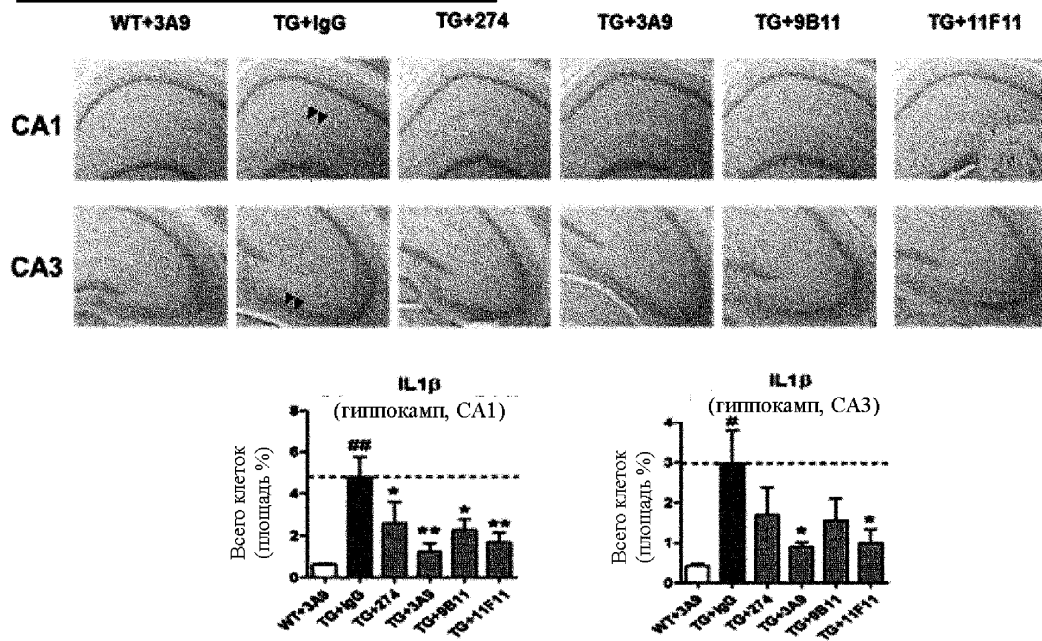
Фиг. 9а

Маркер: GFAP (астроглиоз); зона: кора



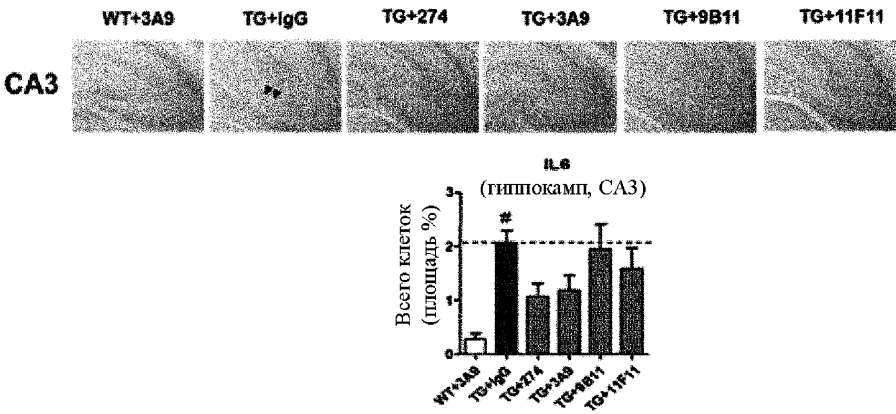
Фиг. 9б

Маркер: IL1 β ; зона: гиппокамп

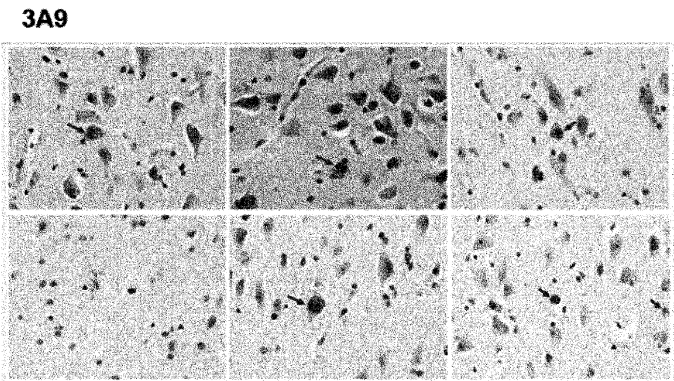


Фиг. 9в

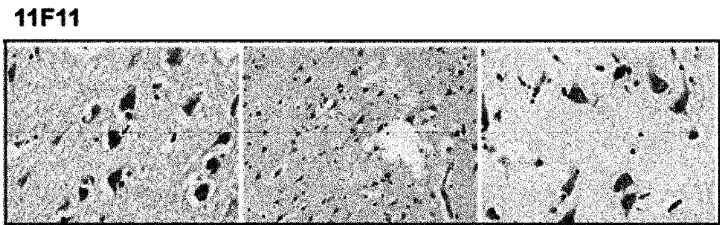
Маркер: IL6; зона: гиппокамп



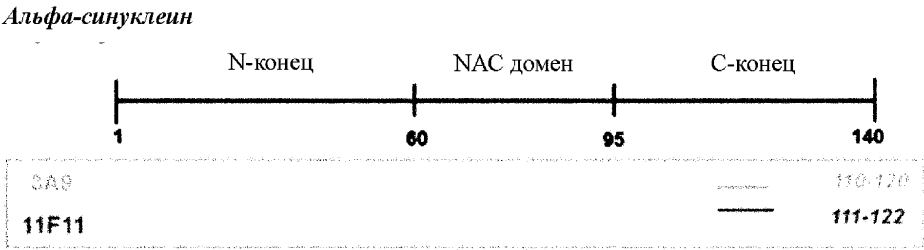
Фиг. 9г



Фиг. 10а



Фиг. 10б



Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2