

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041742**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.11.28**

**(21)** Номер заявки  
**201991720**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.02.16**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61P 25/16** (2006.01)

---

**(54) АНТИТЕЛА К АЛЬФА-СИНУКЛЕИНУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** **62/460,416**

**(32)** **2017.02.17**

**(33)** **US**

**(43)** **2020.01.20**

**(86)** **PCT/US2018/000032**

**(87)** **WO 2018/151821 2018.08.23**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ  
КОМПАНИ (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Ахлиджаниян Майкл К., Мередит Жере  
Эрнест, мл., Девидзе Нино, Грэф Джон  
Дэвид, Холк Эдвард Л. (US)**

**(74)** Представитель:  
**Угрюмов В.М., Гизатуллин Ш.Ф. (RU)**

**(56)** WO-A1-2011104696  
WO-A2-2014058924  
WO-A1-2014132210  
WO-A1-2010069603

EMADI ET AL.: "Isolation of a Human Single Chain Antibody Fragment Against Oligomeric alpha-Synuclein that Inhibits Aggregation and Prevents alpha-Synuclein-induced Toxicity", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 368, № 4, 17 April 2007 (2007-04-17), p. 1132-1144, XP022030022, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2007.02.089, the whole document, see for instance the abstract

ELIEZER MASLIAH ET AL.: "Passive Immunization Reduces Behavioral and Neuropathological Deficits in an Alpha-Synuclein Transgenic Model of Lewy Body Disease", PLOS ONE, vol. 6, № 4, 1 January 2011 (2011-01-01), p. e19338-e19338, XP055023042, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0019338, the whole document

Paleologou K.E.: "Detection of elevated levels of soluble alpha-synuclein oligomers in post-mortem brain extracts from patients with dementia with Lewy bodies", Brain, vol. 132, № 4, 1 January 2009 (2009-01-01), p. 1093-1101, XP055276234, DOI: 10.1093/brain/awn349, retrieved from the Internet: URL: <http://brain.oxfordjournals.org/content/brain/132/4/1093.full.pdf> [retrieved on 2016-05-30], the whole document, in particular, p. 1098

---

**(57)** Изобретение относится к антителам к  $\alpha$ -синуклеину, которые предпочтительно связываются с олигомерным  $\alpha$ -синуклеином по сравнению с мономерным  $\alpha$ -синуклеином, терапевтическим композициям, содержащим антитела, и способам применения антител для лечения синуклеинопатий.

---

**B1**

**041742**

**041742  
B1**

### Информация о родственной заявке

По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/460416, поданной 17 февраля 2017 г. Содержание вышеупомянутой предварительной заявки полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки.

### Уровень техники

$\alpha$ -Синуклеин ( $\alpha$ Syn) представляет собой белок из 140 аминокислот, преимущественно экспрессируемый в нейронах на пресинаптических окончаниях, где, как полагают, он играет роль в регуляции синаптической передачи (Bendor et al., *Neuron*, 2013, 79:1044-66). Предполагается, что он изначально существует как развернутый мономер (Fauvet et al., *JBC*, 2012, 287:15345-64) и стабильный тетрамер  $\alpha$ -спиралей (Bartels et al., *Nature*, 2011, 477:107-10; Wang et al., *PNAS*, 2011, 108:17797-802), и было показано, что он подвергается нескольким посттрансляционным модификациям (Beyer and Ariza, *Mol. Neurobiol*, 2013, 47:509-24). Одной из модификаций, которая была тщательно изучена, является фосфорилирование  $\alpha$ Syn по аминокислотному остатку серина в положении 129 (S129). В норме только небольшой процент  $\alpha$ Syn конститутивно фосфорилирован по S129 (pS129), в то время как подавляющее большинство  $\alpha$ Syn, обнаруживаемое в патологических внутриклеточных включениях, представляет собой pS129  $\alpha$ Syn (Oueslati, *J. Parkinsons. Dis.*, 2016, 6:39-51). Данные патологические включения состоят из агрегированных нерастворимых скоплений неправильно свернутых белков  $\alpha$ Syn и являются характерной особенностью группы нейродегенеративных заболеваний, известных под общим названием синуклеинопатии (Galvin et al., *Arch. Neurol.*, 2001, 58, 186-90).

При синуклеинопатиях  $\alpha$ Syn может образовывать патологические агрегаты в нейронах, известные как тельца Леви, которые характерны как для болезни Паркинсона (Parkinson's Disease (PD)), так и для деменции, ассоциированной с тельцами Леви (dementia with Lewy bodies (DLB)). Кроме того, аномальные  $\alpha$ Syn-обогащенные очаги, называемые глиальными цитоплазматическими включениями (glial cytoplasmic inclusions (GCI)), обнаруживаются в олигодендроцитах и представляют собой патологический признак быстро прогрессирующей фатальной синуклеинопатии, известной как мультисистемная атрофия (multiple systems atrophy (MSA)).

Первоначальные доказательства распространения патологического  $\alpha$ Syn по всему мозгу получены из стереотипического развития патологии головного мозга, описанной для PD (Bgaak et al., 2003) и из свидетельства распространения агрегатов  $\alpha$ Syn от хозяина к трансплантату у пациентов с PD (Kordower et al., 2008). Интересно, что сообщения либо о необнаруживаемой экспрессии мРНК  $\alpha$ Syn (Ozawa et al., *Acta Neuropathologica*, 2001, 102:188-190; Miller et al., *J. Neural. Transm. (Vienna)*, 2005, 112:1613-24; Jin et al., *Journal of Medical and Dental Sciences*, 2008, 555:145-53), либо о низких уровнях экспрессии мРНК  $\alpha$ Syn (Asi et al., *Glia*, 2014, 62:964-70) в олигодендроцитах позволяют предположить, что некоторая патологическая форма  $\alpha$ Syn распространяется из нейронов, где она экспрессируется на высоком уровне, в олигодендроциты. Недавние работы подтверждают данную идею распространения  $\alpha$ Syn, демонстрируя, что  $\alpha$ Syn поглощается олигодендроцитами (Reyes et al., *Glia*, 2014, 62:387-98) и нейронами (Volpicelli-Daley et al., *Neuron*, 2011, 72:57-71; Luk et al., *Science*, 2012, 338:949-953). Более того, инокуляция гомогенатов головного мозга человека от MSA-пациентов  $\alpha$ Syn-трансгенным мышам или очищенных LB-экстрактов из головного мозга от PD-пациентов мышам и нечеловекообразным приматам приводит к неврологической дисфункции и обширным нейрональным отложениям pS129 (Watts et al., *PNAS*, 2013, 110:19555-60; Prusiner et al., *PNAS*, 2015, 112:E5308-17; Recasens et al., *Annals Neurology*, 2014, 75:351-62).

В настоящее время не хватает терапевтических средств против синуклеинопатий, влияющих на распространение  $\alpha$ Syn. Соответственно терапевтические средства, мишенью которых служили бы преимущественно патологическая форма  $\alpha$ Syn, были бы желательны в лечении пациентов с синуклеинопатиями, такими как PD, DLB и MSA.

### Сущность заявленного изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенным антителам, таким как моноклональные антитела, которые специфически связываются с  $\alpha$ -синуклеином и обладают желаемыми функциональными свойствами. Данные свойства включают в себя связывание преимущественно с олигомерным  $\alpha$ -синуклеином по сравнению с мономерным  $\alpha$ -синуклеином и способность ингибировать образование растворимых или нерастворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина) *in vitro* и *in vivo*. Описанные в настоящем документе антитела к  $\alpha$ -синуклеину можно применять для лечения, уменьшения тяжести, задержки прогрессирования, снижения риска развития, задержки наступления и диагностики синуклеинопатий, семейства заболеваний, характеризующихся наличием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим частям, которые связываются с  $\alpha$ -синуклеином и проявляют одно или несколько из следующих свойств:

- (a) связывается с мышинным и крысиным  $\alpha$ -синуклеином;
- (b) связывается с человеческим  $\beta$ -синуклеином и человеческим  $\gamma$ -синуклеином;
- (c) обладает большей аффинностью к  $\alpha$ -синуклеиновым олигомерам по сравнению с

$\alpha$ -синуклеиновыми мономерами;

(d) ингибирует образование индуцированных  $\alpha$ -синуклеиновым олигомером нерастворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина);

(e) истощает молекулярную частицу, которая продуцирует растворимые или нерастворимые агрегаты  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегаты фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина) из PFF (pre-formed fibrils) и/или лизата головного мозга, полученного от пациентов с патологическими агрегатами  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге;

(f) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 123-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1);

(g) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 125-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1);

(h) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-139 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1);

(i) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 119-126 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1); а также

(j) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-138 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1).

В определенных вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер представляет собой PFF, например, полученные, как описано в примере 3. В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры представляют собой растворимые  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры. В других вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры представляют собой нерастворимые  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры.

В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части имеют более высокую аффинность связывания к  $\alpha$ -синуклеиновым PFF, растворимым агрегатам (олигомерам) или нерастворимым агрегатам по сравнению с  $\alpha$ -синуклеиновыми мономерами, что оценивается, например, коэффициентом связывания  $\alpha$ -синуклеиновый мономер/ $\alpha$ -синуклеиновая PFF, например, как описано в примере 3. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части имеют коэффициент связывания  $\alpha$ -синуклеиновый мономер/ $\alpha$ -синуклеиновая PFF, который составляет 100 или более, например 500 или более, 700 или более, 1500 или более, 3000 или более или 5000 или более.

