



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.31

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(21) Номер заявки
201792610

(22) Дата подачи заявки
2016.05.25

**(54) ИНГИБИТОР АКТИВНОСТИ CSF-1R, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ИЛИ ПРОФИЛАКТИКИ ЭПИЛЕПСИИ ИЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, И
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ НА ЕГО ОСНОВЕ**

(31) **15169367.8**

(32) **2015.05.27**

(33) **EP**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/EP2016/061824**

(87) **WO 2016/189045 2016.12.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БИОФАРМА СПРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
**Годар Патрис Мари Шарль,
Камински Рафаль Мариан, Леклерк
Карин Жозе Жанн, Ван Эйлл
Джонатан Мари М (BE)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2013119716
WO-A1-2015028455**

MONICA R.P. ELMORE ET AL.: "Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, Unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain", NEURON, vol. 82, № 2, 1 April 2014 (2014-04-01), p. 380-397, XP055289766, US, ISSN: 0896-6273, DOI:10.1016/j.neuron.2014.02.040, the whole document

D.A. HUME ET AL.: "Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor

1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling", BLOOD, vol. 119, № 8, 23 February 2012 (2012-02-23), p. 1810-1820, XP055070804, ISSN: 0006-4971, DOI:10.1182/blood-2011-09-379214, the whole document

NABIL N DAGHER ET AL.: "Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice", JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON, GB, vol. 12, № 1, 1 August 2015 (2015-08-01), p. 139, XP021228327, ISSN: 1742-2094, DOI:10.1186/S12974-015-0366-9, abstract, p. 145-146

R.A. RICE ET AL.: "Elimination of microglia improves functional outcomes following extensive neuronal loss in the hippocampus", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 35, № 27, 8 July 2015 (2015-07-08), p. 9977-9989, XP055289768, US, ISSN: 0270-6474, DOI:10.1523/JNEUROSCI.0336-15.2015, the whole document

ADRIAN OLMOS-ALONSO ET AL.: "Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer's-like pathology", BRAIN., vol. 139, № 3, 8 January 2016 (2016-01-08), p. 891-907, XP055289773, GB, ISSN: 0006-8950, DOI: 10.1093/brain/awv379, abstract, p. 8-10

(57) Настоящее изобретение относится к ингибитору активности CSF-1R, предназначенному для лечения или профилактики эпилепсии или болезни Паркинсона, а также к фармацевтической композиции для лечения или профилактики эпилепсии или болезни Паркинсона, содержащей указанный ингибитор.

Настоящее изобретение в основном относится к способам лечения неврологических заболеваний, а более конкретно к антителу к CSF-1R для лечения неврологических заболеваний.

Существует широкий спектр неврологических заболеваний, ассоциированных с нейровоспалительным ответом, наиболее известные из которых в основном представляют собой, например, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (ALS), аутизм, болезнь Крейтцфельда-Якоба, менингит, рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, инсульт, травматическое повреждение головного мозга или эпилепсия, эпилептогенез и судорожные расстройства и судороги.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) и Международная лига борьбы с эпилепсией (ILAE) определяют эпилепсию как хроническое, рецидивирующее, повторяющееся неврологическое нарушение, которое заключается в пароксизмальных явлениях, вызываемых избыточными и хаотическими разрядами в нейрональных клетках головного мозга. Ее частота возникновения имеет два пика: один в детстве и подростковом возрасте и второй более выраженный пик в возрасте старше 60. Согласно Международному бюро по вопросам эпилепсии (IBE) приблизительно 50 млн человек страдает от эпилепсии во всем мире, где 20-30% из них страдают более чем одним эпизодом судорог в месяц (Forsgren et al., Eur. J. Neurol., 2005, 12:245-53).

Число новых случаев эпилепсии в год во всем мире находится в диапазоне от 24 до 53 случаев на 100000 жителей. На основании исследований распространенности заболевания, проводимых в различных странах и в различные годы, подсчитали, что в Европе 0,9 млн детей и подростков, 1,9 млн взрослых в возрасте от 20 до 64 лет и 0,6 млн пожилых людей в возрасте 65+ лет страдают эпилепсией (Forsgren et al., Eur. J. Neurol., 2005, 12:245-53).

Полагают, что эпилепсия включает различный комплекс хронических неврологических нарушений, характеризующихся судорогам. Эти судороги могут являться рецидивирующими и беспричинными или могут представлять собой единичные судороги в сочетании с изменениями в головном мозге, увеличивающими вероятность судорог в будущем. Приступы эпилепсии, как правило, являются результатом аномальной, избыточной или гиперсинхронной нейрональной активности в головном мозге.

Эпилепсия является одним из наиболее распространенных неврологических заболеваний с частотой заболевания приблизительно 1% среди населения во всем мире. В соответствии с самым последним определением, приведенным Международной лигой борьбы с эпилепсией, "приступ эпилепсии представляет собой временное возникновение признаков и/или симптомов вследствие аномальной избыточной или гиперсинхронной нейрональной активности в головном мозге" и "эпилепсия представляет собой нарушение головного мозга, характеризующееся устойчивой предрасположенностью к генерации приступов эпилепсии и нейробиологическими, когнитивными, физиологическими и социальными последствиями этого состояния" (Fisher et al., 2014).

Знания о причинах эпилепсии быстро развиваются с появлением технологий полного геномного секвенирования и растущего понимания генома человека. Кроме того, новые концепции и технологии в молекулярной клеточной биологии и генетике радикально изменили наше понимание патофизиологии эпилепсии. В настоящее время техники нейровизуализации позволяют понимать на небывалом ранее уровне циклы и структуры головного мозга, вовлечение в генерацию судорог и прогрессирование эпилепсии. Наконец, нейрофизиологические техники, такие как электроэнцефалографии (EEG) или электрофизиология *in vitro* обеспечивают дополнительную информацию о роли нейрональных сетей при эпилепсии.

Существуют различные типы судорог и этиология эпилепсии, например, генерализованные судороги, фокальные судороги и судороги неизвестного происхождения. Существует концепция, что фокальные судороги берут начало в определенной точке в нейрональной сети, ограниченной одним полушарием (включая конкретную область коры головного мозга), тогда как для генерализованных судорог концепция сводится к тому, что они берут начало в определенной точке и быстро охватывают двусторонне распространенные нейрональные сети (включая всю кору головного мозга) (Berg&Scheffer, 2011). Современная классификация судорог согласно Международной лиге борьбы с эпилепсией (ILAE), опубликованная Berg et al., 2010, включает

а) генерализованные судороги, которые означают, в частности, тонико-клонические (в любом сочетании), абсанс (типичный, атипичный, абсанс с конкретными признаками, миоклонический абсанс, глазная миоклония), миоклонические (миоклонические, миоклонические атонические, миоклонические тонические, клонические, тонические, атонические);

б) парциальные судороги с нарушением сознания и без нарушения сознания или восприятия; и

с) судороги неизвестной природы (эпилептические спазмы).

Парциальные судороги без нарушения сознания или восприятия проявляются

i) с наблюдаемыми двигательными или автономными компонентами; это примерно соответствует концепции "простые парциальные судороги", тогда как "фокальные двигательные" и "автономные" являются терминами, которые могут адекватно отражать эту концепцию в зависимости от проявления судорог; или

ii) соответствуют вовлечению только субъективных сенсорных или физических явлений; это соответствует концепции "аура".

Парциальные судороги с нарушением сознания или восприятия примерно соответствуют концепции "сложных парциальных припадков" с переходом в двусторонние, конвульсивные судороги (включая тонические, клонические или тонические и клонические компоненты). Это выражение заменяет термин "вторично генерализованные судороги".

Также в настоящее время лучше определены следующие основные этиологические факторы:

1) генетические причины: прямой результат известного или предполагаемого генетического(их) дефекта(ов), при котором(ых) судороги являются центральным симптомом нарушения;

2) структурные/метаболические причины: определенное или метаболическое состояние или заболевание, которое, как продемонстрировали, по существу ассоциировано с повышенным риском развития эпилепсии;

3) неизвестные причины, когда невозможно определить природу истинной причины (Berg&Scheffer, 2011).

Кроме того, в настоящее время вводят новые концепции о процессах, приводящих к эпилепсии, т.е. эпилептогенезу, и они способствуют дополнительным научно-исследовательским работам в этой области. Установлено, что эпилептогенез относится к развитию и разрастанию ткани, способной генерировать спонтанные судороги, которые приводят к (1) развитию эпилептического состояния и/или (2) прогрессированию после такого состояния (Pitkänen et al., 2013). Модификация заболевания или синдрома включает два компонента: антиэпилептогенез и модификация сопутствующего заболевания.

Антиэпилептогенез представляет собой процесс, который препятствует эффектам эпилептогенеза, включая предотвращение, модификацию судорог и выздоровление. Касательно предотвращения полное предотвращение прерывает развитие эпилепсии. Частичное предотвращение может замедлять развитие эпилепсии или снижать ее тяжесть. Например, возникают судороги, но они могут быть меньшими по частоте, более короткими или более умеренного типа судорогами (модификация судорог). Антиэпилептогенез также может предотвращать или уменьшать прогрессирование эпилепсии, после того как она уже была установлена.

Изменение сопутствующего заболевания означает лечение, которое облегчает или купирует развитие или прогрессирование симптоматики относящихся к эпилепсии сопутствующих заболеваний, таких как тревожность, депрессия, соматодвигательная недостаточность или снижение когнитивной функции.

Радикальное лечение определяют как полное и постоянное купирование эпилепсии таким образом, что судороги не появляются после прекращения лечения (Pitkänen et al., 2013).

Предложены новые терапевтические подходы, направленные на модификацию заболевания при эпилепсии, когда модифицирующее заболевание средство можно давать до начала эпилепсии или после него. Если такое лечение проводят до начала эпилепсии, оно может предотвращать или замедлять развитие эпилепсии. Когда такое лечение проводят после диагностики эпилепсии, оно может облегчать тяжесть судорог, предотвращать или уменьшать прогрессирование эпилепсии, а также изменять состояние судорог от устойчивости к лекарственному средству до чувствительности к лекарственному средству.

Описанные выше терапевтические концепции существенно отличаются от современного стандарта лечения при эпилепсии, который включает противоэпилептические лекарственные средства (AED), направленные на механизмы нейрональной возбудимости и, таким образом, обеспечивающие только противосудорожное действие. Такие лекарственные средства не решают вопрос истинных причин или патофизиологии эпилепсии, и 30-40% пациентов с эпилепсией страдают от неконтролируемых судорог и сопутствующих заболеваний, связанных с заболеванием, несмотря на впечатляющий медицинский инструментарий более чем 20 AED, доступный на рынке.

Это приводит к неудовлетворенной медицинской потребности в обеспечении более эффективных лекарственных средств со свойствами модификации неврологических заболеваний.

Следует понимать, что воспаление играет показательную роль в патофизиологии эпилепсии и эпилептогенеза человека. В частности, активация микроглиальных клеток ассоциирована с индукцией основных провоспалительных путей, наблюдаемых при височной эпилепсии (TLE) человека, на экспериментальных моделях TLE и эпилептогенезе. Это в основном подтверждается рядом исследований, проводимых на тканях головного мозга, получаемых от пациентов и на моделях на грызунах с TLE, которые указывают на значительное усиление экспрессии генов, ассоциированных с иммунологическими/воспалительными путями, включая некоторые хемокины и провоспалительные цитокины. Предполагают, что хронически активированные микроглиальные клетки высвобождают провоспалительные цитокины (например, TNF α , IL1b), которые, когда действуют, повышают возбудимость нейронов и индуцируют судороги. Это наиболее полно описано для IL1b, который способен усиливать судорожную активность в экспериментальных моделях, при этом нокдаун гена или ингибирование продукции IL1b оказывает противосудорожное действие и может модифицировать течение заболевания в экспериментальных моделях.

Однако доступные в настоящее время валидированные мишени лекарственного средства, регулирующие активность микроглии, являются довольно скудными и существующие терапевтические подходы в основном сосредоточены на новых химических соединениях (NCE). Например, Elmore et al., 2014, опубликовали работу, в которой использовали низкомолекулярное соединение (PLX3397) для ингибиро-

вания рецептора колониестимулирующего фактора 1 (CSF-1R), где предоставленные данные подтверждают, что этот рецептор является ключевым регулятором функции и жизнеспособности микроглии.

Колониестимулирующий фактор 1 (CSF-1) и структурно сходная, но не сходная по последовательности молекула интерлейкина 34 (IL-34) представляют собой два эндогенных лиганда CSF-1R, который экспрессируется исключительно макрофагами и микроглией. Колониестимулирующий фактор 1 (CSF-1), также известный как макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), представляет собой цитокин, продуцируемый различными клетками. CSF-1 состоит из двух "мономерных" полипептидов, которые формируют биологически активный димерный белок CSF-1. CSF-1 существует по меньшей мере в трех зрелых формах вследствие альтернативного сплайсинга РНК, протеолитического процессинга белков-предшественников и посттрансляционных модификаций, включая гликозилирование и добавление протеогликана (см. Cerretti D.P. et al., 1988, *Mol. Immunol.*, 25(8), 761; Pixley F.J. and Stanley E.R., 2004, *Trends in Blood Biology*, 14(11), 628-38; Douglass T.G. et al., 2008, *Int. Immunopharmacol.*, 8, 1354-76). Различные формы белка CSF-1 включают две секретируемые молекулы, одна из которых является гликозилированной, другая содержит более длинную последовательность аминоконца и модификацию протеогликана. Другой вариант представляет собой трансмембранную (TM) молекулу, которая является гликозилированной, но не содержит протеогликановых функциональных групп. Такая мембранная форма может выделяться в результате протеолитического расщепления с выделением активной растворимой молекулы. Все формы продуцируются в виде полипептидов-предшественников, содержащих сигнальную последовательность длиной 32 аминокислоты на аминоконце, гипотетическую трансмембранную область длиной приблизительно 23 аминокислоты вблизи карбоксильного конца и короткий цитоплазматический COOH-хвост. Затем пептиды-предшественники подвергаются процессингу путем протеолитических расщеплений на аминоконце и карбоксильном конце с получением зрелых форм CSF-1 с остатками 1-149, являющимися идентичными и составляющими связывающий домен рецептора. *In vivo* мономеры CSF-1 являются гликозилированными и димеризованными посредством дисульфидной связи. CSF-1 принадлежит к группе биологических агонистов, которые способствуют продукции клеток крови. Конкретно, он действует как фактор роста, дифференцировки и выживания для клеток-предшественников костного мозга мононуклеарной фагоцитарной линии. Кроме того, CSF-1 стимулирует выживаемость, пролиферацию и функцию макрофагов через конкретный рецептор на реагирующих клетках. Другие эксперименты указывали на то, что макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) изменяет фенотип микроглии взрослого человека, культивируемой после биопсии у пациентов с инкурабельной TLE (Smith et al., 2013). Другие последние данные указывают на то, что мутации в гене CSF-1R вызывают наследственные диффузные лейкоэнцефалопатии, которые ассоциированы с судорогами и эпилепсией (Rademakers et al., 2011; Guerreiro et al., 2013).

Рецептор CSF-1 (CSF-1R) также обозначают как продукт гена *c-fms* или CD115. CSF-1R представляет собой гликопротеин 1 TM типа массой 165 кДа, принадлежащий семейству рецепторов тирозинкиназы III типа. Кроме того, рецептор CSF-1 обеспечивает регуляцию пролиферации, дифференцировки и выживаемости мононуклеарных фагоцитарных клеток, включая микроглию. У мышей, у которых отсутствует CSF-1R, выявляют пониженное число макрофагов в периферических тканях. Следует отметить, что у мышей с недостаточностью CSF-1R также отсутствует микроглия в головном мозге, которая ассоциирована с летальным фенотипом. Фактически, микроглия представляет собой только клетки в головном мозге, которые экспрессируют CSF-1R в нормальных условиях, хотя наблюдали низкие уровни CSF-1R в культивируемых нейронах. Связывание лиганда CSF-1 с CSF-1R приводит к фосфорилированию рецептора на одном или более остатках тирозина посредством действия тирозинкиназного домена. Такое фосфорилирование можно детектировать, т.к. доступными являются антитела, которые связываются с рецептором только после фосфорилирования (например, антитело фосфо-M-CSF-рецептор (Tyr546) №3083 от Cell Signaling Technology).

В данной области известны антитела к CSF-1R. Sherr C.J. et al., *Blood*, 73 (1989), 1786-1793, описывают антитела к CSF-1R, которые ингибируют активность CSF-1 (Sherr C.J. et al., *Blood*, 73 (1989), 1786-1793). В WO 09/026303 описаны антитела к CSF-1R, которые связываются с CSF-1R человека и модели опухоли на мышах *in vivo*, в которых используют антитело к CSF-1R мыши. В WO 11/123381 описаны антитела к CSF-1R, которые интернализуют CSF-1R и обладают ADCC активностью. В WO 11/123381 описаны модели опухолей на мышах *in vivo*, в которых используют антитело к CSF-1R мыши. В WO 11/140249 описаны антитела к CSF-1R, которые блокируют связывание CSF-1 с CSF-1R, которые, как установлено, являются пригодными при лечении злокачественной опухоли. В WO 09/112245 описано антитело к CSF-1R IgG1, которое ингибирует связывание CSF-1 с CSF-1R, и установлено, что оно является пригодным при лечении злокачественной опухоли, воспалительного заболевания кишечника и ревматоидного артрита. В WO 11/131407 описано антитело к CSF-1R, которое ингибирует связывание CSF-1 с CSF-1R, и установлено, что оно является пригодным при лечении остеопороза и злокачественной опухоли. В WO 11/107553 описано антитело к CSF-1R, которое ингибирует связывание CSF-1 с CSF-1R, и установлено, что оно является пригодным при лечении остеопороза и злокачественной опухоли. В WO 11/070024 описаны антитела к CSF-1R, которые связываются с фрагментом delD4 CSF-1R человека. В WO 15/028455 описано антитело к CSF-1R, которое ингибирует связывание

CSF-1 с CSF-1R, и установлено, что оно является пригодным при лечении фиброза и злокачественной опухоли.

Однако все еще существуют строгие ограничения и вызывающие беспокойство вопросы, связанные с проницаемостью гематоэнцефалического барьера (BBB) больших биологических молекул, таких как, например, антитела. К настоящему времени не доказано, что модуляция воспаления головного мозга большими молекулами или антителами является эффективной. Наоборот, показано, что этанерцепт, используемый в клиниках рекомбинантный рецептор TNF, слитый с антителом IgG1, не проходит через гематоэнцефалический барьер (BBB) и не оказывает влияния на индуцируемое TNF- α воспаление в головном мозге после системного введения грызунам (Zhou et al., 2011). Все еще существуют серьезные сомнения в возможности централизованных опосредованных терапевтических эффектов системно вводимых антител, что являлось бы характерным путем введения в клинику. В частности, это представляет трудность для антитела к CSF-1R, вследствие того что CSF-1R также экспрессируется в эндотелиальных клетках капилляров головного мозга, и было показано, что активация этого рецептора его природным лигандом, IL-34, восстанавливает целостность BBB и ограничивает его проницаемость (Jin et al., 2014).

Таким образом, в настоящее время все еще существует значительная неудовлетворенная медицинская потребность в улучшенном, безопасном и эффективном терапевтическом лечении и/или профилактике неврологического заболевания. Таким образом, целью настоящего изобретения является предоставление нового способа лечения неврологического заболевания, более конкретно эпилепсии.

Сущность изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к ингибитору активности CSF-1R, предназначенному для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний.

В одном из аспектов ингибитор по настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту. В дополнительном аспекте ингибитор по настоящему изобретению представляет собой антитело, или его функционально активный фрагмент, или производное.