В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части связываются с  $\alpha$ -синуклеиновым мономером с  $EC_{50}$ , составляющей 500 нМ или более, и связываются с PFF с  $EC_{50}$ , составляющей 0,5 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части ингибируют фосфорилирование  $\alpha$ -синуклеина по серину-129, индуцированное PFF, с  $IC_{50}$ , составляющей 0,1 нМ или менее, как оценивают, например, с использованием анализа, описанного в примере 10.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфически связываются с  $\alpha$ -синуклеином и содержат три CDR варибельного участка тяжелой цепи и три CDR варибельного участка легкой цепи, которые находятся в парах варибельного участка тяжелой цепи и варибельного участка легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 9, 18 и 19, 28 и 29, 38 и 39, 48 и 49, 58 и 59, 68 и 69, 78 и 79, 94 и 95, 94 и 96, 94 и 97, 106 и 107.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с  $\alpha$ -синуклеином, включающие

(a) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 2-4 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 5-7 соответственно;

(b) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 22-24 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 25-27 соответственно;

(c) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 22-24 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 28-30 соответственно;

(d) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 37-39 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 40-42 соответственно;

(e) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 47-49 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 50-52 соответственно;

(f) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 57-59 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 60-62

соответственно;

(g) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 67-69 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 70-72 соответственно;

(h) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 77-79 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 80-82 соответственно;

(i) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 87-89 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 90-92 соответственно;

(j) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 87-89 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 93-95 соответственно;

(k) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 87-89 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 96-98 соответственно; или же

(l) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 107-109 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 110-112 соответственно.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с  $\alpha$ -синуклеином и содержат варибельные участки тяжелой и легкой цепей, причем варибельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 18, 31, 43, 53, 63, 73, 83, 99 и 113.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с  $\alpha$ -синуклеином и содержат варибельные участки тяжелой и легкой цепей, причем варибельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 19, 32, 33, 44, 54, 64, 74, 84, 100, 101, 102 и 114.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с  $\alpha$ -синуклеином и содержат последовательности варибельного участка тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 90, 95, 98, 99 или 100% идентичны аминокислотным последовательностям, которые выбраны из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 8 и 9, 18 и 19, 31 и 32, 31 и 33, 43 и 44, 53 и 54, 63 и 64, 73 и 74, 83 и 84, 99 и 100, 99 и 101, 99 и 102; и SEQ ID NO: 113 и 114.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с  $\alpha$ -синуклеином и содержат последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны аминокислотным последовательностям, которые выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 11, 20 и 21, 34 и 35, 34 и 36, 45 и 46, 55 и 56, 65 и 66, 75 и 76, 85 и 86, 103 и 104, 103 и 105, 103 и 106, 115 и 116. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части связываются со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 123-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части связываются со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 125-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1), антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части связываются со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-139 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1), антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части связываются со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 119-126 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1), антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части связываются со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-138 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части связываются с крысиным и мышинным  $\alpha$ -синуклеином. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части связываются с человеческим  $\beta$ -синуклеином и человеческим  $\gamma$ -синуклеином. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части имеют более высокую аффинность к  $\alpha$ -синуклеиновым PFF, растворимым агрегатам (олигомерам) или нерастворимым агрегатам, чем к  $\alpha$ -синуклеиновым мономерам, что оценивается коэффициентом связывания  $\alpha$ -синуклеиновый мономер/ $\alpha$ -синуклеиновая PFF (коэффициент связывания мономер:PFF), как описано, например, в примере 3. В некоторых вариантах осуществления коэффициент связывания МОНОмер:PFF составляет 100 или более, 500 или более, 700 или более, 1500 или более, 3000 или более или 5000 или более.

В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части связываются с тем же эпитопом, что и антитела к  $\alpha$ -синуклеину, описанные в настоящем документе (например, антитела 7A10, 7A10-T93A, 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и 1E8). В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части конкурируют за связывание с человеческим  $\alpha$ -синуклеином с антителами к  $\alpha$ -синуклеину, описанными в настоящем документе (например, антитела 7A10, 7A10-T93A, 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и 1E8).

В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части представляют собой антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или их варианты. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину содержат Fc-область с пониженной эффекторной функцией или с отсутствующей эффекторной функцией, например не обладающую эффекторной функцией Fc-область IgG1 со следующими мутациями: L234A, L235E и G257A.

В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части представляют собой химерные, гуманизированные или человеческие антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части модифицированы для снижения иммуногенности у человека. В одном варианте осуществления антитело к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены биспецифичные молекулы, содержащие антитело к  $\alpha$ -синуклеину, связанное с молекулой, обладающей второй специфичностью связывания.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены нуклеиновые кислоты, кодирующие CDR, или вариабельные участки тяжелой и/или легкой цепи, или тяжелые и/или легкие цепи антител к  $\alpha$ -синуклеину, или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе, векторы экспрессии, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, и клетки, трансформированные векторами экспрессии.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены иммуноконъюгаты, содержащие антитела к  $\alpha$ -синуклеину, связанные с фрагментом, таким как связывающий фрагмент, маркирующий фрагмент, биологически активный фрагмент или терапевтическое средство.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены композиции, содержащие антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части и носитель. В настоящем изобретении также обеспечены наборы, содержащие антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части, и инструкции к применению.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечен способ получения антитела к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающей части, включающий экспрессию антитела или его антигенсвязывающей части в клетке и выделение антитела или его антигенсвязывающей части из клетки.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечен способ выявления  $\alpha$ -синуклеина в образце, включающий приведение образца в контакт с антителом к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающей частью, биспецифичным антителом или иммуноконъюгатом, описанным в настоящем документе, в условиях, которые допускают образование комплекса между антителом или его антигенсвязывающей частью и  $\alpha$ -синуклеином, и выявление образования комплекса.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечен способ ингибирования образования нерастворимых или растворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина) в клетке, включающий приведение клетки в контакт с эффективным количеством антитела к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающей части, биспецифичного антитела или иммуноконъюгата, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитела ингибируют образование нерастворимых или растворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина, которые не содержат фосфорилированный по серину-129  $\alpha$ -синуклеин. В некоторых вариантах осуществления фосфорилирование серина-129 индуцируется  $\alpha$ -синуклеиновыми олигомерами. В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры представляют собой предварительно сформированные фибриллы  $\alpha$ -синуклеина. В других осуществлениях  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры получают из образцов головного мозга пациентов с синуклеинопатиями.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечен способ лечения, уменьшения тяжести, задержки прогрессирования, снижения риска развития и/или задержки наступления заболевания, характеризующегося присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, включающий введение субъекту с заболеванием эффективного количества антитела к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающей части, биспецифичного антитела или иммуноконъюгата, описанных в настоящем документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечен способ диагностики заболевания, характеризующегося присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина у субъекта, включающий

- (a) приведение образца от субъекта в контакт с антителом к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязыва-

вающей частью, биспецифичным антителом или иммуноконъюгатом, описанными в настоящем документе, так что образуется комплекс антитело-антиген;

(b) измерение количества образовавшегося комплекса; а также

(c) сравнение количества комплекса в образце с количеством в контроле, причем повышенный уровень комплекса в образце относительно контроля указывает на то, что у субъекта имеется заболевание, характеризующееся присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой спинномозговую жидкость, экстракт тканей головного мозга, мочу или кровь.

В некоторых вариантах осуществления заболевание в описанных выше способах представляет собой болезнь Паркинсона, деменцию при болезни Паркинсона, деменцию, ассоциированную с тельцами Леви, болезнь с тельцами Леви, мультисистемную атрофию или истинно вегетативную недостаточность. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные выше, дополнительно включают введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств.

#### Краткое описание фигур

Фиг. 1A-1I представляют собой серию графиков, показывающих данные по связыванию эпитопа для 7A10, 21A3, 15A5, 36A3, 11H11-1, 44B11, 1E8, 2E2 и 23H8, которые были инкубированы на планшетах, покрытых различными  $\alpha$ Syn пептидами. Связанные антитела измеряли с помощью одностороннего иммуноферментного анализа (ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Данные представляют собой единичные определения.

Фиг. 2A-2F представляют собой серию графиков связывания 7A10, 21A3, 15A5, 36A3, 11H11-1 и 44B11 с полноразмерным рекомбинантным человеческим  $\alpha$ Syn-мономером дикого типа,  $\alpha$ Syn-PFF или A53T  $\alpha$ Syn-PFF. Антитела инкубировали в растворе с увеличивающимися концентрациями  $\alpha$ Syn-мономера,  $\alpha$ Syn-PFF или A53T  $\alpha$ Syn-PFF. Несвязавшиеся антитела захватывали на планшетах, покрытых PFF, и измеряли с помощью одностороннего ELISA-анализа. Данные представляют собой среднее $\pm$ sd для двух повторных определений.

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий связывание антитела 1 (антитела, о котором известно, что оно связывается с  $\alpha$ Syn) с полноразмерным рекомбинантным человеческим  $\alpha$ Syn-мономером дикого типа,  $\alpha$ Syn-PFF или A53T  $\alpha$ Syn-PFF. Несвязанное антитело захватывали на планшетах, покрытых PFF, и измеряли с помощью одностороннего ELISA-анализа. Данные представляют собой среднее $\pm$ sd для двух повторных определений.

На фиг. 4 показан анализ "горячей точки" иммуногенности тяжелой (VH) и легкой (VK) цепей 7A10. Нумерация аминокислот соответствует нумерационной системе Кабата. Три CDR-участка заключены в прямоугольники в каждой из двух цепей, тогда как аминокислотные остатки, относящиеся к каркасному участку, обозначены как FW1, FW2 и FW3. Число под каждой аминокислотой обозначает долю аллелей, которые связывают 15-мерный пептид с центром в данной аминокислоте. Например, "5" в положении Y52 в 7A10\_VH относится к 15-членному пептиду с центром в Y52, т.е. LEWIGYIYYSGRTKY, и означает, что

(i) данный пептид не имеет соответствия с зародышевой линией человека (следовательно, не является собственным), и

(ii) от 50 до 60% из 27 аллелей показывают высокую аффинность связывания с данным пептидом.

Цифрами обозначены различные оттенки серого цвета по шкале от светло-серого (наименее вероятного иммуногенного) до темно-серого (наиболее вероятного иммуногенного очага), как показано на фигуре. Тремя стрелками, выделенными жирным шрифтом, показаны варианты выборов мутантов: R56S, K58N, T93A.

Фиг. 5A и 5B представляют собой графики, показывающие процент от здоровых добровольных человеческих доноров РВМС, с положительным ответом пролиферации CD4<sup>+</sup> после 7 дней воздействия испытываемыми антителами. Каждая горизонтальная полоса представляет одного положительного донора. Для испытания 7A10 и 7A10 T93A проводились отдельные анализы. Авастин является моноклональным антителом к VEGF A и используется в качестве отрицательного контроля. mAb  $\alpha$ -IL-21R является полностью человеческим моноклональным антителом к IL-21R и используется в качестве положительного контроля.

Фиг. 6A и 6B представляют собой графики, показывающие зависимость связывания 7A10 (фиг. 6A) и 7A10-T93A (фиг. 6B) с увеличением концентрации мышинных, крысиных и человеческих  $\alpha$ Syn пептидов и WT (дикого типа) PFF. Несвязанное антитело захватывали на планшетах, покрытых PFF, и измеряли с помощью одностороннего ELISA-анализа. Данные представляют собой среднее $\pm$ sd для двух повторных определений.

Фиг. 7A-7F представляют собой серию графиков, демонстрирующую связывание 7A10, 21A3, 15A5, 36A3, 11H11-1 и 44B11 с полноразмерными человеческими рекомбинантными  $\alpha$ Syn,  $\beta$ Syn,  $\gamma$ Syn-мономерами дикого типа;  $\alpha$ Syn-PFF был включен в качестве положительного контроля. Несвязанное антитело захватывали на планшетах, покрытых PFF, и измеряли с помощью одностороннего ELISA-анализа. Данные представляют собой среднее $\pm$ sd для двух повторных определений.