В одном из аспектов настоящее изобретение предоставляет результаты, указывающие на то, что системная инъекция антитела к CSF-1R на модели на животных височной эпилепсии (TLE) может модулировать функцию микроглии, что видно по изменению экспрессии генов микроглии. Таким образом, представленные результаты предоставляют сильнодействующее эффективное терапевтическое биологическое соединение (NBE) в качестве ингибитора активности CSF-1R для применения в лечении и/или профилактике неврологических заболеваний.

Таким образом, настоящее изобретение решает неудовлетворенные потребности и предоставляет ингибитор активности CSF-1R для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания. Настоящее изобретение дополнительно относится к ингибитору активности CSF-1R для применения в лечении и/или профилактике эпилепсии, эпилептогенеза, судорог и конвульсий.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению ингибитора активности CSF-1R для получения лекарственного средства для лечения и или профилактики неврологического заболевания.

Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей ингибитор активности CSF-1R. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения и/или профилактики являющегося человеком индивидуума, страдающего или подвергающегося риску развития неврологического заболевания, включающему введение терапевтически эффективного количества ингибитора активности CSF-1R.

Подробное описание изобретения

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения ингибитор активности CSF-1R, предоставленный для применения в лечении и/или профилактике неврологических заболеваний, представляет собой нуклеиновую кислоту. В дополнительном аспекте ингибитор по настоящему изобретению представляет собой антитело, или его функционально активный фрагмент, или производное.

В настоящем изобретении термин "неврологическое заболевание" относится к следующим ниже заболеваниям: болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (ALS), синдром Ангельмана, синдром дефицита внимания и гиперактивности, расстройство аутистического спектра, биполярное нарушение, повреждение головного мозга, травма головного мозга, опухоль головного мозга, центральный болевой синдром, атрофия головного мозга, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), хроническая боль, комплексный регионарный болевой синдром, болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменция, синдром Дауна, синдром Драве, энцефалит, эссенциальный тремор, атаксия Фридрейха, синдром ломкой X-хромосомы, тремор/атаксия, ассоциированные с ломкой X-хромосомой (FXTAS), черепно-мозговая травма, головная боль, опоясывающий лишай, болезнь Хантингтона, гипоксия, иммуноопосредованный энцефаломиелит, младенческие судороги, внутричерепная гипертензия, болезнь Лафора, синдром Ландау-Клеффнера, синдром Леннокса-Гасто, лейкодистрофия, лейкоэнцефалопатия с исчезновением белого вещества, деменция с тельцами Леви, лиссэнцефалия, болезнь Лайма - неврологические осложнения, церебральный гигантизм, менингит, микроцефалия, мигрень, микроинсульт (транзиторная ишемическая атака), заболевание двигательных нейронов (см. боковой амиотрофический склероз, мультиинфарктная деменция, рассеянный склероз, миоклоническая энцефалопатия грудного ребенка, миоклония, неврологические проявления СПИДа, неврологические осложнения волчанки, нейрональный

цереоидный липофусциноз, нейропатия, болезнь Ниманна-Пика, синдром Отахара, болезнь Паркинсона, паранеопластические синдромы, первичный латеральный склероз, прионные болезни, прогрессирующая многоочаговая лейкоэнцефалопатия, прогрессирующий супрануклеарный паралич, энцефалит Расмуссена, синдром беспокойных ног, синдром Ретта, синдром скованного человека, инсульт, транзиторная ишемическая атака, травматическое повреждение головного мозга, тремор, туберозный склероз, болезнь Унферрихта-Лундборга, эпилепсия укусная, синдром Веста, болезнь Вильсона.

Предпочтительные примеры неврологических заболеваний включают синдром Ангельмана, синдром дефицита внимания и гиперактивности, расстройство аутистического спектра, травму головного мозга, опухоль головного мозга, болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Дауна, синдром Драве, энцефалит, синдром ломкой Х-хромосомы, тремор/атаксию, ассоциированные с ломкой Х-хромосомой (FXTAS), черепно-мозговую травму, опоясывающий лишай, гипоксию, иммуноопосредованный энцефаломиелит, младенческие судороги, болезнь Лафора, синдром Ландау-Клефнера, синдром Леннокса-Гасто, лейкодистрофия, лейкоэнцефалопатию с исчезновением белого вещества, лиссэнцефалию, болезнь Лайма неврологические осложнения, менингит, рассеянный склероз, миоклоническую энцефалопатию грудного ребенка, миоклонию, неврологические осложнения волчанки, синдром Отахара, прионные болезни, энцефалит Расмуссена, синдром Ретта, травматическое повреждение головного мозга, туберозный склероз, болезнь Унферрихта-Лундборга, эпилепсию укусную или синдром Веста.

В настоящем изобретении лечение неврологического заболевания предпочтительно относится к эпилепсии, эпилептогенезу, судорожным расстройствам и судорогам.

Примеры эпилептических синдромов, упорядоченных по возрасту на момент начала заболевания, представляют собой неонатальный период (доброкачественная семейная неонатальная эпилепсия (BFNE), раннюю миоклоническую энцефалопатию (EME), синдром Отахара), грудной возраст (эпилепсия младенчества с мигрирующими парциальными судорогами, синдром Веста, миоклоническая эпилепсия в младенческом возрасте (MEI), доброкачественная эпилепсия грудного возраста, доброкачественная семейная эпилепсия грудного возраста, синдром Драве, миоклоническая энцефалопатия при непрогрессирующих нарушениях), детский возраст (фебрильные судороги плюс (FS+), которые могут начинаться в младенческом возрасте, синдром Панайотопулоса, эпилепсия с миоклоническими атоническими (ранее астатическими) судорогами, доброкачественная эпилепсия с центрально-височными пиками (BECTS), аутосомно-доминантная ночная лобная эпилепсия (ADNFLE), затылочная эпилепсия у детей с поздним началом (тип Гасто), эпилепсия с миоклоническими абсансами, синдром Леннокса-Гасто, эпилептическая энцефалопатия с длительным комплексом пик-волна во время сна (CSWS)b, синдром Ландау-Клефнера (LKS), абсансная эпилепсия детского возраста (CAE)), подростковый/взрослый возраст (ювенильная абсансная эпилепсия (JAE), ювенильная миоклоническая эпилепсия (JME), эпилепсия только с генерализованными тонико-клоническими судорогами, прогрессирующие миоклонические виды эпилепсии (PME), аутосомно-доминантная эпилепсия со слуховыми стимулами (ADEAF), другие виды семейной височной эпилепсии), менее специфическая взаимосвязь с возрастом (семейная фокальная эпилепсия с различными очагами (от детского до взрослого возраста), виды рефлекторной эпилепсии), характерные констелляции (мезиальная височная эпилепсия со склерозом гиппокампа или без него (MTLE с HS или без него), синдром Расмуссена, геластические судороги с гамартомой гипоталамуса, гемиконвульсии-гемиплегия-эпилепсия, виды эпилепсии, которые не подходят ни к одной из этих диагностических категорий, можно отличать сначала на основании наличия или отсутствия известного структурного или метаболического состояния (предполагаемой причины), а затем на основании основного режима начала судорог (генерализованные в сравнении с фокальными)), виды эпилепсии, относимые и сгруппированные по структурно-метаболическим причинам (пороки развития коры головного мозга (гемимегалэнцефалия, гетеротопия и т.д.), нейрокутаные синдромы (комплекс туберозного склероза, Стердж-Вебера и т.д.), опухоль, инфекция, травма, ангиома, перинатальный инсульт, инсульт), виды эпилепсии неизвестной причины и состояния с приступами эпилепсии, которые общепринято не диагностируют как форму эпилепсии саму по себе (доброкачественная неонатальные судороги (BNS), фебрильные судороги (FS))).

В более предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к ингибитору для применения в лечении и/или профилактике эпилепсии, где тип эпилепсии выбран из группы, состоящей из генерализованных судорог, парциальных судорог и судорог неизвестной природы. В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к ингибитору для применения в лечении и/или профилактике височной эпилепсии (TLE).

Термин "активность CSF-1R", как используют в настоящем описании, относится к спектру активности, понимаемой в данной области для CSF-1R, в частности активности CSF-1R человека и его изоформ, например 1, 2, 3 или всех изоформ. Например, связывание лиганда с рецептором индуцирует фосфорилирование CSF-1R по конкретным остаткам тирозина (Bourette R.P., Rohrschneider L.R., 2000, Growth Factors, 17:155-166) и последующий каскад событий передачи сигнала может опосредовать миграцию, выживаемость, дифференцировку и пролиферацию клеток (Suzu S. et al., 1997, J. Immunol., 159, 1860-7; Yeung Y-G, Stanley E.R., 2003, Mol. Cell. Proteomics, 2, 1143-55; Yu W. et al., 2008, J. Leukoc. Biol., 84(3): 852-63). Экспрессия в трансфицированные клетки молекул рецептора мутантного CSF-1R, содержащих остатки фенилаланина вместо выбранных остатков тирозина, выявила связь конкретных остатков

тирозина с конечными результатами для клеток, такими как выживаемость, пролиферация и морфология (Yu et al., *J. Leukoc. Biol.*, 2008, Sep., 84(3):852-863). С использованием подходов на основе протеомики и техники иммуноблоттинга с использованием антител к фосфотирозину совместно со специфическими к молекуле антителами, идентифицировали ряд внутриклеточных молекул, участвующих в опосредовании функций этих клеток после стимуляции лигандом рецептора (Yeung Y-G et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, 13, 273(46):17128-37; Husson H. et al., 1997, *Oncogene* 15, 14(19):2331-8).

Ингибитор активности CSF-1R по настоящему изобретению представляет собой средство, которое препятствует, например снижает/ингибирует, блокирует или конкурирует с активностью CSF-1R, в частности активностью CSF-1R, при неврологическом заболевании. Особенно предпочтительными являются средства, которые препятствуют активности CSF-1R при болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, эпилепсии, эпилептогенезе, судорогах и конвульсиях. Ингибиторы по настоящему изобретению могут частично или полностью ингибировать активность CSF-1R. Пригодные в настоящем изобретении ингибиторы включают без ограничения ингибиторы, которые способны взаимодействовать с (например, связываться или распознавать) IL-34, CSF-1 или рецептор CSF-1 (CSF-1R) или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую IL-34, CSF-1 или CSF-1R, или способны ингибировать экспрессию IL-34, CSF-1 или CSF-1R, или способны ингибировать взаимодействие CSF-1R и CSF-1 и/или IL-34. Такие ингибиторы могут представлять собой, без ограничения, антитела, нуклеиновые кислоты (например, ДНК, РНК, антисмысловую РНК и миРНК), углеводы, липиды, белки, полипептиды, пептиды, пептидомиметики и другие лекарственные средства.

Примеры подходящих ингибиторов включают, но не ограничиваются ими, синтетический функциональный фрагмент рецептора CSF-1, который связывается с CSF-1 и препятствует связыванию нативного рецептора CSF-1, синтетический функциональный фрагмент CSF-1, который связывается с рецептором CSF-1 и препятствует связыванию с нативным рецептором CSF-1, синтетический функциональный фрагмент IL-34, который связывается с рецептором CSF-1 и препятствует связыванию с нативным рецептором CSF-1, антитело, которое связывается с CSF-1, или IL-34, или с рецептором CSF-1 и препятствует взаимодействию рецептор CSF-1-лиганд, антисмысловую молекулу нуклеиновой кислоты, которая специфически гибридизуется с иРНК, кодирующей CSF-1, IL-34 или рецептор CSF-1, или другое лекарственное средство, которое ингибирует активность IL-34, CSF-1 или CSF-1R.

Ингибиторы активности рецептора CSF-1 известны в данной области, также как известны способы идентификации и получения таких ингибиторов. Описаны нейтрализующие антитела к CSF-1, например, в Weir et al., 1996, *J. Bone Miner. Res.*, 1, 1474-1481; и Haran-Ghera et al., 1997, *Blood*, 89, 2537-2545, которые также описывают антитела к CSF-1R. Также были описаны антисмысловые антагонисты CSF-1 (EP 1223980).

Средства, которые могут являться подходящими ингибиторами, можно выбирать из широкого спектра средств-кандидатов. Примеры средств-кандидатов включают, но не ограничиваются ими, нуклеиновые кислоты (например, ДНК и РНК), углеводы, липиды, белки, полипептиды, пептиды, пептидомиметики и другие лекарственные средства. Средства можно получать с использованием любого из многих подходов в комбинаторной библиотеке известными в данной области способами, включая биологические библиотеки; пространственно-адресуемые параллельные твердофазные или жидкофазные библиотеки; способами синтеза библиотек, для которых необходима деконволюция; способом получения библиотеки "одна гранула - одно соединение" и способами синтеза библиотека с использованием отбора аффинной хроматографией. Подход биологических библиотек является пригодным для пептидных библиотек, тогда как другие четыре подхода являются применимыми для пептидных, непептидных олигомерных или библиотек соединений (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.*, 12:145; US 5738996 и US 5807683).

Примеры подходящих основанных на настоящем описании способов синтеза молекулярных библиотек можно найти в данной области, например, в DeWitt et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:6909; Erb et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:11422; Zuckermann et al., 1994, *J. Med. Chem.*, 37:2678; Cho et al., 1993, *Science* 261:1303; Carrell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:2059; Carrell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:2061; и Gallop et al., 1994, *J. Med. Chem.*, 37:1233.

Библиотеки соединений могут содержаться, например, в растворе (например, Houghten, 1992, *Bio/Techniques*, 13:412-421), или на гранулах (Lam, 1991, *Nature*, 354:82-84), чипах (Fodor, 1993, *Nature*, 364:555-556), бактериях (US 5223409), спорах (US 5571698, 5403484 и 5223409), плазмидах (Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:1865-1869) или фаре (Scott and Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87:6378-6382; и Felici, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:301-310).

В одном из примеров ингибитор для применения в настоящем изобретении может представлять собой нуклеиновую кислоту. В частности, молекулы нуклеиновой кислоты CSF-1, IL-34 или CSF-1R можно использовать в качестве антисмысловых молекул для изменения экспрессии соответствующих им полипептидов путем связывания с комплементарными нуклеиновыми кислотами.

Нуклеиновые кислоты CSF-1, IL-34 или CSF-1R можно получать стандартными способами клонирования, например, из геномной ДНК или кДНК или можно синтезировать хорошо известным и коммерчески доступными способами. Нуклеиновые кислоты CSF-1, IL-34 или CSF-1R могут содержать одну

или более замен, добавления или делеции нуклеотида в нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты CSF-1, IL-34 или CSF-1R. Можно использовать известные специалистам в данной области стандартные способы для введения мутаций, включая, например, сайт-специфический мутагенез и опосредованный ПЦР мутагенез. Антисмысловые нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением относятся к нуклеиновой кислоте CSF-1, IL-34 или CSF-1R, способной гибридизоваться вследствие определенной комплементарности последовательности участку РНК (предпочтительно иРНК), кодирующему соответствующий полипептид. Антисмысловая нуклеиновая кислота может быть комплементарной кодирующей и/или некодирующей области иРНК, кодирующей такой полипептид. Наиболее предпочтительно антисмысловые нуклеиновые кислоты приводят к ингибированию экспрессии полипептида CSF-1, IL-34 или CSF-1R. Настоящее изобретение также относится к ингибитору активности CSF-1R для применения в лечении и/или профилактике являющегося человеком индивидуума, страдающего или подвергающегося риску развития неврологического заболевания, включающего введение индивидууму терапевтически эффективного количества ингибитора активности CSF-1R, который представляет собой выделенную ДНК, содержащую по меньшей мере восемь нуклеотидов (например, от 15 до 22 нуклеотидов, таких как 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 нуклеотида), которые являются антисмысловыми по отношению к гену или кДНК, кодирующей полипептид CSF-1, IL-34 или CSF-1R.

В одном из вариантов осуществления ингибитор для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания представляет собой антитело, которое взаимодействует с (т.е. связывается или распознает) CSF-1 или IL-34. В другом варианте осуществления антитело избирательно взаимодействует с CSF-1 или IL-34. Избирательное взаимодействие (например, распознавание или связывание) означает, что антитело обладает большей аффинностью к полипептидам CSF-1 или IL-34 чем к другим полипептидам. Примеры подходящих антител представляют собой антитела, которые ингибируют активность CSF-1 или IL-34 путем связывания CSF-1 или IL-34 таким образом, чтобы препятствовать ему являться биологически активным, например, предотвращая связывание CSF-1 или IL-34 со своим рецептором.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к ингибитору для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания, где антитело, или его фрагмент, или производное связывается с CSF-1R. Наиболее предпочтительно ингибитор для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания представляет собой антитело, которое взаимодействует с (т.е. связывается с или распознает) CSF-1R и ингибирует активность CSF-1R. В одном из вариантов осуществления антитело избирательно взаимодействует с CSF-1R. Избирательное взаимодействие с (например, распознавание или связывание с) означает, что антитело обладает большей аффинностью к полипептиду CSF-1R, чем к другим полипептидам. Примеры подходящих антител представляют собой антитела, которые ингибируют активность CSF-1R путем связывания с CSF-1R таким образом, чтобы препятствовать ему являться биологически активным.

В одном из вариантов осуществления антитело распознает изоформы CSF-1R, например CSF-1R человека и его изоформы.

В одном из вариантов осуществления ингибитор активности CSF-1R для применения в лечении и/или профилактике неврологических заболеваний в соответствии с настоящим изобретением блокирует связывание CSF-1 с рецептором CSF-1R.

"Блокирование", как применяют в настоящем описании, относится к физическому блокированию, такому как закрытие рецептора, но также включает случаи, когда антитело или фрагменты связываются с эпитопом, который вызывает, например, конформационное изменение, что означает, что природный лиганд к рецептору больше не связывается. (Обозначается в настоящем описании как аллостерическое блокирование или аллостерическое ингибирование.)

В одном из вариантов осуществления антитела по настоящему изобретению связываются со всеми изотипами CSF-1R, например изотипами с вариантами в домене ECD, такими как V23G, A245S, H247P, V279M и сочетаниями двух, трех или четырех указанных вариантов. CSF-1 и IL-34 представляют собой лиганды CSF-1R, и антитела для применения в изобретении предпочтительно ингибируют активность CSF-1 и IL-34 при функциональном скрининге клеток. Антитела для применения по настоящему изобретению также предпочтительно не вызывают активации CSF-1R и/или интернализации CSF-1R.

Анализы, подходящие для определения способности антитела блокировать CSF-1R, описаны в примерах в настоящем описании (см. пример 2).

ВIAcore является примером анализа, применяемым для измерения кинетики связывания, анализы ELISA или анализы на основе клеток, в которых применяют моноциты или клетки THP-1, также могут являться пригодными. CSF-1 и IL-34 представляют собой лиганды CSF-1R, и антитело к CSF-1R может блокировать связывание CSF-1 или IL-34 с CSF-1R, но предпочтительно блокирует связывание CSF-1 и IL-34 с CSF-1R. Антитело к CSF-1R также предпочтительно не вызывает активации CSF-1R или интернализации CSF-1R. Анализ, подходящий для определения способности антитела вызывать активацию CSF-1R или интернализацию CSF-1R, описаны в примерах; см. пример 2, в котором описывают анализ, в котором измеряют зависящую от CSF-1 пролиферацию.

Полипептиды CSF-1, IL-34 или CSF-1R или клетки, экспрессирующие указанные полипептиды,

можно использовать для получения антител, которые специфически распознают указанные полипептиды.

Полипептиды CSF-1, IL-34 и CSF-1R могут представлять собой "зрелые" полипептиды или их биологически активные фрагменты или производные. Предпочтительно полипептид CSF-1 содержит аминокислоты 1-149, которые как полагают, являются важными для биологической активности.