Фиг. 8А и 8В представляют собой графики, показывающие анализ связывания 7А10 и антитела 1 с мономерным  $\alpha$ Syn дикого типа или PFF, проведенный с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance (SPR)). На фиг. 8А показано связывание мономерного  $\alpha$ Syn дикого типа с 7А10, захваченным на поверхности, в качестве нижней кривой, и улучшенное связывание мультимерных PFF (верхняя кривая) с 7А10. В частности, скорость диссоциации  $\alpha$ Syn дикого типа очень высокая, тогда как диссоциация PFF очень медленная. На фиг. 8В показан тот же формат данных для антитела 1 (нижняя кривая соответствует PFF, и верхняя кривая соответствует  $\alpha$ Syn дикого типа). В отличие от 7А10 антитело 1 не проявляет заметной селективности при связывании  $\alpha$ Syn дикого типа в сравнении с PFF-формой.

Фиг. 9А и 9В представляют собой графики, показывающие результаты уточненного анализа SPR для оценки avidности 7А10 и 7А10-Т93А к PFF. На фиг. 9А показана кинетика определяемого avidностью связывания 7А10-IgG1.3f, взятого в нескольких концентрациях (3-кратное разведение от 100 до 0,4 нМ), с PFF, иммобилизованными на поверхности ( $k_a$  (1/Мс):5,811E+7,  $k_d$  (1/с):0,0 09834,  $K_D$ :1,692E-10 М). На фиг. 9В показан тот же формат данных для 7А10-Т93А-IgG1.3f ( $k_a$  (1/Мс):8,946E+7,  $k_d$  (1/с):0,03873,  $K_D$ :4,329E-10М).

Фиг. 10А представляет собой график, показывающий индукцию pS129 (нормировано относительно необработанного контроля) после 11 дней обработки 10 нМ PFF в нейронах гиппокампа крыс, трансдуцированных увеличивающимися количествами AAV-hA53T- $\alpha$ SynMOI.

Фиг. 10В представляет собой график, показывающий кривые зависимости ответа от концентрации для индукции pS129 (нормировано относительно необработанного контроля) в трансдуцированных (3К MOI AAV-hA53T  $\alpha$ Syn) нейронах гиппокампа крыс, обработанных либо hA53T- $\alpha$ Syn-PFF (верхняя (восходящая) линия), либо мономером (нижняя (плоская) линия) в течение 11 дней.

Фиг. 10С представляет собой график, показывающий индукцию pS129 (нормировано относительно контроля 10 нМ PFF) после 11 дней обработки трансдуцированных (3К MOI AAV-hA53T- $\alpha$ Syn) нейронов гиппокампа крыс с лизатами из 9 различных образцов головного мозга, полученных от пациентов с MSA. Столбцы слева направо соответствуют 10 нМ PFF, MSA#1, MSA#2, MSA#3, MSA#4, MSA#5, MSA#6, MSA#7, MSA#8 hMSA#9.

На фиг. 10D показаны иммунофлуоресцентные изображения pS129-индуцированного сигнала в трансдуцированных (3К MOI AAV-hA53T- $\alpha$ Syn) нейронах гиппокампа крысы через 11 дней после обработки буфером, 10 нМ PFF, лизатом из контрольного головного мозга или лизатом из головного мозга с MSA. Лизаты из головного мозга наносили в разведении 1:300.

Фиг. 10Е представляет собой график, показывающий обратную корреляцию между индукцией pS129  $\alpha$ Syn (нормировано относительно необработанного контроля; восходящая линия) и точками ветвления (нормировано относительно необработанного контроля; нисходящая линия) в трансдуцированных (3К MOI AAV-hA53T- $\alpha$ Syn) нейронах гиппокампа крысы после 11 дней обработки с повышением концентрации PFF.

Фиг. 10F представляет собой график, показывающий индукцию pS129  $\alpha$ Syn (нормировано относительно необработанного контроля) в трансдуцированных (3К MOI AAV-hA53T- $\alpha$ Syn) нейронах гиппокампа крысы после 11 дней обработки PFF, лизатом головного мозга с MSA и лизатом контрольного головного мозга, и выделенными высокоскоростным центрифугированием осадками и оставшимися надосадочной жидкостями от лизата головного мозга с MSA и лизата контрольного головного мозга. Столбцы слева направо соответствуют контролю, 1 нМ PFF, MSA головной мозг (лизат), MSA (осадок), MSA (надосадочная жидкость), контролю (лизат), контролю (осадок) и контролю (надосадочная жидкость).

Фиг. 10G представляет собой график, показывающий зависимую от времени индукцию pS129  $\alpha$ Syn (нормировано относительно положительного контроля 10 нМ PFF) после обработки ресуспендированным осадком из лизата ткани головного мозга с MSA. Столбцы слева направо соответствуют 7 дням после инкубации, 14 дням после инкубации и 18 дням после инкубации.

Фиг. 10H представляет собой график, показывающий индукцию pS129 (нормировано относительно необработанного контроля) и точки ветвления (нормировано относительно необработанного контроля), на 11-е сутки после обработки как 10 нМ PFF, так и лизатами ткани головного мозга с MSA. Пара столбцов, представленных для каждого контроля (столбец индукции pS129 отсутствует, учитывая отсутствие индукции), PFF и MSA, расположены в порядке, соответствующем индукции pS129 и точкам ветвления.

Фиг. 11 представляет собой серию графиков, на которых показаны кумулятивные кривые концентрация-ответ для иммуноистощения антителом 1 PFF и лизатов головного мозга, полученных от трех разных пациентов с MSA (12-18, 01-03, 04-51). Иммуноистощенные образцы тестировали на индукцию pS129 в нейронах гиппокампа крыс, трансдуцированных с 3К MOI hA53T  $\alpha$ Syn AAV. Значения, отложенные по оси Y, представляют интенсивность pS129, нормированную по отношению к неистощенным образцам. Точки, соответствующие данным (среднее $\pm$ 95% CI), и подогнанные кривые получены с использованием совокупного набора данных. IC<sub>50</sub> рассчитаны для каждого эксперимента и показаны среднее $\pm$ sd.

Фиг. 12 представляет собой серию графиков, на которых показаны кумулятивные кривые концен-

трация-ответ для 7A10-иммуноистощения PFF и лизатов головного мозга, полученных от трех разных пациентов с MSA (12-18, 01-03, 04-51). Иммуноистощенные образцы тестировали на индукцию pS129 в нейронах гиппокампа крыс, трансдуцированных с 3K MOI hA53T  $\alpha$ Syn AAV. Значения, отложенные по оси Y, представляют интенсивность pS129, нормированную по отношению к неистощенным образцам. Точки, соответствующие данным (среднее $\pm$ 95% CI), и подогнанные кривые получены с использованием совокупного набора данных. IC<sub>50</sub> рассчитаны для каждого эксперимента и показаны среднее $\pm$ sd.

Фиг. 13 представляет собой серию графиков, на которых показаны кумулятивные кривые концентрация-ответ для 21A3-иммуноистощения PFF и лизатов головного мозга, полученных от трех разных пациентов с MSA (12-18, 01-03, 04-51). Иммуноистощенные образцы тестировали на индукцию pS129 в нейронах гиппокампа крыс, трансдуцированных с 3K MOI hA53T  $\alpha$ Syn AAV. Значения, отложенные по оси Y, представляют интенсивность pS129, нормированную по отношению к неистощенным образцам. Точки, соответствующие данным (среднее $\pm$ 95% CI), и подогнанные кривые получены с использованием совокупного набора данных. IC<sub>50</sub> рассчитаны для каждого эксперимента и показаны среднее $\pm$ sd.

Фиг. 14 представляет собой серию графиков, на которых показаны кумулятивные кривые концентрация-ответ для 36A3-иммуноистощения PFF и лизатов головного мозга, полученных от трех разных пациентов с MSA (12-18, 01-03, 04-51). Иммуноистощенные образцы тестировали на индукцию pS129 в нейронах гиппокампа крыс, трансдуцированных с 3K MOI hA53T  $\alpha$ Syn AAV. Значения, отложенные по оси Y, представляют интенсивность pS129, нормированную по отношению к неистощенным образцам. Точки, соответствующие данным (среднее $\pm$ 95% CI), и подогнанные кривые получены с использованием совокупного набора данных. IC<sub>50</sub> рассчитаны для каждого эксперимента и показаны среднее $\pm$ sd.

Фиг. 15 представляет собой серию графиков, на которых показаны кумулятивные кривые концентрация-ответ для 15A5-иммуноистощения PFF и лизатов головного мозга, полученных от трех разных пациентов с MSA (12-18, 01-03, 04-51). Иммуноистощенные образцы тестировали на индукцию pS129 в нейронах гиппокампа крыс, трансдуцированных с 3K MOI hA53T  $\alpha$ Syn AAV. Значения, отложенные по оси Y, представляют интенсивность pS129, нормированную по отношению к неистощенным образцам. Точки, соответствующие данным (среднее $\pm$ 95% CI), и подогнанные кривые получены с использованием совокупного набора данных. IC<sub>50</sub> рассчитаны для каждого эксперимента и показаны среднее $\pm$ sd.

Фиг. 16 представляет собой серию графиков, на которых показаны кумулятивные кривые концентрация-ответ для 11H11-1-иммуноистощения PFF и лизатов головного мозга, полученных от трех разных пациентов с MSA (12-18, 01-03, 04-51). Иммуноистощенные образцы тестировали на индукцию pS129 в нейронах гиппокампа крыс, трансдуцированных с 3K MOI hA53T  $\alpha$ Syn AAV. Значения, отложенные по оси Y, представляют интенсивность pS129, нормированную по отношению к неистощенным образцам. Точки, соответствующие данным (среднее $\pm$ 95% CI), и подогнанные кривые получены с использованием совокупного набора данных. IC<sub>50</sub> рассчитаны для каждого эксперимента и показаны среднее $\pm$ sd.

Фиг. 17 представляет собой серию графиков, на которых показаны кумулятивные кривые концентрация-ответ для 44B11-иммуноистощения PFF и лизатов головного мозга, полученных от трех разных пациентов с MSA (12-18, 01-03, 04-51). Значения, отложенные по оси Y, представляют интенсивность pS129, нормированную по отношению к неистощенным образцам. Иммуноистощенные образцы тестировали на индукцию pS129 в нейронах гиппокампа крыс, трансдуцированных с 3K с MOI hA53T  $\alpha$ Syn AAV. Точки, соответствующие данным (среднее $\pm$ 95% CI), и подогнанные кривые получены с использованием совокупного набора данных. IC<sub>50</sub> рассчитаны для каждого эксперимента и показаны среднее $\pm$ sd.