CSF-1R, как применяют в настоящем описании, относится к белку, называемому CSF-1R (как приведено в SEQ ID NO: 11), его изоформам и биологически активным фрагментам. В SEQ ID NO: 11 приведена полная аминокислотная последовательность CSF-1 человека длиной 972 аминокислот, где остатки 1-19 представляют собой теоретически рассчитанный сигнальный пептид. Предпочтительно полипептид CSF-1R содержит аминокислоты 20-517 человека, которые представляют собой теоретически рассчитанную внеклеточную область последовательности CSF-1R. Известны альтернативные формы CSF-1R. В одном из вариантов осуществления CSF-1R представляет собой белок человека или его изоформу. Как правило, применяемое в настоящем изобретении антитело направлено на внеклеточный домен CSF-1R. CSF-1R человека, как приведено на фиг. 2 (SEQ ID NO: 15), зарегистрировано в базе данных UniProt под номером P07333.

Полипептид CSF-1 и CSF-1R можно получать хорошо известными в данной области способами из генетически конструируемых клеток-хозяев, содержащих экспрессирующие системы, или их можно выделять из природных биологических источников. В одном из вариантов осуществления последовательность, приведенную на фиг. 2 (SEQ ID NO: 15), можно трансфицировать в подходящую линию клеток и экспрессировать полипептид на поверхности клеток. Фрагмент аминокислоты можно сливать с GPI-якорем для облегчения указанной экспрессии. Затем можно применять клетки для иммунизации хозяев.

В настоящей заявке термин "полипептиды" включает пептиды, полипептиды и белки. Их используют взаимозаменяемо, если не указано иное. Полипептиды CSF-1, IL-34 или CSF-1R в некоторых случаях могут являться частью более крупного белка, такого как слитый белок, например слитый с аффинной меткой.

Антитела, образуемые против этих полипептидов, можно получать введением полипептидов, или клетками, экспрессирующими тоже самое у животного, предпочтительно не являющегося человеком животного, с применением хорошо известных и общепринятых протоколов (см., например, *Handbook of Experimental Immunology*, D.M. Weir (ed.), vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Многих теплокровных животных, таких как кролики, мыши, крысы, овцы, коровы или свиньи, можно иммунизировать. Однако в основном предпочтительными являются мыши, кролики, свиньи и крысы.

В одном из вариантов осуществления ингибитор, предоставленный настоящим изобретением, представляет собой антитело, или его функционально активный фрагмент, или производное. В другом варианте осуществления ингибитор, предоставленный настоящим изобретением, представляет собой моноклональное или поликлональное антитело. В другом варианте осуществления ингибитор, предоставленный настоящим изобретением, представляет собой антитело, или его фрагмент, или производное, которое представляет собой химерное, гуманизированное антитело или антитело человека.

Моноклональные антитела можно получать любым известным в данной области способом, таким как способ гибридом (Kohler & Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497), способ триомы, способ гибридом В-клеток человека (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today*, 4:72) и способ EBV-гибридом (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, p. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Антитела для применения в изобретение также можно получать способами получения антитела на основе отдельного лимфоцита посредством клонирования и экспрессии кДНК вариабельной области иммуноглобулина, получаемой из отдельных лимфоцитов, отбираемых по продукции специфических антител, например, способами, описанными Babcook, J. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93(15):7843-7848, WO 92/02551 и WO 2004/051268 и WO 2004/106377.

Как применяют в настоящем описании, "специфическое" предназначено для обозначения антитела, которое распознает только антиген, к которому оно является специфическим, или антитело, которое обладает существенно большей аффинностью связывания с антигеном, к которому оно является специфическим по сравнению с антигенами, к которым оно не является специфическим, например по меньшей мере в 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз большей аффинностью связывания.

Химерные антитела представляют собой такие антитела, кодируемые генами иммуноглобулина, которые генетически конструировали таким образом, что гены легких и тяжелых цепей состоят из сегментов гена иммуноглобулина, принадлежащих различным видам. Такие химерные антитела, вероятно, являются менее антигенными. Бивалентные антитела можно получать известными в данной области способами (Milstein et al., 1983, *Nature*, 305:537-539; WO 93/08829, Traunecker et al., 1991, *EMBO J.*, 10:3655-3659). Поливалентные антитела могут обладать множественными специфичностями или могут являться моноспецифическими (см., например, WO 92/22853).

Как используют в настоящем описании, термин "гуманизированная молекула антитела" относится к молекуле антитела, где тяжелая и/или легкая цепь содержит одну или более CDR (включая, при желании, одну или более модифицированных CDR) из донорного антитела (например, моноклонального антитела мыши), пересаженную в каркасную область вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи акцептор-

ного антитела (например, антитела человека) (см., например, US 5585089; WO 91/09967). Для обзора см. Vaughan et al., *Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998.

В одном из вариантов осуществления вместо переноса полной CDR в каркасную область человека переносят только один или более определяющих специфичность остатков из любой из CDR, описываемых в настоящем описании выше (см., например, Kashmiri et al., 2005, *Methods*, 36, 25-34). В одном из вариантов осуществления в каркасную область человека переносят только определяющие специфичность остатки из одной или более CDR, описываемых в настоящем описании выше. В другом варианте осуществления в каркасную область человека переносят только определяющие специфичность остатки из каждой из CDR, описываемых в настоящем описании выше.

В гуманизованном антителе по настоящему изобретению каркасные области не обязательно должны иметь точно такие же последовательности как каркасные области акцепторного антитела. Например, редко встречающиеся остатки можно заменять на более часто встречающиеся остатки для такого класса или типа акцепторной цепи. Альтернативно отобранные остатки в акцепторных каркасных областях можно заменять таким образом, чтобы они соответствовали остатку, встречающемуся в том же положении в донорном антителе (см. Reichmann et al., 1998, *Nature*, 332, 323-324). Такие замены следует сводить к минимуму для восстановления аффинности донорного антитела. Протокол для отбора остатков в акцепторных каркасных областях, которые могут потребовать замены, указаны в WO 91/09967.

Когда CDR или определяющие специфичность остатки пересаживают, можно использовать любую подходящую акцепторную последовательность каркаса вариабельной области, учитывая класс/тип донорного антитела, из которого получают CDR, включая каркасные области мыши, примата и человека.

Соответственно гуманизованное антитело содержит вариабельный домен, содержащий акцепторные каркасные области человека, а также одну или более CDR. Таким образом, один из вариантов осуществления относится к гуманизованному антителу, которое связывается с CSF-1, IL-34 или CSF-1R человека, где вариабельный домен содержит акцепторные каркасные области человека и не принадлежащие человеку донорные CDR.

Примеры каркасных областей человека, которые можно использовать в настоящем изобретении, представляют собой KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Rabat et al., выше). Например, KOL и NEWM можно использовать для тяжелой цепи, REI можно использовать для легкой цепи и EU, LAY и POM можно использовать как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи. Альтернативно можно использовать последовательности зародышевой линии человека; эти последовательности являются доступными на сайте: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>.

В гуманизованном антителе по настоящему изобретению акцепторные тяжелые и легкие цепи необязательно необходимо получать из одного и того же антитела и при желании они могут содержать составные цепи, содержащие каркасные области, получаемые из различных цепей.

Антитела для применения в настоящем изобретении также можно получать различными известными в данной области способами фагового дисплея, и они включают способы, описанные Brinkman et al. (*J. Immunol. Methods*, 1995, 182:41-50), Ames et al. (*J. Immunol. Methods*, 1995, 184:177-186), Kettleborough et al. (*Eur. J. Immunol.*, 1994, 24:952-958), Persic et al. (*Gene*, 1997, 187, 9-18), Burton et al. (*Advances in Immunology*, 1994, 57:191-280) и WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 и US 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108. Способы получения одноцепочечных антител, такие как способы, описанные в US 4946778, также можно адаптировать для получения одноцепочечных антител к полипептидам CSF-1, IL-34 или CSF-1R. Также для экспрессии гуманизованных антител можно использовать трансгенных мышей или другие организмы, включая других млекопитающих.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к ингибитору активности CSF-1R, который представляет собой антитело, или его фрагмент, или производное, которое является биспецифическим или полиспецифическим. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания можно выбирать из группы, состоящей из полной молекулы антитела, содержащей полноразмерные тяжелые и легкие цепи, или его фрагмента, выбранного из группы, содержащей Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменные антитела (например, VH, или VL, или VHH), scFv, би-, три- или тетравалентные антитела, Bis-scFv, диатела, триотела, тетратела и связывающие эпитоп фрагменты любого из указанных выше (см., например, Holliger&Hudson, 2005, *Nature Biotech.*, 23(9):1126-1136; Adair&Lawson, 2005, *Drug Design Reviews - Online - Online* 2(3), 209-217).

Способы разработки и производства этих фрагментов антител хорошо известны в данной области (см., например, Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Другие фрагменты антител для применения в настоящем изобретении включают Fab и фрагменты Fab', описанные в международных патентных заявках WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171. Поливалентные антитела могут обладать множественной специфичностью, например могут являться биспецифическими или могут являться моноспецифическими (см., например, WO 92/22853, WO 05/113605, WO 2009/040562 и WO 2010/035012).

В одном из вариантов осуществления антитело предоставлено в виде слитого белка связывающего CSF-1, IL-34 или CSF-1R антитела, который содержит фрагмент молекулы иммуноглобулина, например фрагмент Fab или Fab', и одно или два однодоменных антитела (dAb), связанных непосредственно или опосредованно с ним, например, как описано в WO 2009/040562, WO 2010/035012, WO 2011/030107, WO 2011/061492 и WO 2011/086091, которые все включены в настоящее описание посредством ссылки.

В одном из вариантов осуществления слитый белок содержит антитела с двумя доменами, например, в виде спаривания вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), необязательно связанного дисульфидной связью.

В одном из вариантов осуществления элемент Fab или Fab' слитого белка обладает такой же или сходной специфичностью, как и однодоменное антитело или антитела. В одном из вариантов осуществления Fab или Fab' обладает отличной специфичностью по сравнению с однодоменным антителом или антителами и, таким образом, слитый белок является поливалентным. В одном из вариантов осуществления поливалентный слитый белок по настоящему изобретению содержит участок связывания альбумина, например пара VH/VL в нем представляет собой участок связывания альбумина.

Фрагменты антител и способы их получения хорошо известны в данной области; см., например, Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181. Конкретные примеры фрагментов антител для применения в настоящем изобретении представляют собой фрагменты Fab', которые содержат нативную или модифицированную шарнирную область. Ряд модифицированных шарнирных областей уже был описан, например, в US 5677425, WO 99/15549 и WO 98/25971, и эти патентные заявки включены в настоящее описание посредством ссылки. Дополнительные примеры конкретных фрагментов антител для применения в настоящем изобретении включают фрагменты антител, описанные в международных патентных заявках PCT/GB2004/002810, PCT/GB2004/002870 и PCT/GB2004/002871 (все зарегистрированные 1 июля 2004 г.). В частности, предпочтительными являются модифицированные фрагменты Fab антитела, описанные в международной патентной заявке PCT/GB2004/002810.

В одном из вариантов осуществления тяжелая цепь антитела содержит домен CH1 и легкая цепь антитела содержит домен CL каппа или лямбда.

В одном из вариантов осуществления тяжелая цепь антитела содержит домен CH1, домен CH2 и домен CH3 и легкая цепь антитела содержит домен CL каппа или лямбда.

Домены константной области молекулы антитела по настоящему изобретению в случае наличия можно выбирать с учетом предполагаемой функции молекулы антитела и конкретно эффекторных функций, которые могут являться необходимыми. Например, домены константной области могут представлять собой домены IgA, IgD, IgE, IgG или IgM человека. В частности, можно использовать домены IgG человека константной области, особенно изоформ IgG1 и IgG3, когда молекула антитела предназначена для терапевтических применений, и необходимыми являются эффекторные функции антитела. Альтернативно можно использовать изоформы IgG2 и IgG4, когда молекула антитела предназначена для терапевтических целей и эффекторные функции антитела не являются необходимыми.

В конкретном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело IgG2 или IgG4. Следует понимать, что также можно использовать варианты последовательности этих доменов константной области. Например, можно использовать молекулы IgG4, в которых серии в положении 241 заменяли пролином, как описано у Angal et al., 1993, *Molecular Immunology*, 1993, 30:105-108. Единственная замена аминокислоты устраняет гетерогенность химерного антитела мыши/человека IgG4. В *Mol. Immunol.*, 30:105-108, описан подход сайт-направленного мутагенеза для сведения к минимуму образования полумолекул антител IgG4. В этой публикации замена одной аминокислоты в центральном шарнире S241P приводила к значительно меньшему образованию полумолекул. Таким образом, в одном из вариантов осуществления, где антитело представляет собой антитело IgG4, антитело может содержать мутацию S241P. Дифференциальная индукция ADCC различными изоформами IgG зависит от аффинности этих остатков к FcγR. Известно, что у людей IgG1 и IgG3 индуцируют эффекторные функции, тогда как IgG2 и IgG4 слабо индуцируют эффекторные функции. В предпочтительном варианте осуществления антитело для применения в настоящем изобретении представляет собой IgG2 или антитело IgG4, которое слабо индуцирует эффекторные функции, включая ADCC. Особенно предпочтительным для антитела для применения в лечении неврологического заболевания в настоящем изобретении является то, чтоб оно обладало ограниченной эффекторной функцией, т.к. применение антитела с эффекторной функцией может вызывать усиленное истощение клеток, экспрессирующих CSF-1R, что, вероятно, может добавляться к побочным эффектам у пациента.

Специалисту в данной области также будет понятно, что антитела могут претерпевать ряд посттрансляционных модификаций. Тип и степень таких модификаций часто зависит от линии клеток-хозяев, используемых для экспрессии антитела, а также условий культивирования. Такие модификации могут включать изменения гликозилирования, окисления метионина, образования дикетопиперазина, изомеризацию аспартата и дезамидирование аспарагина. Широко распространенной модификацией является утрата основного остатка С-конца (такого как лизин или аргинин) вследствие действия карбоксипептидаз (как описано у Harris R.J. *Journal of Chromatography*, 705:129-134, 1995). Таким образом, лизин на

С-конце тяжелой цепи антитела может отсутствовать.

В другом варианте осуществления ингибиторы активности CSF-1R, которые можно использовать при лечении и/или профилактики неврологического заболевания, представляют собой антитело, или его фрагмент, или производное, которое проходит через гематоэнцефалический барьер (BBB), достигая в головном мозге терапевтически эффективного количества, достаточного для лечения и/или профилактики пациента, страдающего неврологическим заболеванием.

Как используют в настоящем описании, термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству терапевтического средства, необходимому для лечения, улучшения состояния или профилактики целевого заболевания или состояния, или для проявления детектируемого терапевтического, фармакологического или профилактического эффекта. Для любого антитела терапевтически эффективное количество можно оценивать первоначально в анализах на культурах клеток или на моделях на животных, как правило на грызунах, кроликах, собаках, свиньях или приматах. Модель на животных также можно использовать для определения подходящего диапазона концентраций и пути введения. Затем такую информацию можно использовать для определения подходящих доз и путей введения у людей.

Точное терапевтически эффективное количество для являющегося человеком индивидуума зависит от тяжести состояния болезни, общего состояния здоровья индивидуума, возраста, массы и пола индивидуума, питания, времени и частоты введения, комбинации(й) лекарственных средств, аллергических реакций и переносимости/ответной реакции на терапию. Это количество можно определять общепринятым экспериментированием, и оно зависит от решения врача. Как правило, терапевтически эффективное количество составляет от 0,01 до 500 мг/кг, например от 0,1 до 200 мг/кг, такое как 100 мг/кг.

В другом варианте осуществления ингибитор для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания представляет собой антитело, или его фрагмент, или производное, содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну из CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 для CDR-H2 и CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6 для CDR-H3.

Настоящее изобретение также относится к ингибитору для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания, где антитело, или его фрагмент, или производное содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где вариабельный домен легкой цепи содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3.

В другом варианте осуществления ингибитор для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания представляет собой ингибитор, содержащий тяжелую цепь и легкую цепь, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 для CDR-H2, и CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6 для CDR-H3, и где вариабельный домен легкой цепи содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3.

В другом варианте осуществления ингибитор для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания представляет собой ингибитор, где тяжелая цепь содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9.

Настоящее изобретение также относится к ингибитору для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания, где легкая цепь содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

Настоящее изобретение также относится к ингибитору для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания, содержащем тяжелую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

В одном из аспектов настоящего изобретения предоставлено антитело к CSF-1R, или его связывающий фрагмент, или производное, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит три CDR, и последовательность CDR-H1 обладает по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% идентичностью или сходством с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-H2 обладает по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% идентичностью или сходством с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-H3 обладает по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% идентичностью или сходством с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 6. Предпочтительно антитело к CSF-1R или его связывающий фрагмент, дополнительно содержащий легкую цепь, где вариабельный домен легкой цепи содержит три CDR, и последовательность CDR-L1 обладает по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% идентичностью или сходством с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-L2 обладает по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% идентичностью или сходством с после-

довательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2, и последовательность CDR-L3 обладает по меньшей мере 60% идентичностью или сходством с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3. В одном из вариантов осуществления предоставлены вариабельные области по меньшей мере с 60, 70, 80, 90 или 95% идентичностью или сходством с последовательностью вариабельной области, описываемой в настоящем описании.

Как используют в настоящем описании, "идентичность" означает то, что в любом конкретном положении в выравниваемых последовательностях аминокислотный остаток является идентичным в последовательностях. Как используют в настоящем описании, "сходство" означает, что в любом конкретном положении в выравниваемых последовательностях аминокислотный остаток является остатком аналогичного типа в последовательностях. Например, лейцин можно заменять изолейцином или валином. Другие аминокислоты, которые можно, как правило, заменять другой аминокислотой, включают, но не ограничены ими,

фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, содержащие ароматические боковые цепи);
лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, содержащие основные боковые цепи);
аспартат и глутаминат (аминокислоты, содержащие кислые боковые цепи);
аспарагин и глутамин (аминокислоты, содержащие амидные боковые цепи); и
цистеин и метионин (аминокислоты, содержащие боковые цепи, содержащие серу).

Степень идентичности и сходства можно легко вычислять (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M., Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, программное обеспечение BLAST™, доступное от NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W.&States, D.J., 1993, Nature Genet., 3:266-272; Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol., 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402; Zhang, J.&Madden, T.L., 1997, Genome Res., 7:649-656).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения ингибитор для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания представляет собой ингибитор, где антитело, или его фрагмент, или производное обладает аффинностью связывания $[K_D]$ с CSF-1R человека 10 пМ или менее 10 пМ, как определяют способом BIAcore.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения ингибитор для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания представляет собой ингибитор, где антитело, или его фрагмент, или производное перекрестно блокирует связывание антитела к CSF-1R с аффинностью $[K_D]$ 100 пМ или менее, как определяют способом BIAcore.

Антитело, или его фрагмент, или производное по настоящему изобретению соответственно обладает высокой аффинностью связывания. Аффинность можно измерять с применением любого подходящего известного в данной области способа, включая способы, такие как поверхностный плазмонный резонанс, например BIAcore, с применением выделенного природного или рекомбинантного CSF-1R или подходящего слитого белка/полипептида. Например, аффинность можно измерять с применением внеклеточного домена рекомбинантного CSF-1R человека. Пригодный внеклеточный домен рекомбинантного CSF-1R человека может являться мономером. Соответственно молекулы антител для применения по настоящему изобретению обладают аффинностью связывания к выделенному CSF-1R человека приблизительно 1 нМ или менее 1 нМ. В одном из вариантов осуществления молекула антитела по настоящему изобретению обладает аффинностью связывания приблизительно 500 пМ или ниже. В одном из вариантов осуществления молекула антител по настоящему изобретению обладает аффинностью связывания приблизительно 250 пМ или ниже. В одном из вариантов осуществления молекула антител по настоящему изобретению обладает аффинностью связывания приблизительно 200 пМ или ниже. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к антителу к CSF-1R с аффинностью связывания приблизительно 100 пМ или ниже. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу к CSF-1R с аффинностью связывания приблизительно 100 пМ или ниже, предпочтительно приблизительно 10 пМ или ниже, более предпочтительно приблизительно 5 пМ или ниже. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу к CSF-1R с аффинностью связывания приблизительно 100 пМ или ниже, предпочтительно приблизительно 10 пМ или ниже, более предпочтительно приблизительно 5 пМ или ниже.

Чем ниже числовое значение аффинности, тем выше аффинность антитела или фрагмента к антигену.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения ингибитор для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания представляет собой ингибитор, где антитело, или его фрагмент, или производное перекрестно блокирует связывание путем связывания с тем же эпитопом, что и антитело, которое он блокирует. Примеры подходящих анализов перекрестного блокирования описаны в WO 15/028455.

Настоящее изобретение также относится к ингибитору для применения в лечении и/или профилак-

тике неврологического заболевания, где антитело, или его фрагмент, или производное конкурирует с антителом, или его фрагментом, или производным антитела к CSF-1R за связывание с внеклеточным доменом человека c-fms SEQ ID NO: 15.

Термин "конкурирует" при использовании в отношении антигенсвязывающих белков (например, нейтрализующих антигенсвязывающих белков или нейтрализующих антител), которые конкурирует за тот же эпитоп, означает конкуренцию между антигенсвязывающими белками, которую определяют анализом, в котором антигенсвязывающий белок (например, антитело, или его иммунологически функциональный фрагмент, или производное) в тесте предотвращает или ингибирует специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка (например, лиганда или эталонного антитела) с общим антигеном (например, c-fms или его фрагментом). Можно использовать различные типы анализов конкурентного связывания, например твердофазный прямой или опосредованный радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или опосредованный ферментативный иммунологический анализ (EIA), анализ конкурентного связывания в формате "сэндвич" (см., например, Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology*, 2:242-253); твердофазный прямой EIA с биотин-авидином (см., например, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.*, 137:3614-3619), твердофазный прямой анализ с меткой, твердофазный прямой анализ с меткой в формате "сэндвич" (см., например, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой RIA с меткой с использованием метки 1-125 (см., например, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.*, 25:7-15); твердофазный прямой EIA с биотин-авидином (см., например, Cheung et al., 1990, *Virology*, 176:546-552) и прямой RIA с меткой (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.*, 32:77-82). Как правило, такой анализ включает использование очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью или клетками, несущими любой из них, немеченый тестируемый антигенсвязывающий белок и меченый эталонный антигенсвязывающий белок. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клеткой в присутствии тестируемого антигенсвязывающего белка. Как правило, тестируемый антигенсвязывающий белок присутствует в избытке.

Антигенсвязывающие белки, идентифицируемые конкурентным анализом (конкурирующие антигенсвязывающие белки), включают антигенсвязывающие белки, связывающиеся с тем же эпитопом, что эталонные антигенсвязывающие белки, и антигенсвязывающие белки, связывающиеся с прилежащим эпитопом, достаточной близким к эпитопу, связанному эталонным антигенсвязывающим белком, для возникновения стерического препятствия. Как правило, когда конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке, он ингибирует специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном по меньшей мере на 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75%. В некоторых случаях связывание ингибируют по меньшей мере на 80, 85, 90, 95 или 97% или более.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения ингибитор для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания представляет собой ингибитор, который связывается с эпитопом CSF-1R человека в качестве ингибитора антитела к CSF-1R.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения ингибитор для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания представляет собой антитело, которое связывается с эпитопом CSF-1R человека.

Такую конкретную область или эпитоп полипептида CSF-1, IL-34 или CSF-1R человека можно определять любым подходящим известным в данной области способом картирования эпитопов в комбинации с любым из антител, предоставленных настоящим изобретением. Примеры таких способов включают скрининговые пептиды различной длины, получаемые из CSF-1R, для связывания с антителом по настоящему изобретению с наименьшим фрагментом, который может специфически связываться с антителом, содержащим последовательность эпитопа, распознаваемого антителом. Пептиды CSF-1, IL-34 или CSF-1R можно получать синтетически или протеолитическим расщеплением полипептида CSF-1, IL-34 или CSF-1R. Пептиды, которые связываются с антителом, можно идентифицировать, например, масс-спектроскопическим анализом. В другом примере для идентификации эпитопа, связанного антителом по настоящему изобретению, можно использовать ЯМР-спектроскопию или рентгеноструктурную кристаллографию; после идентификации эпитопного фрагмента, который связывается с антителом по настоящему изобретению, при необходимости в качестве иммуногена для получения дополнительных антител, которые связываются с тем же эпитопом.

Биологические молекулы, такие как антитела или фрагменты содержат кислые и/или основные функциональные группы, таким образом обеспечивая молекуле положительный или отрицательный заряд. Количество суммарно "наблюдаемого" заряда будет зависеть от абсолютной аминокислотной последовательности соединения, локального окружения заряженных групп в 3D-структуре и условиях окружающей среды молекулы. Изoeлектрическая точка (pI) представляет собой pH, при котором конкретная молекула или ее поверхность, доступная для растворителя, не несет никакого электрического заряда. В одном из примеров антитела к CSF-1, IL-34 или CSF-1R и его фрагменты можно конструировать так, чтобы они обладали соответствующей изoeлектрической точкой. Это может приводить к антителам и/или фрагментам с более устойчивыми свойствами, в частности с подходящими параметрами растворимости и/или стабильности и/или улучшенными характеристиками очистки.

Таким образом, в одном из аспектов изобретение относится к гуманизированному антителу к CSF-1, IL-34 или CSF-1R, конструируемому так, чтобы оно обладало изоэлектрической точкой, отличной от изоэлектрической точки первоначально идентифицированного антитела. Например, антитело можно конструировать заменой аминокислотного остатка, таким образом как заменой кислотного аминокислотного остатка одним или более основными аминокислотными остатками. Альтернативно, можно вводить основные аминокислотные остатки или можно удалять кислые аминокислотные остатки. Альтернативно, если молекула обладает неприемлемо высоким значением pI, можно вводить кислые остатки для понижения pI при необходимости. Важным является то, что при манипуляции pI необходимо соблюдать осторожность, чтобы сохранить требуемую активность антитела или фрагмента. Таким образом, в одном из вариантов осуществления конструируемое антитело или фрагмент имеет такую же или по существу такую же активность как "немодифицированное" антитело или фрагмент.

Для теоретического расчета изоэлектрической точки антитела или фрагмента можно использовать программы, такие как ExPASy (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html и http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html).

Следует понимать, что аффинность антител, предоставленных настоящим изобретением, можно изменять любым подходящим известным в данной области способом. Таким образом, настоящее изобретение также относится к вариантам молекул антител по настоящему изобретению, которые обладают улучшенной аффинностью к CSF-1, IL-34 или CSF-1R. Такие варианты можно получать с использованием ряда протоколов созревания аффинности, включая мутирование CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), перестановку цепей (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), использование штаммов-мутаторов E.coli (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), перестановку ДНК (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), фаговый дисплей (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) и ПЦР с имитацией генетической рекомбинации (Cramer et al., Nature, 391, 288-291, 1998). У Vaughan et al. (выше) описаны эти способы созревания аффинности.

При желании антитело для применения в настоящем изобретении можно конъюгировать с одной или более эффекторных молекул. Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к антителу для применения в лечении и/или профилактики неврологического заболевания, где антитело, или его фрагмент, или производное конъюгировано с одной или более эффекторных молекул.

Следует понимать, что эффекторная молекула может включать одну эффекторную молекулу или два или более таких молекул, таким образом связанных, чтобы образовывать один фрагмент молекулы, который можно присоединять к антителу по настоящему изобретению.

В случае когда желательным является получение фрагмента антитела, связанного с эффекторной молекулой, его можно получать стандартными химическими способами или способами рекомбинантной ДНК, в которых фрагмент антитела связывают непосредственно или через связывающее средство с эффекторной молекулой. Способы конъюгации таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области (см. Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2nd ed., Robinson et al., eds., 1987, p. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58; и Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Конкретные химические способы включают, например, способы, описанные в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03/031581. Альтернативно, когда эффекторная молекула представляет собой белок или полипептид, связь можно получать способами рекомбинантной ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP 0392745.

Как используют в настоящем описании, термин эффекторная молекула включает, например, анти-неопластические средства, лекарственные средства, токсины, биологически активные белки, например ферменты, другое антитело или фрагменты антител, синтетические или природные полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, в частности радиоактивный йодид, радиоактивные изотопы, хелатные металлы, наночастицы и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения или соединения, которые можно детектировать спектроскопией ЯМР или ЭПР.

Примеры эффекторных молекул могут включать цитотоксины или цитотоксические средства, включая любое средство, которое является вредным (например, вызывает цитоллиз) для клеток. Примеры включают комбрестатины, доластатины, эпотилоны, стауреспорин, майтанзиноиды, спонгистатины, ризоксин, галихондрины, роридины, гемиастерлины, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромист этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пурамицин и их аналоги или гомологи.

Эффекторные молекулы также включают, но не ограничиваются ими, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие средства (например, мехлоретамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфид, дибромоманнит, стрептозотозин, митомицин С и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее называемый дауномицином) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее называемый актиномицином), блеомицин, митрамицин, антрамицин (АМС), калихимицины или дуокармицины) и антимитотические средства (на-

пример, винкристин и винбластин).

Другие эффекторные молекулы могут включать хелатированные радионуклиды, такие как ^{111}In и ^{90}Y , Lu^{177} , Bi^{213} , Sr^{252} , Ir^{192} и $\text{W}^{188}/\text{Re}^{188}$ или лекарственные средства, такие как, но не ограничиваясь ими, алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин.

Другие эффекторные молекулы включают белки, пептиды и ферменты. Представляющие интерес ферменты включают, но не ограничиваются ими, протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы, трансферазы. Представляющие интерес белки, полипептиды и пептиды включают, но не ограничиваются ими, иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, рицин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин, белок, такой как инсулин, фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, фактор роста тромбоцитов или тканевой активатор плазминогена, тромбическое средство или антиангиогенное средство, например ангиостатин, или эндостатин, или модификатор биологического ответа, такие как лимфокин, интерлейкин 1 (IL-1), интерлейкин 2 (IL-2), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), фактор роста нервов (NGF) или другие факторы роста и иммуноглобулины.

Другие эффекторные молекулы могут включать детектируемые вещества, пригодные, например, в диагностике. Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, биолуминесцентные вещества, радиоактивные нуклиды, испускающие позитрон металлы (для применения в позитронно-эмиссионной томографии) и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов. См. в основном патент США № 4741900 в отношении ионов металлов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в качестве диагностических средств. Подходящие ферменты включают

- пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу;
- подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин;
- подходящие флуоресцентные вещества включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид и фикоэритрин;
- подходящие люминесцентные вещества включают люминол;
- подходящие биолуминесцентные вещества включают люциферазу, люциферин и экворин; и
- подходящие радиоактивные нуклиды включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In и ^{99}Tc .

В другом примере эффекторная молекула может увеличивать время полужизни антитела *in vivo* и/или снижать иммуногенность антитела и/или увеличивать доставку антитела через эпителиальный барьер в иммунную систему. Примеры подходящих эффекторных молекул этого типа включают полимеры, альбумин, связывающие альбумин белки или связывающие альбумин соединения, так как соединения, описанные в WO 05/117984.

В одном из вариантов осуществления время полужизни, обеспечиваемое эффекторной молекулой, которое не зависит от CSF-1R, является преимуществом.

В случае когда эффекторная молекула представляет собой полимер, в основном она может представлять собой синтетический или природный полимер, например необязательно замещенный полиалкиленовый, полиалкениленовый или полиоксиалкиленовый полимер с неразветвленной или разветвленной цепью, или разветвленный или неразветвленный полисахарид, например гомо- или гетерополисахарид.

Конкретные необязательные заместители, которые могут присутствовать на указанных выше синтетических полимерах, включают одну или более гидроксигруппы, метильные группы или метоксигруппы.

Конкретные примеры синтетических полимеров включают необязательно замещенные поли(этиленгликоль), поли(пропиленгликоль) поли(виниловый спирт) с неразветвленными или разветвленными цепями или их производные, особенно необязательно замещенный поли(этиленгликоль), такой как метоксиполи(этиленгликоль) или его производные.

Конкретные природные полимеры включают лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные.

В одном из вариантов осуществления полимер представляет собой альбумин или его фрагмент, такой как сывороточный альбумин человека или его фрагмент.

Как используют в настоящем изобретении, "производные" предназначены включать реакционно-способные производные, например тиол-селективные реакционноспособные группы, такие как малеинимиды и т.п. Реакционноспособные группы можно связывать непосредственно или через линкерный сегмент с полимером. Следует понимать, что остаток такой группы в некоторых случаях образует часть продукта в виде линкерной группы между фрагментом антитела и полимером.

Размер полимера при желании можно изменять, но, как правило, он находится в диапазоне средней молекулярной массы от 500 до 50000 Да, например от 5000 до 40000 Да, такой как от 20000 до 40000 Да. В частности, размер полимера можно выбирать на основании предусматриваемого применения продукта, например способности локализоваться в определенных тканях, таких как головной мозг, опухоли или увеличенное время полужизни в кровотоке (для обзора см. Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Таким образом, например, в случае когда продукт предназначен для того, чтобы выходить из кровотока и проникать в ткань, например, для применения в лечении головного мозга или опухоли, предпочтительным может являться применение полимера с небольшой молекулярной массой, на-

пример с молекулярной массой приблизительно 5000 Да. Для применений в случаях, когда продукт остается в кровотоке, предпочтительным может являться применение полимера с большей молекулярной массой, например с молекулярной массой в диапазоне от 20000 до 40000 Да.

Подходящие полимеры включают полиалкиленовый полимер, такой как поли(этиленгликоль) или особенно метоксиполи(этиленгликоль) или его производное, и особенно с молекулярной массой в диапазоне приблизительно от 15000 Да до приблизительно 40000 Да.

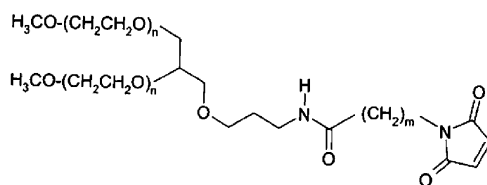
В одном из примеров антитела для применения в настоящем изобретении присоединяют к молекулам поли(этиленгликоля) (PEG). В одном конкретном примере антитело представляет собой фрагмент антитела и молекулы PEG можно присоединять посредством любой доступной боковой цепи аминокислоты или концевой функциональной группы аминокислоты, локализованной в фрагменте антитела, например любой свободной амина, имино, тиольной, гидроксильной или карбоксильной группы. Такие аминокислоты могут встречаться естественным образом в фрагменте антитела или их можно конструировать в фрагменте способами рекомбинантных ДНК (см., например, US 5219996, US 5667425, WO 98/25971, WO 2008/038024). В одном из примеров молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой модифицированный фрагмент Fab, где модификация представляет собой добавление к С-концу его тяжелой цепи одной или более аминокислот для обеспечения присоединения эффекторной молекулы. Соответственно дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или более остатков цистеина, к которым можно присоединять эффекторную молекулу. Для присоединения двух или более молекул PEG можно использовать многие сайты.

Соответственно молекулы PEG являются ковалентно связанными через тиольную группу по меньшей мере с одним остатком цистеина, располагающимся в фрагменте антитела. Каждая полимерная молекула, присоединенная к модифицированному фрагменту антитела, может быть ковалентно связанной с атомом серы остатка цистеина, располагающимся во фрагменте. Ковалентная связь, как правило, является дисульфидной связью или, в частности, связью сера-углерод. В случае когда используют тиольную группу в качестве точки присоединения соответствующим образом активированных эффекторных молекул можно использовать, например, тиольные селективные производные, такие как малеинимиды и производные цистеина. Активированный полимер можно использовать в качестве исходного вещества при получении модифицированных полимером фрагментов антител, как описано выше. Активированный полимер может представлять собой любой полимер, тиоловую реакционноспособную группу, такую как α -галокарбоновая кислота или сложный эфир, например йодацетамид, имид, например малеинимид, винилсульфон или дисульфид. Такие исходные вещества можно получать коммерческим путем (например, от Nektar, ранее Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) или можно получать из коммерчески доступных исходных веществ общепринятыми химическими способами. Конкретные молекулы PEG включают 20К метокси-PEG-амин (доступный от Nektar, ранее Shearwater, Rapp Polymere и SunBio) и M-PEG-SPA (получаемый от Nektar, ранее Shearwater).

В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой модифицированный фрагмент Fab, фрагмент Fab' или diFab, который является пегилированным, т.е. содержит PEG (поли(этиленгликоль)), ковалентно присоединенный к нему, например, способом, описанным в EP 0948544 или EP 1090037 (также см. "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris, ed., Plenum Press, New York; "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris, ed., Plenum Press, New York; "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris, S. Zalipsky, eds., American Chemical Society, Washington DC; и "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam, A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A., 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54:531-545). В одном из примеров PEG присоединяют к цистеину в шарнирной области. В одном из примеров модифицированный PEG фрагмент Fab содержит малеинимидную группу, ковалентно связанную с одной тиольной группой в модифицированной шарнирной области. Остаток лизина можно ковалентно связывать с малеинимидной группой и к каждой из аминокислот на остатке лизина можно присоединять полимер метоксиполи(этиленгликоль) с молекулярной массой приблизительно 20000 Да. Таким образом, общая молекулярная масса PEG, присоединенного к фрагменту Fab, может составлять приблизительно 40000 Да.

Конкретные молекулы PEG включают 2-[3-(N-малеимидо)пропионамидо]этиламин N,N'-бис(метоксиполи(этиленгликоль) M_w 20000) модифицированного лизина, также известного как PEG2MAL40K (доступного от Nektar, ранее Shearwater).

Альтернативные источники линкеров на основе PEG включают NOF, который обеспечивает GL2-400MA3 (где m в структуре ниже представляет собой 5) и GL2-400MA (где m представляет собой 2) и n составляет приблизительно 450.

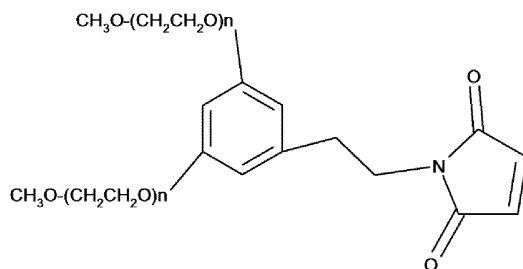


n представляет собой 2 или 5

Таким образом, каждый PEG составляет приблизительно 20000 Да.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления PEG представляет собой 2,3-бис(метилполиоксиэтилен-окси)-1-[[3-(6-малеимидо-1-оксогексил)амино]пропилокси]гексан (разветвленный PEG с 2 ветвями, $-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_5-MAL$, M_w 40000, известный как SUNBRIGHT GL2-400MA3).

Дополнительные альтернативные эффекторные молекулы с PEG следующего ниже типа:



В одном из вариантов осуществления предоставлено антитело, такое как полноразмерное антитело, которое является пегилированным (например, с PEG, описываемым в настоящем описании), присоединенным через аминокислотный остаток цистеина в аминокислоте 226 или около нее в цепи, например в аминокислоте 226 тяжелой цепи (при последовательной нумерации).

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к молекуле Fab'PEG, содержащей один или более полимеров PEG, например 1 или 2 полимера, такие как полимер или полимеры 40 кДа. Молекулы Fab-PEG по настоящему изобретению могут являться особенно эффективными, что заключается в том, что они имеют время полужизни, не зависящее от Fc-фрагмента. В одном из вариантов осуществления предоставлен scFv, конъюгированный с полимером, таким как молекула PEG, молекула крахмала или молекула альбумина. В одном из вариантов осуществления антитело или фрагмент конъюгирован с молекулой крахмала, например, для увеличения времени полужизни. Способы конъюгации начинают с белка, как описано в US 8017739, включенном в настоящее описание посредством ссылки.