Фиг. 18 представляет собой серию графиков, показывающих концентрации в плазме крови антитела 3 (антитело, о котором известно, что оно связывается с  $\alpha$ Syn), антитела 1, 7A10, 11H11-1, 15A5, 21A3, 36A3 и 44B11 в образцах плазмы крови, взятых непосредственно перед введением очередной дозы в период от 1 до 3 недель и через 24 ч после введения дозы на 4-й неделе. Вверху слева (концентрация в плазме крови непосредственно перед введением очередной дозы на 1-й неделе), вверху справа (концентрация в плазме крови непосредственно перед введением очередной дозы на 2-й неделе), внизу слева (концентрация в плазме крови непосредственно перед введением очередной дозы на 3-й неделе) и внизу справа (плазма, 4-я неделя, через 24 ч после введения дозы).

Фиг. 19 представляет собой график, показывающий концентрации 7A10, 21A3, 11H11-1, 15A5, 36A3, 44B11 и антитела 1 в головном мозге, ипсилатерально и контралатерально к месту инъекции PFF.

Фиг. 20 представляет собой график, показывающий плазменные уровни антитела 3, антитела 1, 7A10, 21A3, 15A5 и 44B11 на 4-й неделе для образцов без ADA-активности (кружки) и с ADA-активностью (треугольники).

На фиг. 21 показаны типичные иммуногистохимические изображения, демонстрирующие индукцию pS129  $\alpha$ Syn-патологии в ипсилатеральной мозжечковой миндалине мышей. Мышей инокулировали PBS или A53T-PFF и затем еженедельно в течение 4 недель вводили PBS или следующие антитела в дозе 10 мг/кг: антитело 1, 7A10, 21A3, антитело 3, 15A5, 36A3, 44B11 и 11H11-1. Срезы мозга окрашивали на pS129  $\alpha$ Syn. Стрелками выделены примеры pS129  $\alpha$ Syn-агрегатов, обнаруженных в контрольном срезе A53T-PFF. Изображения были получены с использованием объектива с 10-кратным увеличением.

Фиг. 22А-22D представляют собой графики, показывающие количество клеток, положительных на окрашивание pS129 в моторной коре (фиг. 22А и 22В) и мозжечковой миндалине (фиг. 22С и 22D), ипсилатеральных к стриатальному месту инъекции А53Т-РФФ. Приведены средние значения по группам и статистическая значимость (фиг. 22А и 22С) и данные по отдельным животным (фиг. 22В и 22D). Статистический анализ на основе однофакторного ANOVA с последующим тестом Даннетта с использованием группы РФФ в качестве контроля (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Фиг. 23А-23D представляют собой графики, показывающие уровни  $\alpha$ Syn-олигомеров, измеренные в ткани головного мозга с использованием двух независимых анализов ELISA. Были проанализированы растворимые экстракты из полушарий головного мозга, контралатеральные и ипсилатеральные к месту инъекции. Приведены средние значения по группам и статистическая значимость (фиг. 23А и 23С) и данные по отдельным животным (фиг. 23В и 23D). Статистический анализ на основе однофакторного ANOVA с последующим тестом Даннетта с использованием группы РФФ в качестве контроля \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Фиг. 24А-24D представляют собой серию графиков, показывающих уровни pS129  $\alpha$ Syn (фиг. 24А и 24В) и суммарного  $\alpha$ Syn (фиг. 24С и 24D), измеренные в ткани головного мозга с использованием анализа ELISA. Были проанализированы растворимые экстракты из полушарий головного мозга, контралатеральные и ипсилатеральные к месту инъекции. Приведены средние значения по группам (фиг. 24А и 24С) и данные по отдельным животным (фиг. 24В и 24D). Не было статистически значимых различий между группами (статистический анализ, основанный на однофакторном ANOVA с последующим тестом Даннетта с использованием группы РФФ в качестве контроля).

Фиг. 25 представляет собой серию графиков, показывающих связывание упомянутых антител при титровании  $\alpha$ Syn-мономера или  $\alpha$ Syn-РФФ. Несвязавшиеся антитела захватывали на планшетах, покрытых РФФ, и измеряли с помощью одностороннего анализа ELISA. Данные представляют среднее  $\pm$ sd для двух повторных определений.

Фиг. 26 представляет собой серию графиков, показывающих связывание упомянутых антител при титровании  $\alpha$ Syn-мономера или  $\alpha$ Syn-РФФ. Несвязавшиеся антитела захватывали на планшетах, покрытых РФФ, и измеряли с помощью одностороннего анализа ELISA. Данные представляют собой среднее  $\pm$ sd для двух повторных определений.

Фиг. 27 представляет собой серию графиков, показывающих выявление  $\alpha$ Syn-мономера и  $\alpha$ Syn-РФФ с помощью анализов ELISA 1Е8.10+2Е2.2 (захватывающее антитело 1Е8, детектирующее антитело 2Е2) и MJFR14642+23Н8.G3 (захватывающее антитело MJFR14642, детектирующее антитело 23Н8). Показаны примеры зависимостей концентрация-ответ. Образцы мономера и РФФ предварительно обрабатывали ультразвуком перед проведением анализа ELISA. Уровни мономерного синуклеина и РФФ-синуклеина выражены в эквиваленте мономера нг/мл. Данные представляют среднее  $\pm$ sd из трех определений. CPS=счет в секунду.

Фиг. 28 представляет собой серию графиков, показывающих выявление  $\alpha$ Syn-мономера и  $\alpha$ Syn-РФФ с использованием анализа ELISA. Показаны примеры зависимостей концентрация-ответ. Захватывающее антитело соответствует первому указанному антителу, детектирующее антитело соответствует второму указанному антителу. Образцы мономера и РФФ предварительно обрабатывали ультразвуком перед проведением анализа ELISA. Уровни мономерного синуклеина и РФФ-синуклеина выражены в эквиваленте мономера нг/мл. Выявление pS129  $\alpha$ Syn пептида оценивали с помощью анализа ELISA MJFR1+MJFR13. Данные представляют среднее  $\pm$ sd из трех определений. CPS=счет в секунду.

Фиг. 29 представляет собой серию графиков, показывающих выявление  $\alpha$ Syn и членов  $\alpha$ Syn-семейства  $\beta$ -синуклеина и  $\gamma$ -синуклеина с помощью анализа ELISA. Захватывающее антитело соответствует первому указанному антителу, детектирующее антитело соответствует второму указанному антителу. Показаны примеры зависимостей концентрация-ответ. Данные представляют среднее  $\pm$ sd из двух определений. CPS=счет в секунду.

Фиг. 30 представляет собой серию графиков, показывающих уровни  $\alpha$ Syn, измеренные в контрольном экстракте, PD-, AD- и PSP-экстрактах с использованием анализов ELISA 1Е8.10+2Е2.2 на олигомеры, ELISA MJFR14642+23Н8.G3 на олигомеры, ELISA MJFR1+4В12 на суммарный  $\alpha$ Syn и ELISA MJFR1+MJFR13 (pS129). Захватывающее антитело соответствует первому указанному антителу, детектирующее антитело соответствует второму указанному антителу. Уровни выражены в виде эквивалента  $\alpha$ Syn-мономера или эквивалента пептида pS129 (MJFR1+MJFR13), нормировано относительно суммарного белка (пг/мг белка). Статистика основана на одностороннем ANOVA с множественными сравнениями Даннетта относительно контрольной группы. Следует отметить, что статистика результатов олигомерного анализа не проводилась, поскольку большинство контрольных образцов были  $< LLQ$ . \*  $p < 0,05$ .

Фиг. 31 представляет собой серию графиков, показывающих уровни  $\alpha$ Syn, измеренные в контрольном экстракте, MSA-, DLB- и PD-экстрактах с использованием анализов ELISA 1Е8.10+2Е2.2 на олигомеры, ELISA MJFR14642+23Н8.G3 на олигомеры, ELISA MJFR1+4В12 на суммарный  $\alpha$ Syn и ELISA MJFR1+MJFR13 (pS129). Захватывающее антитело соответствует первому указанному антителу, детек-

тирующее антитело соответствует второму указанному антителу. Уровни выражены в виде эквивалента  $\alpha$ Syn-мономера или эквивалента пептида pS129 (MJFR1+MJFR13), нормировано относительно суммарного белка (пг/мг белка). Статистика основана на однофакторном ANOVA с множественными сравнениями Даннетта относительно контрольной группы. Следует отметить, что статистика результатов олигомерного анализа не проводилась, поскольку большинство контрольных образцов были <LLQ. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Фиг. 32 представляет собой серию графиков, показывающих уровни  $\alpha$ Syn, измеренные в контрольном экстракте, MSA-, DLB- и PD-экстрактах, используя анализ ELISA MJFR1+Syn303 на N-концевой участок и анализ ELISA MJFR1+4D6 на C-концевой участок. Захватывающее антитело соответствует первому указанному антителу, детектирующее антитело соответствует второму указанному антителу. Уровни выражены в виде эквивалента  $\alpha$ Syn-мономера, нормировано относительно суммарного белка (пг/мг белка). Никаких существенных различий не наблюдалось (статистические данные основаны на однофакторном ANOVA с множественными сравнениями Даннетта относительно контрольной группы).

Фиг. 33 представляет собой серию графиков, показывающих корреляцию уровней  $\alpha$ Syn, измеренных в MSA-, DLB- и PD-экстрактах, с использованием анализов ELISA 1E8.10+2E2.2 на олигомеры, ELISA MJFR14642+23H8.G3 на олигомеры, ELISA MJFR1+4B12 на суммарный  $\alpha$ Syn и ELISA MJFR1+MJFR13 (pS129). Захватывающее антитело соответствует первому указанному антителу, детектирующее антитело соответствует второму указанному антителу. Уровни выражены в виде эквивалента  $\alpha$ Syn-мономера или эквивалента пептида pS129 (MJFR1+MJFR13). Обратите внимание, что единицы в анализах 1E8+2E2, MJFR14642+23H8, MJFR1+4B12 выражены в нг/мл. Пунктирная линия обозначает соотношение 1:1.

На фиг. 34 представлена серия графиков, показывающих корреляцию уровней  $\alpha$ Syn, измеренных в контрольном экстракте, MSA-, DLB- и PD-экстрактах с помощью анализов ELISA MJFR1+4B12 на суммарный  $\alpha$ Syn, ELISA MJFR1+Syn303 на N-концевой участок, ELISA MJFR1+4D6 на C-концевой участок и ELISA MJFR1+MJFR13 (pS129). Захватывающее антитело соответствует первому указанному антителу, детектирующее антитело соответствует второму указанному антителу. Уровни выражены в виде эквивалента  $\alpha$ Syn-мономера или эквивалента пептида pS129 (MJFR1+MJFR13). Обратите внимание, что единицы в анализах MJFR1+4B12, MJFR1+Syn303, MJFR1+4D6 выражаются в нг/мл. Пунктирная линия обозначает соотношение 1:1.