Для идентификации ингибиторов активности CSF-1R специалисты в данной области могут применять ряд различных подходов. В одном из примеров ингибиторы идентифицируют по первым идентифицирующим средствам, которые взаимодействуют с CSF-1, IL-34 или CSF-1R, а затем тестируют эти средства для идентификации таких, которые ингибируют активность CSF-1R. В одном таком примере средство представляет собой антитело.

Средства или ингибиторы, которые взаимодействуют с CSF-1, IL-34 или CSF1-R можно идентифицировать любым подходящим способом, например, с применением бесклеточной системы анализа или системы анализа на основе клеток, где полипептид CSF-1, IL-34 или CSF-1R приводят в контакт со средством-кандидатом и определяют способность средства-кандидата взаимодействовать с полипептидом. Предпочтительно способность средства-кандидата взаимодействовать с полипептидом CSF-1, IL-34 или CSF-1R сравнивают с эталонным диапазоном или контролем. При желании этот анализ можно использовать для отбора совокупности (например, библиотеки) средств-кандидатов с применением совокупности образцов полипептида CSF-1, IL-34 или CSF-1R. В одном из примеров бесклеточного анализа первый и второй образец, содержащие нативный или рекомбинантный полипептид CSF-1, IL-34 или CSF-1R, приводят в контакт со средством-кандидатом или контрольным средством и определяют способность средства-кандидата взаимодействовать с полипептидом путем сравнения разницы взаимодействия средства-кандидата и контрольного средства. Предпочтительно полипептид сначала иммобилизуют, например, путем приведения полипептида в контакт с иммобилизованным антителом, которое специфически распознает и связывается с ним, или путем приведения очищенного препарата полипептида в контакт с поверхностью, сконструированной для того, чтобы связывать белки. Полипептид может быть частично или полностью очищенным (например, частично или полностью не содержащим другие полипептиды или части клеточного лизата). Кроме того, полипептид может представлять собой слитый белок, содержащий полипептид CSF-1, IL-34 или CSF1-R или его биологически активный участок и домен, такой как глутатион-S-трансфераза или Fc-область IgG1. Альтернативно полипептид можно биотинилировать способами, хорошо известными специалистам в данной области (например, набор для биотинилирования, Pierce Chemicals; Rockford, IL). Способность средства-кандидата взаимодействовать с полипептидом можно определять известными специалистам в данной области способами, например ELIS A, BIAcore™, про-

точной цитометрией или способом флуоресцентного анализа в микрообъеме (FMAT). В другом примере, в случае когда используют анализы на основе клеток, популяцию клеток, экспрессирующих CSF-1, IL-34 или CSF-1R, приводят в контакт со средством-кандидатом и определяют способность средства-кандидата взаимодействовать с полипептидом. Предпочтительно способность средства-кандидата взаимодействовать с CSF-1, IL-34 или CSF-1R сравнивают с эталонным диапазоном или контролем. Клетка, например, может быть эукариотического происхождения (например, дрожжевая или млекопитающих) и может экспрессировать полипептид CSF-1, IL-34 или CSF-1R эндогенно или может являться генетически сконструированной так, чтобы экспрессировать полипептид. В некоторых случаях полипептид CSF-1, IL-34 или CSF-1R или средство-кандидат метят, например, радиоактивной меткой (такой как P, S или I) или флуоресцентной меткой (такой как флуоресцеинизотиоцианат, родамин, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о-фталевый альдегид или флуорескамин) для обеспечения возможности детекции взаимодействия полипептида и средства-кандидата. Также можно использовать альтернативные способы, такие как ELISA, проточная цитометрия и FMAT. Средства, которые ингибируют активность CSF-1R, можно идентифицировать любым подходящим способом, например,

- (i) путем сравнения активности CSF-1R в присутствии средства-кандидата с активностью указанного полипептида в отсутствие средства-кандидата или в присутствии контрольного средства; и
- (ii) путем определения, ингибирует ли средство-кандидат активность CSF-1R.

Такие анализы можно использовать для отбора средств-кандидатов при клиническом мониторинге или при разработке лекарственного средства. Как описано выше, при необходимости средства можно предварительно отбирать (например, антитело) для идентификации средств, которые взаимодействуют с CSF-1, IL-34 или CSF-1R до отбора таких средств, которые связываются, на их способность ингибировать активность CSF-1R. В одном из примеров систему анализа на основе клеток используют для идентификации средств, способных ингибировать активность CSF-1R. В одном конкретном примере анализ, используемый для идентификации ингибиторов активности CSF-1 или активности CSF-1R, представляет собой стандартный *in vitro* колониестимулирующий анализ по Metcalf, 1970, J. Cell. Physiol. 76-89, в котором CSF-1 способен стимулировать образование колоний макрофагов. В анализ вводят вероятные ингибиторы и измеряют пролиферацию макрофагов любым подходящим способом, таким как введение ³H тимидина или преобразование формазанового красителя. Таким образом, ингибирование измеряют как уменьшение пролиферации по сравнению с контролями.

В другом примере ингибиторы CSF-1R могут подавлять экспрессию полипептида CSF-1, IL-34 или CSF-1R, например антисмысловые ингибиторы. Такие ингибиторы можно идентифицировать любым известным в данной области способом. В одном из примеров такие ингибиторы идентифицируют в системе анализа на основе клеток. Таким образом, популяцию клеток, экспрессирующих полипептид CSF-1, IL-34 или CSF-1R или нуклеиновую кислоту, приводят в контакт со средством-кандидатом и определяют способность средства-кандидата изменять экспрессию полипептида CSF-1, IL-34 или CSF-1R или нуклеиновой кислоты путем сравнения с эталонным диапазоном или контролем. В одном из примеров популяции клеток, экспрессирующих полипептид CSF-1, IL-34 или CSF-1R, приводят в контакт со средством-кандидатом или контрольным средством и определяют способность средства-кандидата изменять экспрессию полипептидов CSF-1, IL-34 или CSF-1R или нуклеиновой кислоты путем сравнения разницы уровня экспрессии полипептидов CSF-1, IL-34 или CSF-1R или нуклеиновых кислот обрабатываемых и контрольных популяций клеток. При желании этот анализ можно использовать для отбора совокупности (например, библиотеки) средств-кандидатов. Клетка, например, может быть эукариотического происхождения (например, дрожжевой или млекопитающего) и может экспрессировать полипептид CSF-1, IL-34 или CSF-1R эндогенно или может являться генетически сконструированной так, чтобы экспрессировать полипептид CSF-1, IL-34 или CSF-1R. Способность средств-кандидатов изменять экспрессию указанных полипептидов или нуклеиновых кислот можно определять известными специалистам в данной области способами, например, но без ограничения, проточной цитометрией, введением радиоактивной метки, сцинтиляционным анализом, иммунопреципитацией, анализом вестерн-блоттинга, анализом "нозерн"-блота или ОТ-ПЦР.

Средства, которые ингибируют активность CSF-1R, можно идентифицировать или дополнительно тестировать, например, для определения терапевтически эффективных количеств на одной или более моделях на животных. Примеры подходящих животных включают, но не ограничиваются ими, мышей, крыс, кроликов, обезьян, морских свинок, собак и кошек. В одном из примеров, в случае когда средство ингибирует экспрессию CSF-1, IL-34 или CSF-1R, первой и второй группе млекопитающих вводят средство-кандидат или контрольное средство и определяют способность средства-кандидата ингибировать экспрессию полипептида CSF-1, IL-34 или CSF-1R или нуклеиновой кислоты путем сравнения разницы уровня экспрессии в первой и второй группе млекопитающих. При желании уровни экспрессии полипептидов CSF-1, IL-34 или CSF-1R или нуклеиновой кислоты в первой и второй группах млекопитающих можно сравнивать с уровнем полипептида CSF-1, IL-34 или CSF-1R или нуклеиновой кислоты в контрольной группе млекопитающих. Средство-кандидат или контрольное средство можно вводить известными в данной области способами (например, перорально, ректально или парентерально, таким как интраперитонеально, или внутривенно, или системно). Изменения экспрессии полипептида или нуклеино-

вой кислоты можно оценивать указанными выше способами.

Примеры моделей на грызунах болезни Альцгеймера или болезни Паркинсона были продемонстрированы, например, Wirths et al., 2010. Была продемонстрирована активация микроглии и повышенная экспрессия Iba1 на модели болезни Альцгеймера на трансгенных мышах APP/PS1KI. Подобным образом, Derboylu et al., 2012, показали сильную активацию микроглии, ассоциированную с экспрессией Iba1 на модели индуцированной MPTP болезни Паркинсона. Следует отметить, что фенотип устойчивой активации микроглии и повышенного сигнала Iba1 наблюдали на моделях болезни Паркинсона, индуцированной сверхэкспрессией α -синуклеина, на грызунах и на не являющихся человеком приматах (Barkholt et al., 2012; Luk et al., 2012).

В другом примере ингибирование активности CSF-1R можно определять по наблюдению улучшения состояния или улучшения симптомов заболевания, и/или отсроченного начала заболевания или замедленного прогрессирования заболевания. Например, но без ограничения, в случае неврологического заболевания, такого как, например, наряду с другими эпилепсии, болезнь Альцгеймера или болезнь Паркинсона, это может проявляться как понижение маркеров активации микроглии или клеток микроглии в головном мозге или тканевой культуре. Ингибирование активности CSF-1R у пациентов с неврологическим заболеванием также можно определять по наблюдению клинических явлений, таких как сниженная частота обострений, определяемая как быстрое ухудшение активности заболевания при отсутствии других причин. Таким образом, в одном из вариантов осуществления применение ингибитора CSF-1R может обеспечивать уменьшение одного или более из болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), синдрома Ангельмана, синдрома дефицита внимания и гиперактивности, расстройства аутистического спектра, биполярного нарушения, повреждения головного мозга, травмы головного мозга, опухоли головного мозга, центрального болевого синдрома, атрофии головного мозга, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIPD), хронической боли, комплексного регионарного болевого синдрома, болезни Крейтцфельда-Якоба, деменции, синдрома Дауна, синдрома Драве, энцефалита, эссенциального тремора, атаксии Фридрейха, синдрома ломкой X-хромосомы, тремора/атаксии, ассоциированных с ломкой X-хромосомой (FXTAS), черепно-мозговой травмы, головной боли, опоясывающего лишая, болезни Хантингтона, гипоксии, иммуноопосредованного энцефаломиелита, младенческих судорог, внутричерепной гипертензии, болезни Лафора, синдрома Ландау-Клеффнера, синдрома Леннокса-Гасто, лейкодистрофии, лейкоэнцефалопатии с исчезновением белого вещества, деменции с тельцами Леви, лиссэнцефалии, болезни Лайма - неврологических осложнений, церебрального гигантизма, менингита, микроцефалии, мигрени, микроинсульта (транзиторной ишемической атаки), заболевания двигательных нейронов (боковой амиотрофический склероз), мультиинфарктной деменции, рассеянного склероза, миоклонической энцефалопатии грудного ребенка, миоклонии, неврологических проявлений СПИДа, неврологических осложнений волчанки, нейронального цероидного липофусциноза, нейропатии, болезни Ниманна-Пика, синдрома Отахара, болезни Паркинсона, паранеопластических синдромов, первичного латерального склероза, прионных болезней, прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии, прогрессирующего супрануклеарного паралича, энцефалита Расмуссена, синдрома беспокойных ног, синдрома Ретта, синдрома скованного человека, инсульта, транзиторной ишемической атаки, травматического повреждения головного мозга, тремора, туберозного склероза, болезни Унферрихта-Лундборга, эпилепсии ункусной, синдрома Веста, болезни Вильсона.

В предпочтительном примере настоящего изобретения ингибитор можно использовать при лечении и/или профилактике эпилепсии, эпилептогенеза, судорог и конвульсий. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор можно использовать при лечении и/или профилактике конкретных типов эпилепсии, выбранных из группы, включающей генерализованные судороги, парциальные судороги и судороги неизвестной природы. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор можно использовать при лечении и/или профилактике височной эпилепсии (TLE).

Можно использовать способы, известные врачам, специализирующимся по неврологическим заболеваниям, для определения, изменяло ли средство-кандидат один или более симптомов, связанных с заболеванием. В данной области известен ряд различных моделей неврологических заболеваний. Например, модель нейровоспаления, ассоциированного с активацией микроглии, основана на системной инъекции липополисахаридного (LPS) бактериального эндотоксина, который, как было опубликовано, индуцирует активацию микроглии с имитацией фенотипа микроглии, который наблюдают при неврологических заболеваниях. Эту модель можно использовать у видов грызунов, но последние исследования продемонстрировали, что модель LPS можно использовать на не являющихся человеком приматах, где она также ассоциирована с устойчивой активацией микроглии (Hannestad et al., 2012).

Способы визуализации для неврологических заболеваний или статуса активации микроглии могут представлять собой позитронно-эмиссионную томографию (PET) с применением радиоактивных индикаторов, связывающихся с транслокаторным белком (TSPO), которым демонстрируют сильную индукцию в активированной микроглии (Hannestad et al., 2012). TSPO рассматривают как трансляционный маркер активации микроглии, т.к. сообщали об его индукции во время течения серьезных неврологических заболеваний, таких как эпилепсия, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона (Amhaoul et al., 2014; Hommet et al.,

2014; Edison et al., 2013).

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к ингибитору для лечения и/или профилактики неврологического заболевания, который представляет собой нуклеиновую кислоту.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к ингибитору, который представляет собой выделенную последовательность ДНК, кодирующую тяжелую и/или легкую цепь(и) антитела, ингибирующую активность CSF-1R. В предпочтительном варианте осуществления выделенная последовательность ДНК, кодирующая тяжелую и/или легкую цепь(и), антитела, или его фрагмента, или производного, содержащего тяжелую цепь и легкую цепь, где переменный домен тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 для CDR-H2, и CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6 для CDR-H3, и где переменный домен легкой цепи содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2 и CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3.

В другом примере, где ингибитор представляет собой нуклеиновую кислоту, его можно вводить посредством генотерапии (см., например, Hoshida, T. et al., 2002, *Pancreas*, 25:111-121; Ikuno, Y., 2002, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002, 43:2406-2411; Bollard, C., 2002, *Blood*, 99:3179-3187; Lee E., 2001, *Mol. Med.* 7:773-782). Генотерапия относится к введению индивидууму экспрессированной или экспрессируемой нуклеиновой кислоты; в одном из примеров она представляет собой нуклеиновую кислоту CSF-1, IL-34 или CSF-1R или ее участки. Любые из способов генотерапии, доступные в данной области, можно использовать по настоящему изобретению. Доставка терапевтической нуклеиновой кислоты пациенту может представлять собой прямую генотерапию *in vivo* (т.е. пациент непосредственно подвергается действию нуклеиновой кислоты или содержащему нуклеиновую кислоту вектору) или непрямую генотерапию *ex vivo* (т.е. клетки сначала трансформируют нуклеиновой кислотой *in vitro*, а затем трансплантируют пациенту).

Например, для генотерапии *in vivo* экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту CSF-1, IL-34 или CSF-1R, можно вводить таким образом, что он становится внутриклеточным, т.е. посредством инфекции с применением дефектного или ослабленного ретровирусного или других вирусных векторов, как описано, например, в US 4980286 или у Robbins et al., 1998, *Pharmacol. Ther.*, 80:35-47. Различные ретровирусные векторы, которые известны в данной области, такие как эти, описаны у Miller et al. (1993, *Meth. Enzymol.*, 217:581-599), которые модифицировали для удаления этих последовательностей ретровируса, которые не являются необходимыми для упаковки вирусного генома и последующей интеграции в ДНК клетки-хозяина. Также можно использовать аденовирусные векторы, которые обеспечивают преимущество вследствие их способности инфицировать неделящиеся клетки, и такие высокоэффективные аденовирусные векторы описаны у Kochanek (1999, *Human Gene Therapy*, 10:2451-2459). Химерные вирусные векторы, которые можно использовать, представляет собой вирусные векторы, описанные Reynolds et al. (1999, *Molecular Medicine Today*, 1:25-31). Также можно использовать гибридные векторы и они описаны Jacoby et al. (1997, *Gene Therapy*, 4:1282-1283). В генотерапии также можно использовать прямую инъекцию "голой" ДНК или посредством использования бомбардировки микрочастицами (например, генной пушки (R) (Gene Gun(R); Biolistic, Dupont), или посредством покрытия ее липидами. Для направленного воздействия на типы клеток, которые специфически экспрессируют представляющие интерес рецепторы, можно использовать рецепторы клеточной поверхности/трансфицирующие соединения или путем инкапсуляции в липосомы, микрочастицы или микрокапсулы, или введением нуклеиновой кислоты в связанном с пептидом состоянии, которое, как известно, проходит в ядро, или введением ее в связанном с лигандом состоянии, подвергающемся опосредованному рецептором эндоцитозу (см. Wu&Wu, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432). При генотерапии *ex vivo* ген переносят в клетки *in vitro* с использованием тканевой культуры и клетки доставляют пациенту различными способами, такими как подкожная инъекция, нанесение клеток на кожный трансплантат и внутривенная инъекция рекомбинантных клеток крови, таких как гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники. Клетки, в которые можно вводить нуклеиновую кислоту CSF-1, IL-34 или CSF-1R для целей генотерапии, включают, например, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, кератиноциты, фибробласты, мышечные клетки, гепатоциты и клетки крови. Клетки крови, которые можно использовать, включают, например, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, мегакарициты, гранулоциты, гемопоэтические клетки или клетки-предшественники, микроглию и т.п.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к применению ингибитора активности CSF-1R для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний. Такое применение и следующие более конкретные виды применения ингибитора активности CSF-1R по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, описанные выше ингибиторы, к которым также относятся все подразделения, приведенные в описании.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения применение ингибитора для получе-

ния лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний предусматривает применение нуклеиновой кислоты.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения применение ингибитора для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний относится к антителу, или его функционально активному фрагменту, или производному. Таким образом, применение антитела, или его функционально активного фрагмента, или производного по настоящему изобретению предусматривает применение моноклонального или поликлонального антитела. Кроме того, применение антитела, или его функционально активного фрагмента, или производного в настоящем изобретении относится к химерному, гуманизированному антителу или антителу человека. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения применение антитела, или его фрагмента, или производного для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний предусматривает применение биспецифического или полиспецифического антитела. Таким образом, применение антитела, или его функционально активного фрагмента, или производного по настоящему изобретению относится к антителу, выбранному из группы, состоящей из полной молекулы антитела, содержащей полноразмерные тяжелые и легкие цепи, или его фрагмента, выбранного из группы, состоящей из Fab, модифицированного Fab, Fab', модифицированного Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменных антител (VH, или VL, или VHH), scFv, би-, три- или тетравалентных антител, Bis-scFv, диател, триотел, тетрател и связывающих эпитоп фрагментов любого из указанных выше.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к применению ингибитора для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний, содержащего ингибитор, конъюгированный с одной или более эффекторных молекул.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к применению антитела, которое представляет собой антитело, которое связывается с CSF-1R, для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний.

Также настоящее изобретение относится к применению ингибитора активности CSF-1R, который представляет собой антитело, где антитело, или его фрагмент, или производное проходит через гематоэнцефалический барьер (BBB), достигая в головном мозге терапевтически эффективного количества, достаточного для лечения и/или профилактики пациента, страдающего неврологическим заболеванием.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения применение антитела, или его фрагмента, или производного для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний предусматривает применение антитела, содержащего тяжелую цепь и легкую цепь, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 для CDR-H2, и CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6 для CDR-H3.

Дополнительно настоящее изобретение относится к применению антитела или его фрагмента, или производного для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний, где антитело, или его фрагмент, или производное содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где вариабельный домен легкой цепи содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения применение антитела, или его фрагмента, или производного для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний включает антитело, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 для CDR-H2, и CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6 для CDR-H3, и где вариабельный домен легкой цепи содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения применение антитела, или его фрагмента, или производного для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний включает антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения применение антитела, или его фрагмента, или производного для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний включает антитело, содержащее легкую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению антитела, или его фрагмента, или производного, содержащего тяжелую цепь, содержащую последовательность, приведенную в

SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний.

Настоящее изобретение также относится к применению антитела, или его фрагмента, или производного для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний, где антитело, или его фрагмент, или производное обладает аффинностью связывания [K_D] к CSF-1R человека 10 пМ или менее 10 пМ.

Настоящее изобретение также относится к применению антитела, или его фрагмента, или производного для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний, где антитело, или его фрагмент, или производное перекрестно блокирует связывание антитела с аффинностью [K_D] 100 пМ или менее.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к применению антитела, или его фрагмента, или производного для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний, где антитело, или его фрагмент, или производное перекрестно блокирует связывание посредством связывания того же эпитопа, что и антитело, которое он блокирует.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой применение антитела, или его фрагмента, или производного для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний, где антитело, или его фрагмент, или производное конкурирует с антителом, или его фрагментом, или производным за связывание с внеклеточным доменом CSF-1R человека (c-fms) фиг. 2 (SEQ ID NO: 15).

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к применению антитела, или его фрагмента, или производного для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний, которое связывается с эпитопом человека CSF-1R.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к применению антитела, или его фрагмента, или производного для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний, которое представляет собой выделенную последовательность ДНК, кодирующую тяжелую и/или легкую цепь(и) антитела, подходящего для настоящего изобретения.

Как описано в настоящем описании, ингибиторы активности CSF-1R можно использовать при лечении и/или профилактике неврологического заболевания. Для такого применения средства, как правило, вводят в форме фармацевтической композиции. Также предоставлена фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор активности CSF-1R в комбинации с фармацевтически приемлемым разбавителем, эксципиентом и/или носителем. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению также может дополнительно содержать другие активные ингредиенты.

Термин "лечение" включает терапевтическую и/или профилактическую терапию. Когда ссылку в настоящем описании приводят к способу лечения и/или профилактики неврологического заболевания или состояния с применением конкретного ингибитора или комбинации ингибиторов, следует понимать, что такая ссылка предназначена включать применение такого ингибитора или комбинации ингибиторов для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологического заболевания.

Композицию, как правило, поставляют в виде части стерильной, фармацевтической композиции, которая обычно содержит фармацевтически приемлемый носитель. Такая композиция может находиться в любой подходящей форме (в зависимости от желаемого способа введения ее пациенту). Ингибиторы для применения в изобретении предпочтительно вводят индивидууму перорально или интаректально, но также можно вводить различными другими путями, такими как трансдермально, подкожно, интраназально, внутривенно и внутримышечно. Наиболее подходящий путь введения в любом конкретном случае зависит от конкретного ингибитора, индивидуума, природы и тяжести заболевания и физического состояния индивидуума.

Ингибиторы для применения в изобретении можно вводить в комбинации, например, одновременно, последовательно или раздельно с одним или более другими терапевтически активными соединениями, которые могут являться, например, противоневрологической терапией.

Фармацевтические композиции в целях удобства могут быть предоставлены в стандартных лекарственных формах, содержащих predetermined количество активного средства по изобретению в дозе. Такие лекарственные формы могут содержать, например, но без ограничения, от 1000 до 0,01 мг/кг, например от 750 до 0,1 мг/кг, такие как от 100 до 1 мг/кг, в зависимости от подлежащего лечению состояния, пути введения и возраста, массы и состояния индивидуума.

Фармацевтически приемлемые носители для применения в изобретение могут принимать широкий диапазон форм в зависимости, например, от пути введения.

Композиции для перорального введения могут быть жидкими или твердыми. Пероральные жидкие препараты могут находиться в форме, например, водных или масляных суспензий, растворов, эмульсий, сиропов или эликсиров или могут быть предоставлены в виде сухого продукта для восстановления водой или другим подходящим носителем перед применением. Пероральные жидкие препараты могут содержать суспендирующие средства, как известно в данной области. В случае пероральных твердых препаратов, таких как порошки, капсулы и таблетки, можно вводить носители, такие как крахмалы, сахара, микрокристаллическую целлюлозу, гранулирующие средства, смазочные средства, связывающие средства,

дезинтегрирующие средства и т.п. Вследствие простоты их введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее предпочтительную пероральную стандартную лекарственную форму, в случае которой, как правило, применяют твердые фармацевтические носители.

В дополнение к наиболее распространенным лекарственным формам, указанным выше, активные средства по изобретению также можно вводить с использованием средств с контролируемым высвобождением и/или средств доставки с контролируемым высвобождением. Таблетки и капсулы могут содержать общепринятые носители или эксципиенты, такие как связывающие средства, например сироп, гуммиарабик, желатин, сорбит, трагакант или поливинилпирролидон; наполнители, например лактозу, сахар, кукурузный крахмал, фосфат кальция, сорбит или глицин; таблетующие смазочные средства, например, стеарат магния, тальк, полиэтиленгликоль или диоксид кремния; дезинтегранты, например картофельный крахмал, или приемлемые средства для смачивания, такие как лаурилсульфат натрия. Таблетки можно покрывать стандартными водными или неводными техниками в соответствии со способами, хорошо известными в обычной фармацевтической практике.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, подходящие для перорального введения, могут быть предоставлены в виде отдельных лекарственных форм, таких как капсулы, крахмальные капсулы или таблетки, где каждая содержит predetermined количество активного средства в виде порошка или гранул или в виде раствора или суспензии в водной жидкости, неводной жидкости, эмульсии масло-в-воде или жидкой эмульсии вода-в-масле. Такие композиции можно получать любым из фармацевтических способов, но все способы включают этап объединения активного средства с носителем, который состоит из одного или более необходимых ингредиентов. Как правило, композиции получают путем однородного и тщательного смешивания активного средства с жидкими носителями, или тонкодисперсными твердыми носителями, или обоими видами носителей, а затем при необходимости придают форму продукту в желаемой форме выпуска. Например, таблетку можно получать прессованием или формированием необязательно с одним или более приемлемыми ингредиентами.

Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, можно получать в виде растворов или суспензий активных средств по изобретению в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также можно получать в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях в маслах. При обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения включают водные или неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства и растворенные вещества, которые придают композиции изотоничность по отношению к крови предполагаемого реципиента, и водные, и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие средства и загустители. Приготовленные для немедленного приема инъекционные растворы, дисперсии и суспензии можно получать из стерильных порошков, гранул и таблеток. Фармацевтические композиции можно вводить с применением известных в данной области медицинских устройств. Например, в предпочтительном варианте осуществления фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить с применением безыгольного устройства для подкожных инъекций, такого как устройства, описанные в US 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей, пригодных в настоящем изобретении, включают US 4487603, в котором описан имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования лекарственного средства с контролируемой скоростью; US 4486194, в котором описано терапевтическое устройство для введения лекарственных средств через кожу; US 4447233, в котором описан инфузионный насос для лекарственных средств для доставки лекарственного средства при точной скорости инфузии; US 4447224, в котором описан имплантируемый инфузионный прибор с переменной скоростью потока для непрерывной доставки лекарственного средства; US 4439196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственного средства с многоячеевыми камерами; и US 4475196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственного средства. Многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули известны специалистам в данной области.

Фармацевтические композиции, адаптированные для местного применения, можно формулировать в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, пропитанных перевязочных материалов, спреев, аэрозолей или масел, трансдермальных устройств, присыпок и т.п. Такие композиции, содержащие активное средство, можно получать общепринятыми способами. Таким образом, они могут также содержать совместимые общепринятые носители и добавки, такие как консерванты, растворители для облегчения проникновения лекарственного средства, смягчающие средства в кремах или мазях и этанол или олеиловый спирт для лосьонов. Такие носители могут содержаться от приблизительно 1% до приблизительно 98% от композиции. Наиболее часто они составляют приблизительно до 80% композиции. Только в качестве иллюстрации крем или мазь получают смешиванием достаточных количеств гидрофильного вещества и воды, составляющей приблизительно 5-10% по массе соединения, в достаточных количествах, чтобы получать крем или мазь с желаемой консистенцией. Фармацевтические композиции, адаптированные для трансдермального введения, можно предоставлять в виде отдельных пластырей, предназначенных оставаться в тесном контакте с эпидермисом реципиента в течение длительного перио-

да времени. Например, активное средство можно доставлять из пластыря посредством ионтофореза. Для нанесения на внешние ткани, например ротовую полость и кожу, композиции предпочтительно наносить в виде местной мази или крема. В случае формулирования в виде мази активное средство можно применять с парафиновой или смешиваемой с водой основой для мази. Альтернативно активное средство можно формулировать в виде крема с основой для крема масло-в-воде или основой вода-в-масле. Фармацевтические композиции, адаптируемые для местного применения в ротовой полости, включают таблетки-леденцы, пастилки и ополаскиватели для полости рта. Фармацевтические композиции, адаптированные для местного применения для глаз, включают глазные капли, где активное средство растворяют или суспендируют в подходящем носителе, в частности водном растворителе. Они также включают местные мази или кремы, как указано выше. Фармацевтические композиции, подходящие для ректального введения, где носитель представляет твердое вещество, наиболее предпочтительно предоставляют в виде суппозиторий стандартной дозы. Подходящие носители включают масло какао или другой глицерид, или вещества, общепринято используемые в данной области, и в целях удобства суппозитории можно формулировать смешиванием комбинации с размягченным(ыми) или расплавленным(ыми) носителем(ями) с последующим охлаждением и приданием формы. Их также можно вводить в виде клизмы.

Доза ингибитора активности CSF-1R, которую необходимо вводить, может изменяться в зависимости от конкретного ингибитора, типа неврологического заболевания, индивидуума, природы и тяжести заболевания, физического состояния индивидуума и выбранного пути введения; специалист в данной области может легко определить подходящую дозу. Для лечения и/или профилактики неврологического заболевания у людей и животных фармацевтические композиции, содержащие антитела, можно вводить пациентам (например, являющимся людьми индивидуумам) в терапевтически или профилактически эффективных дозах (например, дозах, которые приводят к ингибированию неврологического заболевания и/или ослабляют симптомы неврологического заболевания) с использованием любого подходящего пути введения, такого как инъекция и других путей введения, известных в данной области для клинических продуктов, таких как клинические продукты на основе антитела. Композиции могут составлять по меньшей мере 0,05% по массе, например от 0,5 до 50% по массе, такие как от 1 до 10% по массе или более по массе, ингибитора по изобретению в зависимости от способа введения. Специалисту в данной области будет понятно, что оптимальное количество и интервалы между отдельными дозами ингибитора по изобретению определяют в зависимости от природы и степени проявления состояния, подлежащего лечению, формы, пути и участка введения, а также возраста и состояния конкретного индивидуума, подлежащего лечению, так что врач в конечном итоге определяет подходящие для применения дозы. Такое дозирование можно повторять каждый раз при необходимости. Если возникают побочные эффекты количество и/или частоту введения дозы можно изменять или снижать в соответствии с обычной клинической практикой.

В одном из аспектов фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит нуклеиновую кислоту CSF-1, IL-34 или CSF-1R, где указанная нуклеиновая кислота является частью экспрессирующего вектора, который экспрессирует полипептид CSF-1, IL-34 или CSF-1R или его химерный белок в подходящем хозяине. В частности, такая нуклеиновая кислота содержит промотор, функционально связанный с кодирующей областью полипептида, где указанный промотор является индуцибельным или конститутивным (и необязательно тканеспецифическим).

Один из аспектов настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции для применения в лечении и/или профилактике неврологического заболевания.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу для лечения и/или профилактики у являющегося человеком индивидуума, страдающего неврологическим заболеванием или подвергающегося риску его развития, который включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества ингибитора активности CSF-1R. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ для лечения и/или профилактики у являющегося человеком индивидуума, страдающего неврологическим заболеванием или подвергающегося риску его развития, относится к введению индивидууму терапевтически эффективного количества ингибитора в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения и/или профилактики у являющегося человеком индивидуума, страдающего неврологическим заболеванием или подвергающегося риску его развития, где ингибитор активности CSF-1R вводят в комбинации с одним или более других терапевтически активных соединений. Другой аспект настоящего изобретения относится к способу, в котором другое терапевтически активное соединение представляет собой другое противоэпилептическое терапевтическое средство.

Настоящее изобретение относится к ингибитору активности CSF-1R для применения в лечении и/или профилактике неврологических заболеваний, применению ингибитора активности CSF-1R для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики неврологических заболеваний, фармацевтической композиции, содержащей ингибитор активности CSF-1R для применения в лечении и/или профилактике неврологических заболеваний или способу лечения и/или профилактики у являющегося человеком индивидуума, страдающего неврологическим заболеванием или подвергающегося риску его

развития, где неврологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), синдрома Ангельмана, синдрома дефицита внимания и гиперактивности, расстройства аутистического спектра, биполярного нарушения, повреждения головного мозга, травмы головного мозга, опухоли головного мозга, центрального болевого синдрома, атрофии головного мозга, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), хронической боли, комплексного регионарного болевого синдрома, болезни Крейтцфельда-Якоба, деменции, синдрома Дауна, синдрома Драве, энцефалита, эссенциального тремора, атаксии Фридрейха, синдрома ломкой X-хромосомы, тремора/атаксии, ассоциированных с ломкой X-хромосомой (FXTAS), черепно-мозговой травмы, головной боли, опоясывающего лишая, болезни Хантингтона, гипоксии, иммуноопосредованного энцефаломиелимита, младенческих судорог, внутричерепной гипертензии, болезни Лафора, синдрома Ландау-Клеффнера, синдрома Леннокса-Гасто, лейкодистрофии, лейкоэнцефалопатии с исчезновением белого вещества, деменции с тельцами Леви, лиссэнцефалии, болезни Лайма - неврологических осложнений, церебрального гигантизма, менингита, микроцефалии, мигрени, микроинсульта (транзиторной ишемической атаки), заболевания двигательных нейронов (см. боковой амиотрофический склероз), мультиинфарктной деменции, рассеянного склероза, миоклонической энцефалопатии грудного ребенка, миоклонии, неврологических проявлений СПИДа, неврологических осложнений волчанки, нейронального цероидного липофусциноза, нейропатии, болезни Ниманна-Пика, синдрома Отахара, болезни Паркинсона, паранеопластических синдромов, первичного латерального склероза, прионных болезней, прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии, прогрессирующего супрануклеарного паралича, энцефалита Расмуссена, синдрома беспокойных ног, синдрома Ретта, синдрома скованного человека, инсульта, транзиторной ишемической атаки, травматического повреждения головного мозга, тремора, туберозного склероза, болезни Унферрихта-Лундборга, эпилепсии ункусной, синдрома Веста, болезни Вильсона.

В вариантах осуществления настоящего изобретения неврологическое заболевание предпочтительно выбрано из группы, состоящей из синдрома Ангельмана, синдрома дефицита внимания и гиперактивности, расстройства аутистического спектра, травмы головного мозга, опухоли головного мозга, болезни Крейтцфельда-Якоба, синдрома Дауна, синдрома Драве, энцефалита, синдрома ломкой X-хромосомы, тремора/атаксии, ассоциированных с ломкой X-хромосомой (FXTAS), черепно-мозговой травмы, опоясывающего лишая, гипоксии, иммуноопосредованного энцефаломиелимита, младенческих судорог, болезни Лафора, синдрома Ландау-Клеффнера, синдрома Леннокса-Гасто, лейкодистрофии, лейкоэнцефалопатии с исчезновением белого вещества, лиссэнцефалии, болезни Лайма - неврологических осложнений, менингита, рассеянного склероза, миоклонической энцефалопатии грудного ребенка, миоклонии, неврологических осложнений волчанки, синдрома Отахара, прионных болезней, энцефалита Расмуссена, синдрома Ретта, травматических повреждений головного мозга, туберозного склероза, болезни Унферрихта-Лундборга, эпилепсии ункусной или синдрома Веста.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения неврологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из эпилепсии, эпилептогенеза, судорог и конвульсий. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения тип эпилепсии выбран из группы, состоящей из генерализованных судорог, парциальных судорог и судорог неизвестной природы. В другом варианте осуществления настоящего изобретения неврологическое заболевание представляет собой височную эпилепсию (TLE).

В качестве наиболее предпочтительного варианта осуществления антитело к CSF-1R, как описано в WO 15/028455, включено в настоящее описание посредством ссылки.

Ниже изобретение описано со ссылкой на следующие ниже примеры, которые являются исключительно иллюстративными, и их не следует каким-либо образом рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Фигуры

На фиг. 1 представлены определенные аминокислотные и полинуклеотидные последовательности (SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 14).

На фиг. 2 представлена последовательность внеклеточного домена CSF-1R человека, кодируемая полинуклеотидом, подходящая для экспрессии на поверхности клеток (SEQ ID NO: 15).

На фиг. 3 представлены данные проточной цитометрии, подтверждающие, что этим способом детектировали связанный с рецептором CSF-1 на клетках M-NFS-60.

На фиг. 4 представлено, что Ab535, иммобилизованное на поверхности лунки с тканевой культурой или находящееся в свободном состоянии в растворе, не поддерживало пролиферацию клеток M-NFS-60 при отсутствии CSF-1 в используемых концентрациях.

На фиг. 5 представлено взаимодействие транскрипционных мишеней CSF-1R у мышей после обработки (п/к) антителом к CSF-1R. Экспрессию четырех генов транскрипционных мишеней CSF-1R, например Aif1 (панели A, B), Ctse (панель C, D), Emr1 (панель E, F) и Irf8 (панель G, H), измеряли посредством кПЦР в гиппокампе страдающих эпилепсией мышей (левые панели) и нативных животных (правые панели) после п/к инъекций антитела к CSF-1R или контрольного IgG в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 6 представлены результаты иммуногистохимии экспериментов, проводимых на срезах го-

ловного мозга мышей (зубчатой извилины гиппокампа) после введения (п/к) антитела к CSF-1R. Белок Iba1, который является маркером активированной микроглии, метили красным, тогда как ядра клеток окрашивали синим с применением DAPI (панели А-С). Плотность экспрессирующих Iba1 клеток микроглии на мм² количественно определяли на панели D.

На фиг. 7 представлен защитный эффект антитела к CSF-1R в отношении частоты приступов эпилепсии на модели с пилокарпином на мышах.

Примеры

Пример 1. Выделение антитела к CSF-1R мыши.

2 Кролика получали 5 иммунизаций клетками, транзитивно экспрессирующими остатки 1-512 CSF-1R мыши (Uniprot Entry p09581). За образованием антител наблюдали посредством ELISA с использованием планшетов Nunc Maxisorp, покрытых 2 мкг/мл Fc кролика к CSF-1R мыши. У обоих кроликов наблюдали титры в сыворотке до 1:100000 разведений. Связывание сыворотки с клетками M-NFS-60 (Metcalf et al., 1970) также определяли посредством FACS. Медианный FL1 наносили на график в зависимости от разведения антитела. Наблюдалось связывание Binding при разведении 1:10000.

С использованием зависящей от CSF-1 линии клеток M-NFS-60 (Metcalf et al., 1970) показано, что сыворотки от обоих кроликов может блокировать выживаемость зависящих от CSF-1 клеток при разведении 1:100 (данные не показаны).