Фиг. 35 представляет собой серию графиков, показывающих выявление и извлечение олигомеров в осадках, выделенных высокоскоростным центрифугированием из контрольного экстракта, MSA-, DLB- и PD-экстрактов. Уровни измерены с помощью анализов ELISA 1E8.10+2E2.2 на олигомеры, ELISA MJFR14642+23H8.G3 на олигомеры и выражены в виде эквивалента  $\alpha$ Syn-мономера. Захватывающее антитело соответствует первому указанному антителу, детектирующее антитело соответствует второму указанному антителу. Пунктирная линия обозначает соотношение 1:1. % извлечения рассчитан на основании начальных уровней олигомера и показан для анализа 1E8+2E2.

На фиг. 36 показаны иммуноблоты фракций осадка и надосадочной жидкости (sup), выделенных из экстрактов, полученных из образцов ткани головного мозга от контрольного субъекта (11-46) и пациента с MSA (11-46). Экстракты головного мозга подвергали SEC, а затем фракции 5-14 анализировали с помощью SDS-PAGE/иммуноблоттинга. Стандарт  $\alpha$ Syn-мономер (дорожка A) и стандарты молекулярных масс также были включены в каждый иммуноблоттинг. Большая часть  $\alpha$ Syn во фракциях надосадочной жидкости элюируется во фракции 10, что соответствует молекулярной массе ~60 кДа, и расщепляется до мономера и фрагмента расщепления при проведении SDS-PAGE/иммуноблоттинга. Аналогичные результаты наблюдались как для контрольных образцов, так и для MSA-образцов. Большая часть  $\alpha$ Syn в осадке, элюируемая в свободном объеме (фракция 6), соответствующая молекулярной массе >670 кДа, распадалась на мономер и фрагмент расщепления при проведении SDS-PAGE/иммуноблоттинга. Антитело 4B12 против  $\alpha$ Syn использовали для иммуноблоттинга.

На фиг. 37 представлен иммуноблот осадков экстракта головного мозга, выделенных из образца ткани головного мозга от контрольного субъекта и образцов тканей головного мозга от пациентов с MSA, DLB и PD. Показаны результаты для области молекулярных масс <20 кДа. Образцы анализировали с помощью  $\alpha$ Syn-антител 4B12, 4D6, EP1536Y и контрольного антитела к актину.

На фиг. 38 представлен иммуноблот осадков экстракта головного мозга, выделенных из образца ткани головного мозга от контрольного субъекта и образцов тканей головного мозга от пациентов с MSA, DLB и PD. Показаны результаты для области молекулярных масс от 30 до 40 кДа. Образцы анализировали с помощью  $\alpha$ Syn-антител Syn303, 4B12, LB509, 81a, 4D6 и контрольного антитела IgG.

На фиг. 39 представлен иммуноблот осадков экстракта головного мозга, выделенных из образца ткани головного мозга от контрольного субъекта и образцов тканей головного мозга от пациентов с MSA, DLB и PD. Показаны результаты для области молекулярных масс от 60 до 100 кДа. Образцы анализировали с помощью  $\alpha$ Syn-антител Syn303, 4B12, LB509, 4D6 и контрольного антитела IgG.

Фиг. 40 представляет собой серию графиков, показывающих индукцию pS129  $\alpha$ Syn в трансдуциро-

ванных (AAB-hA53T- $\alpha$ Syn 3K MOI) первичных нейронах гиппокампа крысы. Нейроны обрабатывали осадками экстракта головного мозга из контрольного экстракта и из MSA-, DLB- и PD-экстрактов в течение 11 дней до экстракции и фиксации. Сигнал нерастворимого pS129 измеряли с помощью высокоинформативного (high content (HC)) анализа и нормировали относительно контроля обработки с PFF (10 нМ). HC сигнал, детектированный с осадками из контрольного экстракта, был аналогичен фоновому сигналу. Уровень HC сигнала для каждого осадка коррелировал с сигналом олигомера, измеренным с использованием анализа ELISA 1E8+2E2. Уровни выражены в виде эквивалента  $\alpha$ Syn-мономера.

Фиг. 41 представляет собой серию графиков, показывающих уровни олигомера  $\alpha$ Syn (1E8+2E2 и MJFR14642+23H8) и суммарного  $\alpha$ Syn (MJFR1+4B12) из CSF-образцов человека, взятых от пациентов с MSA, прогрессирующим надъядерным параличом (progressive supranuclear palsy (PSP)) и от контрольных здоровых субъектов. Захватывающее антитело соответствует первому указанному антителу, детектирующее антитело соответствует второму указанному антителу. CSF разбавляли в 4 раза (1E8+2E2 и MJFR14642+23H8) и в 20 раз (MJFR1+4B12) перед анализом. Данные выражены с поправкой на разбавление и в виде эквивалента  $\alpha$ Syn-мономера (пг/мл). LLQ, определяется как  $2 \times$  фон анализа, и LLQ с поправкой на разбавление указаны для каждого анализа. Среднее и SD для уровней MJFR1+4B12 показаны в таблице.

Фиг. 42 представляет собой серию графиков, показывающих уровни олигомера  $\alpha$ Syn (1E8+2E2 и MJFR14642+23H8) и суммарного  $\alpha$ Syn (MJFR1+4B12) из CSF-образцов человека, взятых от пациентов с MSA и от контрольных здоровых субъектов. CSF разбавляли в 4 раза (1E8+2E2 и MJFR14642+23H8) и в 20 раз (MJFR1+4B12) перед анализом. Данные выражены с поправкой на разбавление и в виде эквивалента  $\alpha$ Syn-мономера (пг/мл). LLQ определяется как  $2 \times$  фон анализа и LLQ с поправкой на разбавление указаны для каждого анализа. Среднее и SD для уровней MJFR1+4B12 показаны в таблице.

#### Подробное описание

В настоящем изобретении описаны выделенные антитела, в частности моноклональные антитела, например, человеческие моноклональные антитела, которые предпочтительно связываются с олигомерным  $\alpha$ -синуклеином по сравнению с мономерным  $\alpha$ -синуклеином. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем изобретении, получены из конкретных последовательностей тяжелой и легкой цепей зародышевой линии и/или содержат конкретные структурные особенности, такие как участки CDR, содержащие конкретные аминокислотные последовательности. Настоящее изобретение относится к выделенным антителам, способам получения таких антител, иммуноконъюгатам и биспецифичным молекулам, содержащим такие антитела, и фармацевтическим композициям, приготовленным так, чтобы содержать данные антитела. Настоящее изобретение также относится к способам применения антител с целью ингибирования образования нерастворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина. Соответственно описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут применяться в лечении в самых разных терапевтических применениях, включая, например, лечение заболеваний, ассоциированных с тельцами Леви, и синуклеинопатий, а также для диагностических анализов.

Определения.

С целью облегчения понимания настоящего описания некоторым терминам сначала дается определение. Дополнительные определения приводятся на протяжении подробного описания.

Термины " $\alpha$ -синуклеин" и " $\alpha$ Syn" используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к полипептиду из 140 аминокислот со следующей аминокислотной последовательностью (человеческий  $\alpha$ -синуклеин дикого типа):

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAAEAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVV

HG VATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDG

LGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA (SEQ ID NO: 1;

номер доступа в GenBank P37840).

Белок имеет три узнаваемых домена, домен с повторами KTKK, охватывающий аминокислоты от 1 до 61, NAC-домен (неамилоидный компонент), состоящий из аминокислот приблизительно от 60 до 95, и C-концевой кислотный домен, состоящий из аминокислот приблизительно от 98 до 140. Если не указано иное,  $\alpha$ -синуклеин или его фрагменты включают вышеупомянутую природную человеческую аминокислотную последовательность дикого типа и ее аллельные варианты. Например, также включены варианты, связанные с болезнью с тельцами Леви (например, E46K, A30P и A53T). Индуцированные мутации E83Q, A90V, A76T, которые усиливают агрегацию  $\alpha$ -синуклеина, также могут присутствовать по отдельности или в сочетании друг с другом и/или человеческими аллельными вариантами E46K, A30P и A53T.

Используемый в настоящем документе термин "синуклеинопатия" относится к нейродегенеративным расстройствам, характеризующимся наличием аномального скопления агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в нейронах и глиях, и включает, например, болезнь Паркинсона (PD), PD с деменцией (PD with Dementia (PDD)), деменцию, ассоциированную с образованием телец Леви (Dementia with Lewy Bodies (DLB)), мультисистемную атрофию (Multiple System Atrophy (MSA)), болезнь Гоше (Gaucher's disease (GD)), ней-

родегенерацию с отложением железа в головном мозге (NBIA), болезнь Альцгеймера (AD) и лизосомные нарушения накопления (lysosomal storage disorders (LSD)), включая синдром Санфилиппо (Sanfilippo), синдром Хантера (Hunter), болезнь Тея-Сакса и Сандхоффа (Tay-Sachs and Sandhoff) и болезнь Ниманна-Пика (Niemann-Pick) типа С. Скопления агрегатов  $\alpha$ -синуклеина, обнаруженные в клеточных телах или нейритах нейронов, называются тельцами Леви и нейритами Леви соответственно и представляют собой патологические признаки PD и DLB. Наличие глиальных цитоплазматических включений (glial cytoplasmic inclusions (GCI))  $\alpha$ -синуклеина, обнаруженных в олигодендроцитах, является патологическим признаком MSA.

"Мультисистемная атрофия" или "MSA" представляет собой нейродегенеративное заболевание, отмеченное сочетанием симптомов; заболевание влияет на подвижность, кровяное давление и другие функции организма. Симптомы MSA различаются по скорости нарастания и степени тяжести от человека к человеку. В связи в этом три различных заболевания были первоначально описаны для достижения данного диапазона симптомов; синдром Shy-Drager, стриатонигральная дегенерация (striatonigral degeneration (SD)) и оливопонтocerebellарная атрофия (olivopontocerebellar atrophy (OPCA)).

Используемый в настоящем документе термин " $\alpha$ -синуклеиновый олигомер" относится к совокупности двух или более  $\alpha$ -синуклеиновых мономеров и может иметь диапазон молекулярных масс. В общем случае олигомеры понимаются как растворимые виды агрегатов по сравнению с менее растворимыми фибриллами. Полагают, что растворимые олигомеры частично содержат так называемые "трансмиссивные виды"  $\alpha$ -синуклеина, ответственные за распространение патологии  $\alpha$ -синуклеина между клетками. Если не указано иное, "предварительно сформированные фибриллы (preformed fibrils)" или "PFF" представляют собой разновидность  $\alpha$ -синуклеиновых олигомеров, например  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры, полученные, как описано в примере 3. Под PFF понимают, что они изготовлены из рекомбинантного человеческого мономерного  $\alpha$ -синуклеина в условиях, благоприятствующих агрегации и фибриллизации.

Используемый в настоящем документе термин "коэффициент связывания мономер/PFF" относится к соотношению аффинности связывания анти- $\alpha$ -синуклеиновых антител для мономеров  $\alpha$ -синуклеина и аффинности связывания антител с PFF. Коэффициенты более 1 указывают на большее предпочтение связывания с PFF, чем с  $\alpha$ -синуклеиновым мономером. Например, если антитело связывается с  $\alpha$ -синуклеиновым мономером с  $EC_{50}$ , составляющей 291 нМ, и с PFF с  $EC_{50}$ , составляющей 0,16 нМ, используя, например, анализ ELISA, описанный в примере 3, коэффициент связывания мономер/PFF данного антитела будет составлять  $291/0,16=1819$ . В некоторых вариантах осуществления для определения коэффициента связывания мономер/PFF могут использоваться анализы, отличные от ELISA. В некоторых вариантах осуществления PFF получают с использованием способа, описанного в примере 3. В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры отличаются от PFF, которые используются для получения коэффициента аффинности связывания мономер/олигомер.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" включает в себя цельные антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты (т.е. "антигенсвязывающие части") или их отдельные цепи. "Антитело" в одном варианте осуществления относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного участка тяжелой цепи (сокращенно обозначенного в настоящем документе как  $V_H$ ) и константного участка тяжелой цепи. В некоторых встречающихся в природе антителах константный участок тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. В некоторых встречающихся в природе антителах каждая легкая цепь состоит из переменного участка легкой цепи (сокращенно обозначенного в настоящем документе как  $V_L$ ) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области  $V_H$  и  $V_L$  можно дополнительно подразделить на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), чередующиеся с областями, которые представляют собой более консервативные и называются каркасными областями (FR). Каждый  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные участки тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая в себя различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Антитела, как правило, специфически связываются с их родственными антигенами с высокой аффинностью, отраженной посредством константы диссоциации ( $K_D$ ) в интервале от  $10^{-5}$  до  $10^{-11}$  М или менее. Как правило, считается, что любая  $K_D$ , превышающая приблизительно  $10^{-4}$  М, указывает на неспецифическое связывание. Как использовано в данном описании, антитело, которое "специфично связывается" с антигеном, относится к антителу, которое связывается с антигеном и по существу идентичными антигенами с высокой аффинностью, что означает характеризующемуся  $K_D$ , составляющей  $10^{-7}$  М или менее, предпочтительно  $10^{-8}$  М или менее, еще более предпочтительно  $5 \times 10^{-9}$  М или менее и наиболее предпоч-

тительно от  $10^{-8}$  до  $10^{-10}$  М или менее, но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген является "по существу идентичным" данному антигену, если он обладает высокой степенью идентичности последовательности по отношению к данному антигену, например, если он проявляет идентичность последовательности, составляющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 97% или даже более предпочтительно по меньшей мере 99%, по отношению к последовательности данного антигена.

Иммуноглобулин может быть любым из широко известных изотипов, включая в себя без ограничения, IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Изотип IgG подразделяется на подклассы у определенных видов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. Иммуноглобулины, например IgG1, существуют в нескольких аллотипах, которые отличаются друг от друга не более чем несколькими аминокислотами. "Антитело" включает в качестве примера как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие и нечеловеческие антитела; полностью синтетические антитела; и одноцепочечные антитела.

Используемый в настоящем документе термин "антигенсвязывающая часть" антитела относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, человеческим  $\alpha$ -синуклеином). Такие "фрагменты" имеют длину, например, от около 8 до около 1500 аминокислот, длину от около 8 до около 745 аминокислот, предпочтительно длину от около 8 до около 300, например, от около 8 до около 200 аминокислот или от около 10 до около 50 или 100 аминокислот. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающая часть" антитела, включают

- (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов  $V_L$ ,  $V_H$ , CL и CH1;
- (ii) фрагмент  $F(ab')_2$ , двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной участки;
- (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов  $V_H$  и CH1;
- (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов  $V_L$  и  $V_H$  одного плеча антитела,
- (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989), Nature, 341:544-546), который состоит из домена  $V_H$ ; и
- (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR); или
- (vii) сочетание двух или более изолированных CDR, которые могут быть необязательно соединены синтетическим линкером.

Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента,  $V_L$  и  $V_H$ , кодируются отдельными генами, их можно объединить с использованием рекомбинантных способов посредством синтетического линкера, который позволяет получать их в виде единственной белковой цепи, в которой пары областей  $V_L$  и  $V_H$  образуют одновалентные молекулы, известные как одноцепочечные Fv (известные как одноцепочечные Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988), Science, 242:423-426; и Huston et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также предназначены для включения в термин "антигенсвязывающая часть" антитела. Данные фрагменты антител получают с использованием обычных способами, известными специалистам в настоящей области техники, и фрагменты подвергают скринингу на предмет целесообразности таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие части могут быть получены способами рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

"Биспецифичное" или "бифункциональное антитело" представляет собой искусственное гибридное антитело, содержащее две разные пары тяжелые/легкие цепи и два разных сайта связывания. Биспецифичные антитела могут быть получены различными способами, включающими в себя слияние гибридом или связывание фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostdny et al., J. Immunol., 148, 1547-1553 (1992).

Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое проявляет единственную специфичность и аффинность связывания для конкретного эпитопа или композиции антител, в которых все антитела проявляют одну специфичность и аффинность связывания к конкретному эпитопу. Соответственно термин "моноклональное антитело человека" относится к антителу или композиции антител, которое(ые) проявляет(ют) единственную специфичность связывания и содержит(ат) переменные и необязательные константные участки, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Согласно одному варианту осуществления моноклональные человеческие антитела посредством гибридомы, например, полученной путем слияния В-клетки, полученной из трансгенного отличного от человека животного, например трансгенной мыши, характеризующейся геномом, содержащим трансген человеческой тяжелой цепи и трансген легкой цепи, с иммортализованной клеткой.

Термин "рекомбинантное человеческое антитело" в контексте настоящего описания включает в себя все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такими как

- (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или

транскромосомным для генов иммуноглобулина человека или полученной из него гибридомы;

(b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы;

(c) антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных человеческих антител; и

(d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые предусматривают сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК.

Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные участки, в которых используются определенные последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, которые кодируются генами зародышевой линии, но включают последующие реаранжировки и мутации, которые происходят, например, во время созревания антител. Как известно в настоящей области техники (см., например, Lonberg (2005), *Nature Biotech.*, 23(9):1117-1125), переменный участок содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется различными генами, которые реаранжируют с образованием антитела, специфичного к чужеродному антигену. В дополнение к реаранжировке переменный участок может быть дополнительно модифицирован несколькими изменениями отдельных аминокислот (называемых соматической мутацией или гипермутацией), чтобы увеличить аффинность антитела к чужеродному антигену. Константный участок будет меняться в дальнейшем ответе на антиген (т.е. переключение изотипа). Следовательно, перегруппированные и соматически мутированные молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, могут быть не идентичны исходным последовательностям зародышевой линии, но вместо этого будут по существу идентичными или похожими (т.е. характеризоваться идентичностью, составляющей по меньшей мере 80%).

"Человеческое" антитело (HuMAb) относится к антителу, содержащему переменные участки, в которых как каркасные, так и CDR-участки получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константный участок, константный участок также происходит от последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела, описанные в настоящем изобретении, могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако термин "человеческое антитело" при использовании в настоящем документе не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности. Термины "человеческие" антитела и "полностью человеческие" антитела используются как синонимы.

"Гуманизированное" антитело относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами доменов CDR отличного от человеческого антитела заменены соответствующими аминокислотами, полученными из иммуноглобулинов человека. В одном варианте осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR были заменены аминокислотами из человеческих иммуноглобулинов, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одной или нескольких областях CDR остались неизменными. Допускаются небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот, если они не отменяют способность антитела связываться с определенным антигеном. "Гуманизированное" антитело сохраняет антигенную специфичность, аналогичную таковой оригинального антитела.

"Химерное антитело" относится к антителу, в котором переменные участки происходят от одного вида, а константные участки происходят от другого вида, такого как антитело, в котором переменные участки происходят от мышиного антитела, а константные участки происходят от человеческого антитела.

Используемый в данном описании термин "изотип" относится к классу антител (например, антитело IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE), который кодируется генами константного участка тяжелой цепи.

"Аллотип" относится к встречающимся в природе вариантам в конкретной изотипной группе, варианты которых отличаются одной или несколькими аминокислотами, (см., например, Jefferis et al. (2009) *mAbs* 1:1). Антитела, описанные в настоящем изобретении, могут быть любого аллотипа. Используемые в настоящем документе антитела, называемые изотипом "IgG1f" или "IgG1.3f", представляют собой антитела IgG1 и IgG1.3 с отсутствующей эффекторной функцией, соответственно аллотипа "f", т.е. имеющие L234A, L235E и G237A в соответствии с индексом ЕС в системе нумерации по Кабату (Kabat), как показано, например, в SEQ ID NO: 119.

Фразы "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфичное к антигену" используются в настоящем документе взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфично связывается с антигеном".

"Выделенное антитело", при использовании в настоящем документе, предназначено для обозначения антитела, которое по существу не содержит других антител, характеризующихся разными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфично связывается с  $\alpha$ -синуклеином, по

существу не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от  $\alpha$ -синуклеина). Выделенное антитело, которое специфично связывается с эпитопом  $\alpha$ -синуклеина, может, однако, характеризоваться перекрестной реактивностью к другим белкам  $\alpha$ -синуклеина от разных видов (например, к  $\alpha$ -синуклеину от мыши или крысы).

"Эффекторная функция" относится к взаимодействию Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом или к биохимическому событию, которое возникает в результате такого взаимодействия. Типичные "эффекторные функции" включают в себя связывание C1q, комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание с Fc-рецептором, Fc $\gamma$ R - опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), и подавление рецептора на клеточной поверхности (например, рецептор В-клеток; BCR). Такие эффекторные функции обычно требуют, чтобы Fc-область объединялась с антигенсвязывающим доменом (например, переменным доменом антитела).

"Fc-рецептор" или "FcR" представляет собой рецептор, который связывается с Fc-областью иммуноглобулина. FcR, которые связываются с антителом IgG, содержат рецепторы семейства Fc $\gamma$ R, включая в себя аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы данных рецепторов. Семейство Fc $\gamma$ R состоит из трех активирующих (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIVу мышей; Fc $\gamma$ RIA, Fc $\gamma$ RIIA и Fc $\gamma$ RIIA у человека) и одного ингибирующего (Fc $\gamma$ RIIB) рецептора. Большинство типов врожденных эффекторных клеток коэкспрессируют один или несколько активирующих Fc $\gamma$ R и ингибирующий Fc $\gamma$ RIIB, тогда как клетки натуральных киллеров (NK) избирательно экспрессируют один активирующий рецептор Fc (Fc $\gamma$ RIII у мышей и Fc $\gamma$ RIIA у людей), но не ингибирующий Fc $\gamma$ RIIB у мышей и людей. Человеческий IgG1 связывается с большинством человеческих Fc-рецепторов и считается эквивалентным мышшиному IgG2a в отношении типов активирующих Fc-рецепторов, с которыми он связывается.