Сто 96-луночных планшетов засевали 1000-5000 PBMC кролика на лунку и растили в течение 1 недели при 37°C в присутствии клеток тиомы мыши EL4-B5 и кондиционированных Т-клетками кролика сред (TSN). Затем содержащие антитело супернатанты подвергали скринингу анализом FMAT с использованием клеток M-NFS-60 и конъюгата Cy5 и Fc, специфического к антителу кролика. Идентифицировали 678 связывающих CSF-1R средств. Из них приблизительно 3% блокировали зависящую от CSF-1 пролиферацию M-NFS-60 в клеточном анализе. Связывающие средства также подвергали скринингу в ELISA с использованием планшетов, покрытых 2 мкг/мл Fc к CSF-1R кролика и выявляли связывание с использованием конъюгата F(ab')₂ к антителу кролика-HRP. Связывающие средства также подвергали скринингу в твердофазном блокирующем анализе на основе ELISA. Для этого анализа 384-луночные планшеты Nunc Maxisorp покрывали 0,5 мкг/мл Fc к CSF-1R кролика, а затем блокировали в PBS/0,1% Tween-20/1% PEG20000. Перед культивированием планшеты отмывали, затем добавляли супернатант в планшеты и инкубировали в течение >1 ч при комнатной температуре. Затем в супернатант добавляли CSF-1 в конечной концентрации 10 нг/мл и инкубировали еще 1 ч при комнатной температуре. Планшеты отмывали, а затем инкубировали с 0,5 мкг/мл биотинилированным антителом козы к CSF-1 мыши (R&D systems). Связывание CSF-1 с рецептором выявляли с использованием стрептавидина-HRP. Для дальнейшего анализа выбирали восемь лунок. Для всех лунок демонстрировали связывание с клетками и белком и блокировали в анализе M-NFS-60 и в ELISA.

Для идентификации специфичных к антигену В-клеток из положительной лунки использовали способ на основе флуоресценции. Секретирующие иммуноглобулин В-клетки из положительной лунки смешивали с гранулами со стрептавидином, покрытыми биотинилированным конъюгатом Fc кролика к CSF-1R мыши и F(ab')₂ козы к фрагменту F(ab')₂ кролика, специфического к FITC (Jackson ImmunoResearch). После инкубации при 37°C в течение 1 ч антитело, секретируемое специфическими к антигену В-клетками, захватывали на гранулах вблизи такой В-клетки. Присутствие конъюгата FITC приводило к мечению покрытых антителом гранул и образованию очагов флуоресценции вокруг специфических к антигену В-клеток. Такие индивидуальные В-клетки, идентифицируемые с использованием флуоресцентного микроскопа, затем собирали с использованием микроманипулятора и размещали в пробирку для ПЦР. Из отдельных клеток выделяли гены варибельной области антитела ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Затем экспрессировали V-области кролика в виде химерных антител IgG4 человека или Fab в системе с транзиторной экспрессией CHO. В 4 из 8 лунок получали рекомбинантные антитела к CSF-1R. Затем подтверждали нейтрализующую активность рекомбинантных антител в анализе M-NFS-60. Также проводили BIAcore с использованием молекул Fab для определения аффинности к Fc к CSF-1R кролика (табл. 1). На основании нейтрализующей активности и аффинности выбирали Ab535 в качестве реагента к CSF-1R мыши. Такое антитело затем адаптировали для мыши, экспрессировали в системе млекопитающего в виде полноразмерного IgG1 мыши и очищали.

Способ BIAcore.

Антитела тестировали на их способность связывать CSF-1R в анализе BIAcore путем измерения кинетики блокирования с очищенным рекомбинантным слитым белком CSF-1R/Fc.

Формат анализа заключался в захвате антител к CSF-1R иммобилизованным F(ab')₂ к IgG человека, затем титровании hCSF-1R/Fc по всей захваченной поверхности. BIA (Bimolecular Interaction Analysis) проводили с использованием BIAcore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Все эксперименты проводили при 25°C. Фрагмент Affinipure F(ab')₂ козы к IgG человека, специфический фрагмент F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) посредством химии присоединения аминов до уровня ~6000 единиц ответа (PE). Буфер HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% поверхностно-активное вещество P20, GE Healthcare Bio-Sciences AB) использовали в качестве подвижного буфера при скорости потока 10 мкл/мин. Инъекцию антитела к

CSF-1R проводили с получением уровня захвата приблизительно 100 PE на иммобилизованном F(ab)₂ к IgG человека.

Рекомбинантный CSF-1R человека/Fc тировали (R&D Systems) путем удвоения разведения от 2,5 нМ до 78 пМ захваченного антитела к CSF-1R при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 мин с последующей фазой диссоциации в течение 8 мин. Эти сенсограммы использовали для получения скорости ассоциации. Поверхность получали при скорости потока 10 мкл/мин двумя последовательными 10 мкл инъекциями 40 мМ HCl с последующей инъекцией 10 мМ NaOH 5 мкл. Кривые связывания с вычтенным двойным эталонным фоновым значением анализировали с использованием программного обеспечения BIAevaluation (версия 4.1) после стандартных процедур. Параметры кинетики определяли на основании алгоритма подбора.

Результаты для Ab553 приведены в таблице.

Обозначение антитела	ка ассоциации ($M^{-1} s^{-1}$)	kd диссоциации (s^{-1})	Константа аффинности K_D
Ab 535	$8,05 \pm 0,01 \times 10^6$	$1,21 \pm 0,15 \times 10^{-5}$	1,50 пМ

Пример 2. Анализы Ab535 in vitro.

Ab535 блокирует связывание CSF-1 мыши с положительной по рецептору CSF-1 линией клеток in vitro.

Исследовали способность связанного с рецептором Ab535 предотвращать связывание CSF-1 с CSF-1R. Положительную по CSF-1R мыши линию клеток M-NFS-60 использовали в анализе, в котором клетки предварительно инкубировали с Ab535 или контрольным антителом до того, как подвергать воздействию CSF-1. Затем детектировали связанный с рецептором CSF-1 с использованием флуоресцентно меченного антитела и проточной цитометрии. Зависимое от Ab535 снижение интенсивности флуоресценции клеток интерпретировали как указание на способность связанного с рецептором Ab535 предотвращать связывание CSF-1 с CSF-1R.

Клетки M-NFS-60 (LGC Promochem, Teddington, UK) поддерживали в суспензии в минимальной среде RPMI (Invitrogen), дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAA), Hepes (Invitrogen, 10 мМ конечная концентрация), пируватом натрия (Invitrogen, 1 мМ конечная концентрация), глюкозой (Sigma-Aldrich, 4,5 г/л конечная концентрация), бикарбонатом натрия (Sigma-Aldrich, 1,51 конечная концентрация), бета-меркаптоэтанолом (Sigma-Aldrich, 0,05 мМ конечная концентрация), рекомбинантным CSF-1 мыши (Preprotech, 3,3 нг/мл конечная концентрация).

Клетки M-NFS-60 получали в проточном буфере (PBS (Invitrogen), дополненном 0,2% BSA (Sigma-Aldrich), 0,09% азида натрия (Sigma-Aldrich)) в концентрации 1×10^6 клеток/мл. Серийные разведения Ab535 или антитела изотипического контроля IgG1 мыши получали в проточном буфере и добавляли 100 мкл аликвоты клеток с получением конечной концентрации 20, 5, 1,25, 0,32, 0,08 мкг/мл в объеме 200 мкл и инкубировали на льду в течение 1 ч. Затем клетки дважды отмывали в проточном буфере, инкубировали с 0,5 мкг/мл рекомбинантного CSF-1 мыши в течение 30 мин на льду и отмывали дважды в проточном буфере. Для детекции связанного с рецептором CSF-1 клетки инкубировали с биотинилированным антителом к CSF-1 мыши (R&D Systems, 5 мкг/мл) в течение 30 мин на льду, дважды отмывали в проточном буфере и метили связанное антитело посредством инкубации с конъюгированным с Alexafluor 488 стрептавидином (Invitrogen, разведение 1:200) на льду в течение 15 мин до конечного этапа отмывки и ресуспензии клеток в 500 мкл проточного буфера. Клетки оценивали в отношении флуоресценции проточной цитометрией с использованием проточного цитометра FACSCaliber (Becton Dickinson) и анализировали данные с использованием программного обеспечения WinMDI.

Данные анализа проточной цитометрии подтверждали, что связанный с рецептором CSF-1 на клетках M-NFS-60 можно было детектировать этим способом (фиг. 3a). Инкубация клеток с Ab535 в любой из используемых концентраций перед добавлением CSF-1 предотвращала связывание CSF-1 с CSF-1R (фиг. 3b). Инкубация клеток с антителом изотипического контроля в любой из используемых концентраций не оказывало эффекта на связывание и детекцию CSF-1 (фиг. 3c).

Связывание Ab535 с CSF-1R не заменяет CSF-1 при пролиферации и выживании зависящей от CSF-1 линии клеток in vitro.

Исследовали способность Ab535 заменять CSF-1 в поддержании выживания и пролиферации зависящих от CSF-1 клеток с использованием клеток M-NFS-60 в анализе клеточной пролиферации, который включает воздействие на клетки Ab535 в свободном состоянии в растворе и иммобилизованном на пластике.

Для оценки способности иммобилизованного Ab535 поддерживать зависящие от CSF-1 клетки лунки 96-луночного круглодонного планшета для культивирования тканей предварительно покрывали Ab535 или нерелевантным антителом изотипического контроля в течение 24 ч до начала анализа клеточной пролиферации путем добавления 50 мкл на лунку раствора, содержащего 10 или 1 мкг/мл антитела в PBS и инкубации при 4°C. Лунки аспирировали и удаляли несвязанное антитело посредством отмывания каждой лунки дважды 100 мкл PBS.

Пролиферирующие клетки M-NFS-60, поддерживаемые, как описано выше, высевали в 96-луночные круглодонные планшеты для культивирования тканей с плотностью 10000 клеток на лунку в 50 мкл среды для выращивания с CSF-1. В соответствующие лунки добавляли дополнительно 50 мкл среды для выращивания, дополненной рекомбинантным CSF-1 мыши, Ab535 или без дополнений. Планшеты инкубировали в течение 72 ч и определяли количество клеток с использованием набора CellTiter Glo по инструкциям производителя (Promega) с получением измеримого люминесцентного считывания, пропорционального уровням АТФ и, таким образом, количества клеток для каждого из тестируемых условий. Все условия тестирования проводили в трех повторениях.

Анализ данных подтверждал, что M-NFS-60 зависит от CSF-1 для пролиферации, как отражено значительно большим количеством клеток в лунках, дополненных CSF-1, по сравнению с клетками, поддерживаемыми в среде для выращивания без CSF-1. Кроме того, Ab535, иммобилизованный на поверхности лунки с тканевой культурой или в свободном состоянии в растворе, не поддерживал пролиферации клеток M-NFS-60 при отсутствии CSF-1 в используемых концентрациях (фиг. 4).

Пример 3. Модель височной эпилепсии, индуцированной пилокарпином, на мышах.

Модель височной эпилепсии, индуцированной пилокарпином, и эпилептогенез проводили так, как описано Mazzuferi et al., 2012. Нативным или эпилептическим мышам (n=8-10) через 19 недель после индукции височной эпилепсии пилокарпин вводили 100 мг/кг (п/к) антитела к CSF-1R (Ab535) или носитель на сутки 1 и 4 эксперимента. На сутки 8 животных умерщвляли и удаляли головной мозг из черепной коробки.

Индукцированная пилокарпином височная эпилепсия ассоциирована с симметричными изменениями в обоих полушариях головного мозга (Mazzuferi et al., 2012). Гиппокамп быстро иссекали из правого полушария и замораживали при -80°C для проведения экстракции РНК кПЦР-РВ. Левое полушарие фиксировали погружением в 4% PFA для проведения гистологических исследований (иммуногистохимии).

Для демонстрации молекулярных последствий блокирования рецептора антителом идентифицировали последующие гены транскрипционных мишеней CSF-1R с использованием метабазы Thomson-Reuters (<http://lsresearch.thomsonreuters.com/pages/solutions/10/metabase>), обрабатываемой в ручном режиме базы данных биологических путей и геной регуляции. Среди генов-мишеней CSF-1R выбирали гены Aif1, Irf8, Ctse1 и Emr1, т.к. известно, что они экспрессируются в гиппокампе. Измеряли их экспрессию и сравнивали посредством кПЦР-РВ.

Один из указанных выше генов-мишеней CSF-1R, Aif1, кодирует белок Iba1, который является широко распространенным маркером активации микроглии. Экспрессия Iba1 конститутивно повышается в микроглиальных клетках, обнаруживаемых при эпилепсии человека и на моделях эпилепсии на мышах, таких как модель с пилокарпином (Vezzani et al., 2013). Таким образом, авторы провели иммуногистохимическую оценку его экспрессии в гиппокампе мышей с индуцированной пилокарпином эпилепсией, обрабатываемых антителом к CSF-1R. Использовали специфические антитела, распознающие Iba1 (маркер микроглии) и DAPI (маркер ядра) и определяли количество положительных по Iba1 клеток (клеток/мм²) в зубчатой извилине гиппокампа после получения изображений с использованием 40× линз (NanoZoomer).

Результаты.

Экспрессию четырех генов транскрипционных мишеней CSF-1R, например Aif1 (фиг. 5, панели A, B), Ctse (фиг. 5, панель C, D), Emr1 (фиг. 5, панель E, F) и Irf8 (фиг. 5, панель G, H) измеряли посредством кПЦР в гиппокампе мышей с эпилепсией (левые панели) и нативных животных (правые панели) после п/к инъекций антитела к CSF-1R или контрольного IgG в качестве отрицательного контроля.

У мышей, которым вводили пилокарпин, обработка антителом к CSF-1R (п/к) значительно снижала экспрессию всех 4 выбранных генов-мишеней (Aif1, Ctse, Emr1 и Irf8) по сравнению с контролем (фиг. 5, панели A, C, E и G). Это демонстрирует, что CSF-1R эффективно ингибирует в гиппокампе мышей с эпилепсией, обрабатываемых антителом к CSF-1R.

На экспрессию генов Aif1, Ctse и Irf8 у нативных животных не оказывает влияние антитело к CSF-1R (фиг. 5, панели B, D и H). Это позволяет предположить, что для состояния болезни (эпилепсия) необходимым является, чтобы антитело к CSF-1R оказывало действие в головном мозге. Однако экспрессия Emr1 также подвергается влиянию у нативных мышей (фиг. 1, панель F), что подтверждает, что некоторые гены-мишени CSF-1R могут зависеть от фонового заболевания, тогда как другие не зависят.

У мышей с эпилепсией антитело к CSF-1R восстанавливает по меньшей мере частично уровни экспрессии этих 4 генов до уровней экспрессии, наблюдаемых у нативных животных (панели A, C, E, и G), что указывает на воздействие на мишень в головном мозге мышей с эпилепсией. У нативных животных этот эффект можно наблюдать только на генах-мишенях Irf 8 (панель F), но не с 3 другими генами-мишенями (панели B, D и H), что указывает на другое воздействие на мишень антитела к CSF-1R у нативных животных по сравнению с животными с эпилепсией, индуцированной пилокарпином.

Пример 4. Эксперименты иммуногистохимии, проводимые на срезах головного мозга мышей.

Наблюдения, описанные в примере 3 на основании данных экспрессии генов подтверждали гистологией головного мозга. На фиг. 6 представлены результаты иммуногистохимии, проводимые на срезах головного мозга мышей (зубчатой извилине гиппокампа) после обработки (п/к) антителом к CSF-1R на

маркер Iba1 (метилю красным), который является маркером активированных клеток микроглии; ядра клеток окрашивали синим DAPI. Плотность экспрессирующих Iba1 клеток микроглии на мм² количественно определяли на панели D.

Белок Iba1 кодируется геном Aif, указанным 1 в примере 3, прямым последующим геном-мишенью CSF-1R. Как явно продемонстрировано на фиг. 6 (панель B и доколичественное определение на панели D), наблюдают значительное увеличение активации микроглии и окрашивания на положительные по Iba1 клетки у мыши с индуцированной пилокарпином эпилепсией по сравнению с нативными мышами (панель A и количественное определение на панели D). Инъекции (п/к) антителом к CSF-1R приводили к устойчивому уменьшению положительных по Iba1 клеток у животных с эпилепсией (фиг. 6, панель C), что соответствует уменьшению активности микроглии. Таким образом, обработка антителом к CSF-1R приводила к нормализации окрашивания Iba1 (фиг. 6, панель C и количественное определение на панели D) до контрольного уровня.

Пример 5. Модель индуцированной МРТР болезни Паркинсона на мышах.

Избирательное резкое снижение числа дофаминергических клеток, что является характерным признаком болезни Паркинсона, можно индуцировать, например, у мышей токсинами, такими как 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МРТР). После инъекции МРТР дофаминергические клетки дегенерируют в течение нескольких суток и это сопровождается активацией микроглии (Depboylu et al., 2012).

В двух группах нативных мышей (n=8-10) вводили 100 мг/кг (п/к) антитела к CSF-1R (Ab535) или носитель на сутки 1 и 4 эксперимента. На сутки 8 обе группы мышей инъецировали МРТР (12,5 мг/кг; п/к). Системная инъекция МРТР быстро индуцирует симметричные изменения в обоих полушариях головного мозга. Таким образом, мышей умерщвляли через 10-12 ч после инъекции токсина. Быстро иссекали стриатум из правого полушария и замораживали при -80°C для проведения экстракции РНК кПЦР-РВ. Левое полушарие фиксировали погружением в 4% PFA для проведения гистологических исследований (иммуногистохимия).

Для демонстрации молекулярных последствий блокирования рецептора антителом к CSF-1R измеряли экспрессию последующих генов транскрипционных мишеней Aif1, Irf8, Ctse1 и Emr1 и сравнивали посредством кПЦР-РВ. Iba1 (маркер активированных клеток микроглии) и ядра клеток (DAPI) окрашивали селективными антителами. В стриатуме количественно определяли плотность экспрессирующих Iba1 клеток микроглии на мм².

Пример 6. Тестирование соединений на модели предварительно сформированных фибрилл α -синуклеина (PFF) на мышах при болезни Паркинсона.

Очищенные рекомбинантные PFF α -синуклеина дикого типа мыши центрифугируют на высокой скорости и собирают супернатант. PFF собирают в микроцентрифужные пробирки и встряхивают в течение 5 суток (1000 об./мин). Аликвоты замораживают на сухом льду и хранят при -80°C. PFF размораживают при комнатной температуре и обрабатывают ультразвуком. Концентрация суспензии до использования составляет 2,5 мкг/мкл белка в PBS. Затем самцов и/или самок мышей C57B1/6J в возрасте 10 недель подвергают анестезии кетамин/медетомидином и инъецируют PFF в правый стриатум в соответствии со следующими координатами AP+0,2 мм, ML-2,0 мм, DV-3,0 мм (общий объем 2 мкл при 0,1 мкл/мин). Антитело к CSF-1R (Ab 535; 100 мг/кг; п/к) вводят один раз в неделю в течение одного месяца, начиная на сутки после инъекции PFF. После этого периода времени животных оценивают в совокупности поведенческих тестов, таких как ротород, тест с перекладиной, тест удержания в висачем положении на проволоке и анализ походки. После поведенческого тестирования животных умерщвляют и извлекают их головной мозг. Правое полушарие фиксируют погружением в 4% PFA для проведения гистологических исследований (иммуногистохимии).

Для демонстрации молекулярных последствий блокирования рецептора антителом к CSF-1R измеряют экспрессию белка микроглии Iba1 количественной иммуногистохимией (как в примере 4). В заключении также проводят определение распространения по всему головному мозгу α -синуклеина pS129 величины суммарного α -синуклеина, подсчет дофаминергических нейронов в стриатуме и черной субстанции.