"Fc-область" (фрагмент кристаллизующейся области) или "домен Fc" или "Fc" относится к C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая в себя связывание с рецепторами Fc, расположенными на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках) или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-область содержит константный участок антитела, включая первый домен константного участка иммуноглобулина (например, CH1 или CL). В изотипах антител IgG, IgA и IgD Fc-область содержит два идентичных фрагмента белка, полученных из второго (C $\mu$ ) и третьего (C $\mu$ 3) константных доменов двух тяжелых цепей антитела; участки Fc в IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (домены C $\mu$ 2-4) в каждой полипептидной цепи. Для IgG Fc-область включает домены иммуноглобулина C $\mu$ 2 и C $\mu$ 3 и шарнир между C $\mu$ 1 и C $\mu$ 2. Хотя границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи IgG человека, как правило, определяется как промежуток от аминокислотного остатка в положении C226 или P230 (или аминокислоты между этими двумя аминокислотами) до карбокси-конца тяжелой цепи, причем нумерация соответствует индексу ЕС, как в Kabat. Домен C $\mu$ 2 Fc-области человеческого IgG простирается от приблизительно аминокислоты 231 до приблизительно аминокислоты 340, тогда как домен C $\mu$ 3 расположен на C-концевой стороне домена C $\mu$ 2 в Fc-области, т.е. он простирается от приблизительно аминокислоты 341 до приблизительно аминокислоты 447 молекулы IgG. При использовании в настоящем документе Fc-область может представлять собой нативную последовательность Fc, включая любой аллотипический вариант, или вариант Fc (например, не встречающуюся в природе Fc). Fc также может относиться к данной области в выделении или в контексте Fc-содержащего белкового полипептида, такого как "связывающий белок, содержащий Fc-область", также называемого "Fc-слитым белком" (например, антитело или иммуноадгезин).

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к сайту на антигене, с которым специфично связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот (как правило, линейного эпитопа), так и из несмежных аминокислот, приводимых в соприкосновение посредством третичной укладки белка (как правило, конформационного эпитопа). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, но не всегда, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные путем третичной укладки, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает в себя по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какие эпитопы связаны данным антителом (т.е. картирование эпитопов), хорошо известны в настоящей области техники и включают, например, анализы иммуноблоттинга и иммунопреципитации, в которых перекрывающиеся или смежные пептиды исследуют на реактивность с данным антителом. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают способы в настоящей области техники и способы, описанные в настоящем изобретении, например рентгеновскую кристаллографию, 2-мерный ядерный магнитный резонанс и HDX-MS (см., например, Epitope Mapping Protocols в *Methods in Molecular Biology*, vol. 66, G. E. Morris, ed. (1996).

Термин "картирование эпитопов" относится к процессу идентификации молекулярных детерминант для распознавания антител-антигенов.

Термин "связывается с одним и тем же эпитопом" применительно к двум или более антителам оз-

начает, что антитела связываются с одним и тем же сегментом аминокислотных остатков, как определено данным способом. Техники определения того, связываются ли антитела с "тем же эпитопом на  $\alpha$ -синуклеине", с антителами, описанными в настоящем документе, включают, например, способы картирования эпитопов, такие как рентгеноструктурный анализ кристаллов комплексов антиген:антитело, который обеспечивает атомное разрешение эпитопа, и масс-спектрометрию с обменом водорода/дейтерия (and hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS)). Другие способы контролируют связывание антитела с фрагментами антигена или мутированными вариациями антигена, где потеря связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в антигенной последовательности часто считается показателем эпитопного компонента. Кроме того, для картирования эпитопов можно также использовать вычислительные комбинаторные способы. Данные способы основаны на способности представляющего интерес антитела к аффинному выделению специфических коротких пептидов из комбинаторных пептидных библиотек фагового дисплея. Ожидается, что антитела, содержащие одинаковые или близкородственные  $V_H$  и  $V_L$  или те же последовательности CDR1, 2 и 3, будут связываться с одним и тем же эпитопом.

Антитела, которые "конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью", относятся к антителам, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с мишенью. Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, т.е. ингибирует ли и в какой степени одно антитело связывание другого антитела с мишенью, может быть определено с использованием известных экспериментов по конкуренции. В определенных вариантах осуществления антитело конкурирует и ингибирует связывание другого антитела с мишенью по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Конкурентные анализы могут проводиться, как описано, например, в Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb. Protoc., 2006, DOI: 10.1101/pdb.prot4277 или в главе 11 "Using Antibodies" by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1999. Конкурирующие антитела связываются с одним и тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или с соседними эпитопами (например, о чем свидетельствует стерическое затруднение).

Другие анализы конкурентного связывания включают в себя: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahl et al., *Methods in Enzymology*, 9:242 (1983)); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см. Kirkland et al., *J. Immunol.*, 137:3614 (1986)); твердофазный анализ с прямым мечением, сэндвич-анализ твердой фазы с прямой детекцией и ферментативной меткой (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный анализ с прямой детекцией RIA с использованием метки I-125 (см. Morel et al., *Mol. Immunol.*, 25(1):7 (1988)); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (Cheung et al., *Virology*, 176:546 (1990)); и RIA с прямым мечением. (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.*, 32:77 (1990)).

Используемые в настоящем документе термины "специфичное связывание", "селективное связывание", "избирательно связывает" и "специфично связывает" относятся к связыванию антитела с эпитопом на предварительно определенном антигене. Как правило, антитело

(i) связывается с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ), составляющей приблизительно менее  $10^{-7}$  М, например приблизительно менее  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  или  $10^{-10}$  М или даже менее, когда определяется посредством, например, технологии поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance (SPR)) на приборе BIACORE 2000 с использованием заранее определенного антигена в качестве аналита и антитела в качестве лиганда, или анализа Скэтчарда связывания антитела с антиген-положительными клетками; и

(ii) связывается с предопределенным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше его аффинности в связывании с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от предопределенного антигена или близкородственного антигена.

Термин " $k_{assoc}$ " или " $k_a$ ", используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения скорости ассоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин " $k_{dis}$ " или " $k_d$ " при использовании в настоящем документе предназначен для обозначения скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин " $K_D$ ", как он использован в данном описании, предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации, которую получают из соотношения  $k_d$  и  $k_a$  (т.е.  $k_d/k_a$ ) и выражают в виде молярной концентрации (iii). Значения  $K_D$  для антител могут быть определены с использованием способов, хорошо известных в настоящей области техники. Предпочтительным способом определения  $K_D$  антитела является использование поверхностного плазмонного резонанса, предпочтительно с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore®, или проточной цитометрии и анализа Скэтчарда.

Термин " $EC_{50}$ " в контексте анализа *in vitro* или *in vivo* с использованием антитела или его антиген-связывающего фрагмента относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающей части, которая индуцирует ответ, который составляет 50% максимального ответа, т.е. находится между максимальным ответом и базовой линией.

Термин "полипептид" относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связан-

ных аминокислотных остатка без верхнего предела длины цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как, но без ограничения, гликозилирование, фосфорилирование или образование дисульфидной связи. "Белок" может содержать один или несколько полипептидов.

Термин "молекула нуклеиновой кислоты", используемый в данном описании, предназначен для включения молекул ДНК и молекул РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной и может представлять собой кДНК.

Настоящее изобретение также обеспечивает "консервативные модификации последовательности" изложенных в настоящем описании последовательностей, т.е. модификации нуклеотидной и аминокислотной последовательности, которые не отменяют связывания антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью или содержащего аминокислотную последовательность, с антигеном. Такие консервативные модификации последовательности включают консервативные замены нуклеотидов и аминокислот, а также добавления и делеции нуклеотидов и аминокислот. Консервативные аминокислотные замены включают замены, в которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, характеризующиеся сходными боковыми цепями, были определены в настоящей области техники. Данные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, предсказанный несущественный аминокислотный остаток в антителе к  $\alpha$ -синуклеину предпочтительно заменяется другим аминокислотным остатком из того же семейства боковой цепи. Способы идентификации нуклеотидных и аминокислотных консервативных замен, которые не устраняют связывание антигена, хорошо известны в настоящей области техники (см., например, Brummell et al., *Biochem.*, 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al., *Protein Eng.*, 12(10):879-884 (1999); и Burks et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94:412-417 (1997)).

Для нуклеиновых кислот термин "существенная гомология" указывает на то, что две нуклеиновые кислоты или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении идентичны с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями по меньшей мере приблизительно на 80% нуклеотидов, как правило по меньшей мере приблизительно на от 90 до 95%, и более предпочтительно по меньшей мере на приблизительно от 98 до 99,5% нуклеотидов. Альтернативно существенная гомология существует, когда сегменты гибридизуются в условиях селективной гибридизации к комплементарной цепи.

Для полипептидов термин "существенная гомология" указывает на то, что два полипептида или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении идентичны с соответствующими аминокислотными введениями или делециями по меньшей мере приблизительно на 80% аминокислот, как правило по меньшей мере на от около 90 до 95%, и более предпочтительно по меньшей мере от около 98 до 99,5% аминокислот.

Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию количества идентичных положений, разделяемых последовательностями, когда последовательности оптимально выровнены (т.е. % гомологии=количество идентичных положений/общее количество положений $\times$ 100) с оптимальным выравниванием, определяемым с учетом количества пропусков и длины каждого пропуска, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма, как описано в приведенных ниже неограничивающих примерах.

Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с помощью программы GAP в программном пакете GCG (доступен по адресу <http://www.gcg.com>) с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и штрафом за открытие пропуска 40, 50, 60, 70 или 80 и штрафом за удлинение пропуска 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также может быть определен с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафом за продление пропуска 12 и штрафом за пропуск 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.*, (48):444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в программном пакете GCG (доступен по адресу <http://www.gcg.com>) с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250 и штрафом за открытие пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафом за удлинение пропуска 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Описанные в настоящем документе последовательности нуклеиновой кислоты и белка могут дополнительно использоваться в качестве "запрашиваемой последовательности" для выполнения поиска по

открытым базам данных, например для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски могут выполняться с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. (1990), J. Mol. Biol., 215:403-10. Поиски нуклеотидов BLAST могут выполняться с помощью программы NBLAST, оценка=100, длина слова=12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных описанным в настоящем документе молекулам нуклеиновой кислоты. Поиски BLAST белка могут выполняться с помощью программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных описанным в настоящем документе белковым молекулам. Чтобы получить сопоставленные выравнивания для целей сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al. (1997), Nucleic. Acids. Res., 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "приведенную к существенной чистоте" при очистке от других клеточных компонентов или других примесей, например других клеточных нуклеиновых кислот или белков, стандартными способами, включая в себя воздействие щелочами/ДСН, центрифугирование в градиенте плотности CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в настоящей области техники. См. F. Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Нуклеиновые кислоты, например кДНК, могут быть мутированы в соответствии со стандартными способами для обеспечения последовательностей генов. Для кодирующих последовательностей данные мутации по желанию могут влиять на аминокислотную последовательность. В частности, рассматриваются последовательности ДНК, по существу гомологичные нативным V, D, J, константным, переключающим и другим подобным последовательностям, описанным в настоящем документе, или полученные из них (где "полученный" означает, что последовательность идентична другой последовательности или модифицирована из другой последовательности).