Пример 7. Защитный эффект антитела к CSF-1R в отношении частоты судорог на модели с пилокарпином на мышах.

Перед тем как вводить в исследование оценки эффективности за группой мышей с индуцированной пилокарпином эпилепсией (повторно воспроизведенной, как описано в способах) проводили постоянное наблюдение для подтверждения того, что у них проявляются спонтанные периодические судороги. Наблюдение за судорогами проводили с использованием патентованной системы (UCB Pharma) с использованием одновременной регистрации двигательной активности с использованием 3D датчика ускорения и видеокамер. Такая система обеспечивает автоматическую детекцию поведенческих судорог посредством анализа сигнала от датчика ускорения. Затем опытный технический персонал оценивал все поведенческие судороги, идентифицированные посредством детекции алгоритма, по балльной шкале во время тщательного просмотра соответствующих видеоклипов. После подтверждения наличия спонтанных периодических судорог перед началом обработки за мышами (n=64) проводили наблюдение в течение 14

суток с использованием той же системы для установления фоновой частоты судорог. Затем мышей (n=32 в группе) обрабатывали контрольным IgG или антителами к CSF-1R (100 мг/кг), два раза в неделю (всего 4 инъекции) в течение еще 14 суток непрерывного наблюдения за судорогами. Затем рассчитывали процент изменения частоты судорог по этой формуле

$$\% \text{ изменения частоты судорог} = \left(\frac{\text{частота судороги в течение периода обработки}}{\text{частота судорог до обработки}} \right) \times 100$$

Инъекция контрольного антитела IgG приводила к увеличению частоты судорог по сравнению с фоновым уровнем, при этом такое увеличение не наблюдали после обработки антителом к CSF-1R. Таким образом, наблюдали статистически значимое отличие частоты судорог во время фазы обработки по сравнению с контрольной группой и группой активного антитела (фиг. 7).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингибитор активности CSF-1R, предназначенный для лечения или профилактики эпилепсии или болезни Паркинсона, где ингибитор представляет собой антитело, или его функционально активный фрагмент, или производное, где антитело, или его фрагмент, или производное содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 для CDR-H2, и CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6 для CDR-H3, и где вариабельный домен легкой цепи содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и CDR, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3, и где антитело, или его фрагмент, или производное связывается с CSF-1R.

2. Ингибитор по п.1, где антитело, или его фрагмент, или производное является моноклональным.

3. Ингибитор по п.1 или 2, где антитело, или его фрагмент, или производное является химерным, гуманизированным или принадлежит человеку.

4. Ингибитор по любому из пп.1-3, где антитело выбрано из группы, состоящей из полной молекулы антитела, содержащей полноразмерные тяжелые и легкие цепи, или его фрагмента, выбранного из группы, состоящей из Fab, модифицированного Fab, Fab', модифицированного Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменных антител (VH, или VL, или VHH), scFv, би-, три- или тетравалентных антител, Bis-scFv, диател, триотел, тетрател или связывающих эпитоп фрагментов любого из указанных выше.

5. Ингибитор по любому из пп.1-4, где антитело, или его фрагмент, или производное проходит через гематоэнцефалический барьер (BBB), достигая в головном мозге терапевтически эффективного количества, достаточного для лечения или профилактики у пациента, страдающего эпилепсией или болезнью Паркинсона.

6. Ингибитор по любому из пп.1-5, содержащий тяжелую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и/или легкую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

7. Ингибитор по любому из пп.1-6, где антитело, или его фрагмент, или производное имеет аффинность связывания [K_D] с CSF-1R человека 10 пМ или менее 10 пМ и/или где антитело, или его фрагмент, или производное перекрестно блокирует связывание антитела по п.1 с аффинностью [K_D] 100 пМ или менее.

8. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики эпилепсии или болезни Паркинсона, содержащая ингибитор по любому из пп.1-7 и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов, разбавителей, носителей или других активных ингредиентов.

Последовательности Ab CA019_969

CDR-L1

LASEDIYDNLA SEQ ID NO:1

CDRL2

YASSLQD SEQ ID NO:2

CDR-L3

LQDSEYPWT SEQ ID NO:3

CDR-H1

GFSLTITYGMGVG SEQ ID NO:4

CDR-H2

NIWWDDDKYYNPSLKN SEQ ID NO:5

CDR-H3

IGPIKYPTAPYRYFDF SEQ ID NO:6

V-область 969 gL7 SEQ ID NO:7

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY DNLAHYQQKP GKAPKLLIYY
 ASSLQDGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG
 GTKVEIK

V-область 969 gL7 SEQ ID NO:8

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccg gtgtgggaga
 caggggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg
 catgggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat
 gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg gaagcggctc
 cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg gaggattttg
 ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcgggtgtg
 ggcaccaaag tggaaatcaa g

V-область 969 gH2 SEQ ID NO:9

EVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPPGKALEWL
 ANIWWDDDKY YNPSLKNRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
 GPIKYPTAPY RYFDWFGQGT MVTVS

V-область 969 gH2 SEQ ID NO:10

gaagtgaacac tcaaggagtc tggaccgct ctggtgaaac caacccaaac
 actcactttg acatgtactt ttagtggtct ctcattgact acctatggaa
 tgggcgtggg atggatcaga cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg
 gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac tataaccgct ccctgaaaaa
 ccggctgacc attagcaagg atacttctaa aaatcaagtg gtgctgacca
 tgacaaaatg ggatccggtt gacaccgcaa cctactactg cgcccgcatt
 ggtcccataa agtaccctac ggcaccttac cgatatttcg acttttgggg
 ccaagggaca atggttactg tctcg

Фиг. 1

Аминокислотная последовательность CSF-1R SEQ ID NO:11

MGPGLVLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNNGSVEW
 DGPPSPHWTLYSDGSSSILS TNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY
 VKDPARPWNV LAQEVVVFED QDALLPCLLT DPVLEAGVSL VRVRGRPLMR
 HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL MGGRKVMSSIS IRLKVQKVIP
 GPPALTLVPA ELVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFDFVLQHN NTKLAIPQQS
 DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA SNVQKGKSTS MFFRVVESAY
 LNLSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSDHQPEPK
 LANATTKDITY RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY
 PPEVSVIWTI INSGTLLCA ASGYQPQNT WLQCSGHTDR CDEAQVLQVW
 DDPYEVLSQ EPFHKVTVQS LLTVETLEHN QTYECRAHNS VGSGSWAFIP
 ISAGANTHPP DEFLETPVVV ACMSIMALLL LLLLLLLYKY KQKPKYQVRW
 KIIESYEGNS YTFIDTPQLP YNEKWEFPRN NLQFGKTLGA GAFGKVVEAT
 AFGLGKEDAV LKVAVKMLKS TAHADEKEAL MSELKIMSHL QHENIVNLL
 GACTHGGPVL VITEYCCYGD LLNFLRRKAE AMLGPSLSPG QDPEGGVQDYK
 NIHLKKYVR RDSGFSSQGV DTYVEMRVS TSSNDSFSEQ DLDKEDGRPL
 ELRDLHFSS QVAQGMFLA SKNCIHRDVA ARNVLLTNGH VAKIGDFGLA
 RDIMNDSNYI VKGNARLPVK WMAPESIFDC VYTVQSDVWS YGILLWEIFS
 LGLNPYPGIL VNSKFYKLVK DGYQMAQPAF APKNIYSIMQ ACWALEPTHR
 PTFQIQCSFL QEQAQEDRRE RDTNLPSSS RSGSGSSSSS ELEEESSEH
 LTCCEQGDIA QPLLQPNNYQ FC

Аминокислотная последовательность CSF-1R SEQ ID NO:12

IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTG
 TYRCTEPGDPLGGSAAIHLYVKDPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLV
 RVRGRPLMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVKVIPGPGP
 PALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFVLQHNNTKLAIPQQSDFHNNRYQKVLTL
 NLDQVDFQHAGNYSCVASNVQKGKSTSMFFRVV

Аминокислотная последовательность CSF-1R SEQ ID NO:13

MRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVK

Аминокислотная последовательность CSF-1R SEQ ID NO: 14 (SNP V32G, A245S, H247P, V279M, положение 35 подчеркнуто)

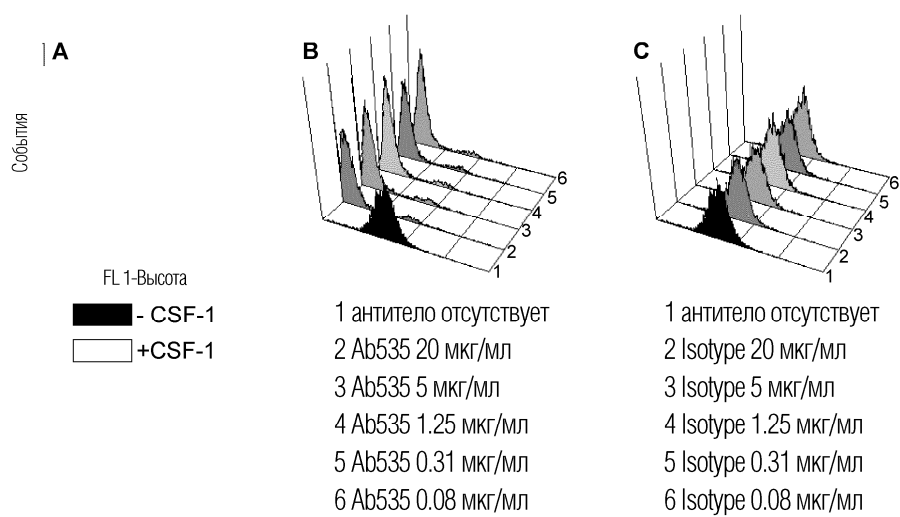
IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTG
 TYRCTEPGDPLGGSAAIHLYVKDPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLV
 RVRGRPLMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVKVIPGPGP
 PALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFVLQHNNTKLAAIHQQSDFHNNRYQKVLTL
 NLDQVDFQHAGNYSCVASNVQKGKSTSMFFRVVESAYLNLSEQNLIQEVTVGEGNLKVM
 VEAYPG LQGFNWTYLGPFSDHQPEPKLANATTKDITYRHTFTLSLPR LKPSEAGRYSFLARN
 PGGWRALTFELTLRYPPEVSVIWTIFINGSGTLLCAASGYQPQNTWLQCSGHTDR CDEAQV
 LQVWDDPYEVLSQEPFHKVTVQSLLTVETLEHNQTYECRAHNSVGSGSWAFIPISAGANT
 HPPDE

Фиг. 1 (продолжение)

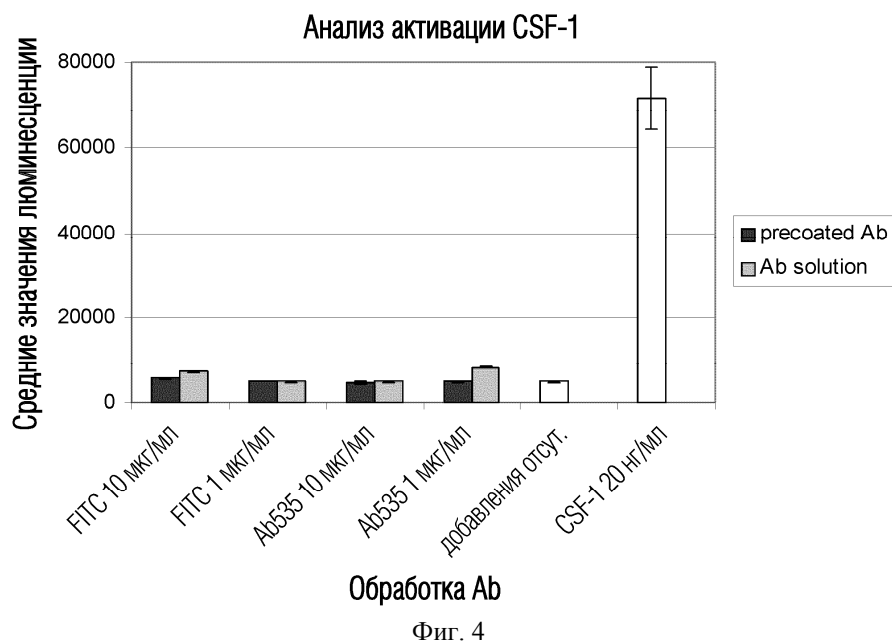
SEQ ID NO: 15

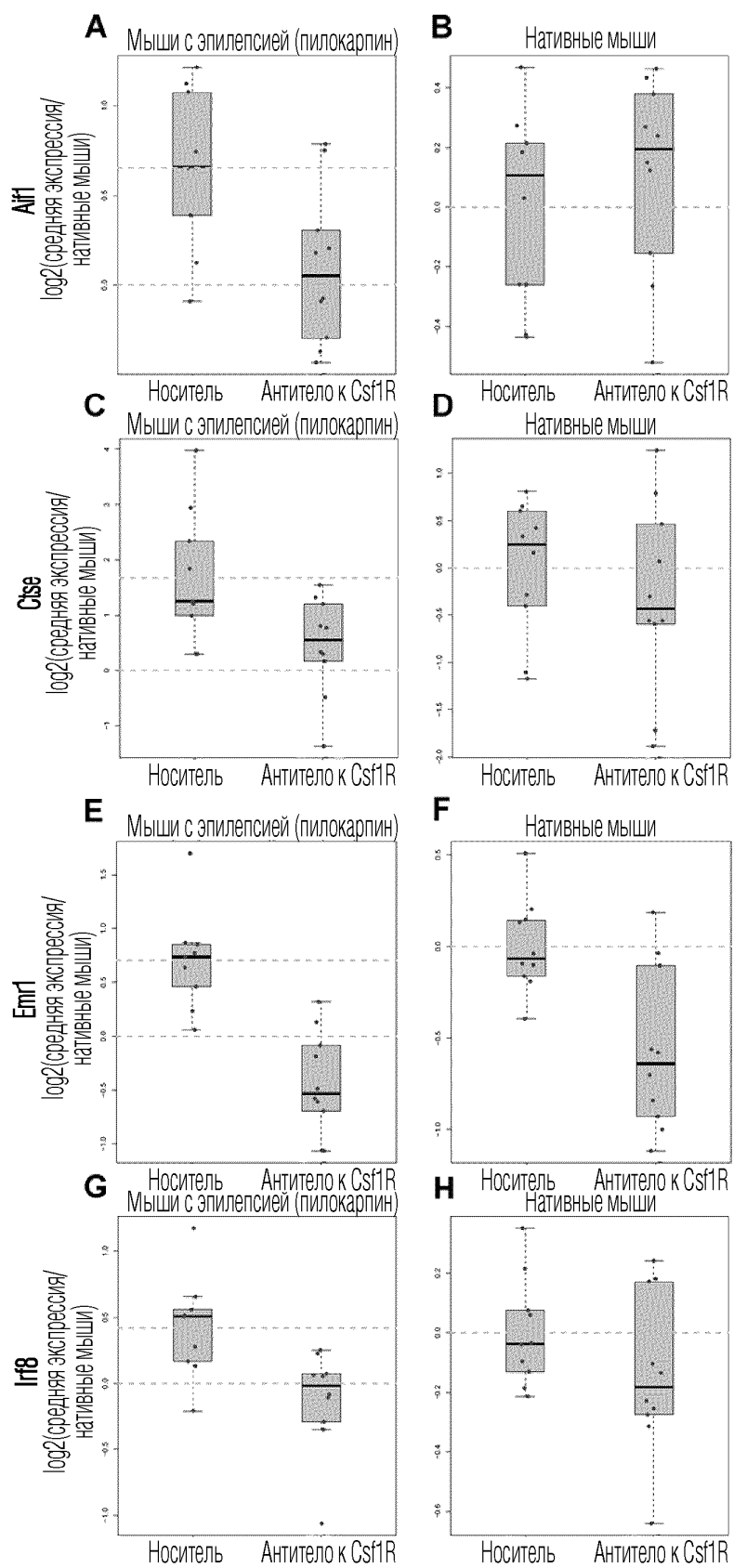
MGPGLVLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNNGSVEW DGPPSPHWTLY
 YSDGSSSILS TNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY VKDPARPWNV LAQEVVVFED
 QDALLPCLLT DPVLEAGVSL VRVRGRPLMR HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL
 MGGRKVMSSIS IRLKVQKVIP GPPALTLVPA ELVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFDFVLQHN
 NTKLAIPQQS DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA SNVQKGKSTS MFFRVVESAY
 LNLSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSDHQPEPK LANATTKDITY
 RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY PPEVSVIWTI INSGTLLCA
 ASGYQPQNT WLQCSGHTDR CDEAQVLQVW DDPYEVLSQ EPFHKVTVQS LLTVETLEHN
 QTYECRAHNS VGSGSWAFIP ISAGANTHPP DE

Фиг. 2

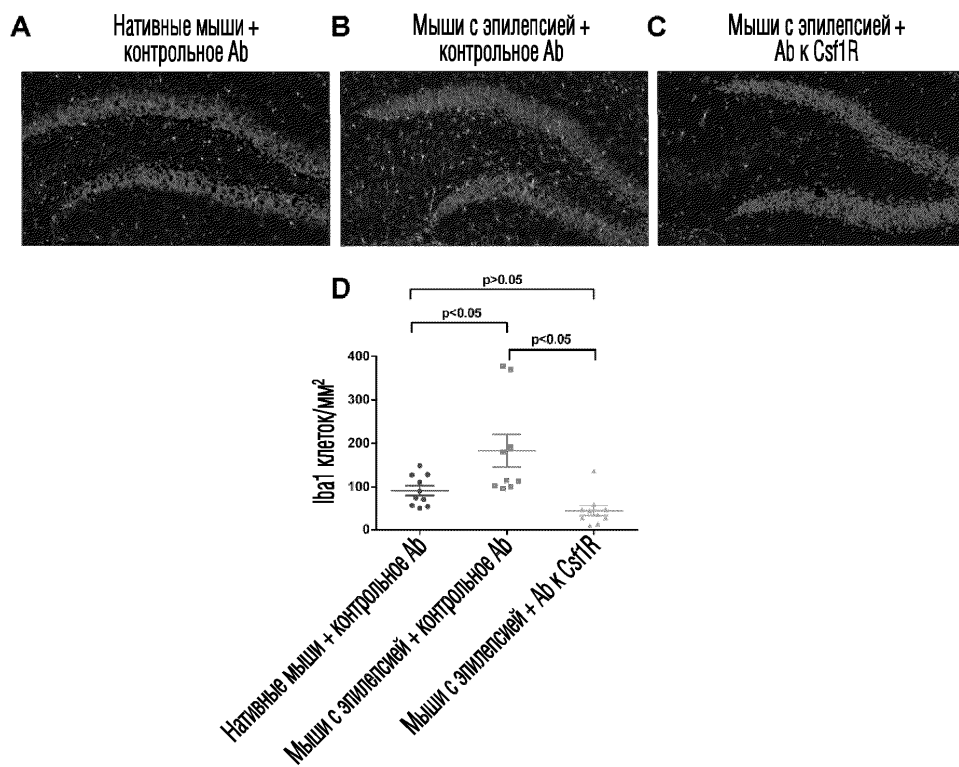


Фиг. 3

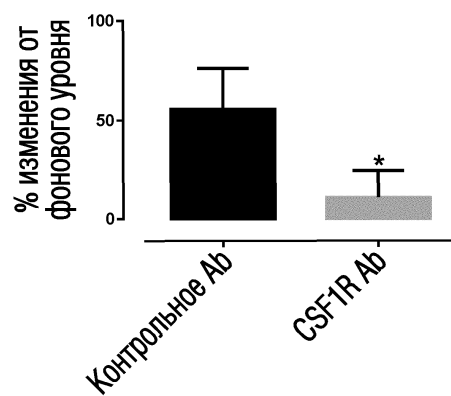




Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2