Используемый в настоящем документе термин "вектор" предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Один тип вектора представляет собой "плазмиду", которая относится к циклической двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они вводятся (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный источник репликации, и эпизомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэпизомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицироваться вместе с геномом-хозяином. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы упоминаются в настоящем документе как "рекомбинантные экспрессирующие векторы" (или просто "экспрессирующие векторы"). В общем экспрессирующие векторы практической ценности в способах рекомбинантной ДНК часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании "плазида" и "вектор" могут быть взаимозаменяемы, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако также включены другие формы экспрессирующих векторов, такие как вирусные векторы (например, репликационные дефектные ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") предназначен для обозначения клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая в природе не присутствует в клетке, и, может быть, клетки, в которую вводили рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной подвергаемой исследованию клетки, но и потомства такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях из-за мутаций или воздействий окружающей среды, такое потомство не может по сути быть идентичным исходной клетке, но все еще включено в объем используемого в настоящем документе термина "клетка-хозяин".

Используемый в настоящем документе термин "антиген" относится к любому природному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен. Антиген может представлять собой  $\alpha$ -синуклеин или его фрагмент.

Используемый в настоящем документе термин "связанный" относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может быть генетической (т.е. посредством рекомбинантного слияния). Такие связи могут быть достигнуты с использованием широкого спектра признанных в настоящей области техники способов, таких как химическое сопряжение и производство рекомбинантного белка.

Используемый в настоящем документе термин "введение" относится к физическому введению композиции, содержащей терапевтическое средство, субъекту с использованием любого из различных спо-

собов и систем доставки, известных специалистам в настоящей области техники. Предпочтительные пути введения для описанных в настоящем документе антител включают в себя внутривенный, внутривнутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другой парентеральный путь введения, например, путем инъекции или инфузии. Фраза "парентеральное введение", используемая в данном описании, означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции, и включает в себя без ограничения внутривенную, внутривнутрибрюшинную, внутримышечную, внутривнутриартериальную, интратекальную, внутривнутрилимфатическую, внутривнутричерепную, внутривнутрикапсулярную, внутривнутриглазничную, внутривнутрисердечную, интравнутридермальную, интравнутристрахеальную, подкожную, внутривнутрикожную, внутривнутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интравнутриспинальную, эпидуральную и интравнутристернальную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Альтернативно антитело, описанное в настоящем документе, может быть введено с помощью непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или слизистый путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также может выполняться, например, однократно, многократно и/или в течение одного или нескольких длительных периодов.

Используемые в настоящем документе термины "лечить", и "лечение", и "обработка" относятся к любому типу вмешательства или процессу, выполняемому на субъекте, или введению ему активного средства с целью обращения вспять, облегчения, ослабления, ингибирования или замедления или предотвращения прогрессирования, развития, тяжести или повторения симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием. Лечение может быть у субъекта, имеющего заболевание, или у субъекта, у которого нет заболевания (например, для профилактики).

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения желаемого эффекта. "Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная дозировка" лекарственного средства или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании отдельно или в сочетании с другим терапевтическим средством способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует уменьшение выраженности симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания, или предотвращение недееспособности или инвалидности из-за заболевания. Терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства включает в себя "профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективную дозировку", которое представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при введении отдельно или в сочетании с другим терапевтическим средством субъекту, подверженному риску развития заболевания или страдающему от рецидива заболевания, ингибирует развитие или рецидив заболевания. Способность терапевтического или профилактического средства стимулировать регрессию заболевания или ингибировать развитие или рецидив заболевания может быть оценена с использованием различных способов, известных квалифицированному практику, например, у субъектов-людей во время клинических испытаний, в системах животных моделей, предсказывающих эффективность у людей, или путем анализа активности средства в анализах *in vitro*.

Используемый в настоящем документе термин "субъект" включает в себя любого человека или отличное от человека животное. Например, описанные в настоящем изобретении способы и композиции могут использоваться для лечения субъекта, страдающего заболеванием, характеризующимся наличием телец Леви или агрегированного  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге.

Термин "пациент" включает людей и других млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

Индивидуум имеет повышенный риск развития заболевания, если субъект имеет по меньшей мере один известный фактор риска (например, генетический, биохимический, семейный анамнез, воздействие ситуационных факторов), подвергающий индивидуумов с данным фактором риска статистически значимому большему риску развития заболевания по сравнению с индивидуумами без фактора риска.

Термин "симптом" относится к субъективному проявлению заболевания, такому как измененная походка, выявленному пациентом. "Признак" относится к объективному проявлению заболевания, наблюдаемому терапевтом.

Статистическая значимость означает  $p \leq 0,05$ .

Термин "образец" относится к ткани, жидкости организма или клетке (или фракции любого из вышеперечисленного), взятой у пациента или субъекта. Обычно ткань или клетку берут у пациента, но диагноз *in vivo* также рассматривается.

Используемый в настоящем документе термин "около" означает плюс или минус 10% от указанного значения.

Используемый в настоящем документе термин "и/или" включает в себя любые и все сочетания одного или нескольких связанных перечисленных элементов.

При использовании в описании изобретения и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа предназначены также для включения форм множественного числа, если контекст явно не указывает на иное.

Различные аспекты раскрытия описаны более подробно в следующих подразделах.

#### I. Антитела к $\alpha$ -синуклеину ( $\alpha$ Syn).

В настоящем изобретении описаны антитела, например выделенные антитела, например полностью человеческие выделенные антитела, которые характеризуются определенными функциональными признаками или свойствами. Например, антитела специфически связываются с человеческим  $\alpha$ -синуклеином, т.е. как с мономерным человеческим  $\alpha$ -синуклеином, так и с олигомерным человеческим  $\alpha$ -синуклеином. Кроме того, антитела могут перекрестно реагировать с  $\alpha$ -синуклеином из одного или нескольких видов, отличных от человека, таким как  $\alpha$ -синуклеин мыши или крысы, или с различными изоформами синуклеина, такими как  $\beta$ -синуклеин и  $\gamma$ -синуклеин.

Соответственно описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину проявляют одно или несколько из следующих функциональных свойств:

- (a) связывается с мышинным и крысиным  $\alpha$ -синуклеином;
- (b) связывается с человеческим  $\beta$ -синуклеином и человеческим  $\gamma$ -синуклеином;
- (c) обладает большей аффинностью к  $\alpha$ -синуклеиновым олигомерам по сравнению с  $\alpha$ -синуклеиновыми мономерами;
- (d) ингибирует образование индуцированных  $\alpha$ -синуклеиновым олигомером нерастворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина);
- (e) приводит к исчерпанию разновидности молекул, которая продуцирует растворимые или нерастворимые агрегаты  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегаты фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина) из PFF и/или лизата головного мозга, полученного от пациентов с патологическими агрегатами  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге;
- (f) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 123-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1);
- (g) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 125-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1);
- (h) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-139 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1);
- (i) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 119-126 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1); а также
- (j) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-138 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер представляет собой PFF. В некоторых вариантах осуществления PFF получают с использованием способа, описанного в примере 3. В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер является растворимым. В других вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер является нерастворимым. В некоторых вариантах осуществления антитела ингибируют образование нерастворимых или растворимых агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина. В других вариантах осуществления антитела ингибируют образование нерастворимых или растворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина, которые не содержат фосфорилированный по серину-129  $\alpha$ -синуклеин.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину предпочтительно связываются с  $\alpha$ -синуклеиновыми олигомерами (например, PFF) по сравнению с  $\alpha$ -синуклеиновыми мономерами, что может быть представлено как соотношение аффинности связывания для  $\alpha$ -синуклеиновых мономеров и аффинности связывания для  $\alpha$ -синуклеиновых олигомеров (например, PFF), также упоминаемое в настоящем документе как коэффициент связывания  $\alpha$ -синуклеиновый мономер/ $\alpha$ -синуклеиновый олигомер. Когда PFF представляет собой  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер, данный коэффициент называют коэффициентом связывания  $\alpha$ -синуклеиновый мономер/PFF или "коэффициентом МУР" и он может быть определен, как описано в примере 3.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину имеют коэффициент МУР, равный 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 150 или более, 200 или более, 250 или более, 300 или более, 350 или более, 400 или более, 450 или более, 500 или более, 700 или более, 700 или более, 800 или более, 1000 или более, 1000 или более, 1500 или более, 2000 или более, 2500 или более, 3000 или более, 3500 или более, 4000 или более, 5000 или более, 6000 или более, 7000 или более, 8000 или более, 9000 или более, 10000 или более, от 10 до 10000, от 50 до 10000, от 100 до 10000, от 500 до 10000, от 700 до 10000, от 1500 до 10000, от 3000 до 10000, от 5000 до 10000, от 7000 до 10000, от 100 до 7000, от 500 до 7000, от 700 до 7000, от 1500 до 7000, от 3000 до 7000, от 5000 до 7000, от 100 до 5000, от 500 до 5000, от 700 до 5000, от 700 до 1500, от 700 до 3000, от 700 до 5000, от 100 до 3000, от 500 до 3000, от 700 до 3000, от 1500 до 3000, от 100 до 1500, от 500 до 1500, от 700 до 1500, от 100 до 700, от 500 до 700 или от 100 до 500. В некоторых вариантах осуществления аффинности связывания антител для мономерного и олигомерного  $\alpha$ -синуклеина определяют с использованием анализа ELISA, например, как описано в примере 3,

для расчета коэффициента М/Р.

В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются с  $\alpha$ -синуклеиновым мономером с  $EC_{50}$ , составляющей 100 нМ или более, и связываются с PFF с  $EC_{50}$ , составляющей 2 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются с  $\alpha$ -синуклеиновым мономером с  $EC_{50}$ , составляющей 500 нМ или более, и связываются с PFF с  $EC_{50}$ , составляющей 1 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются с  $\alpha$ -синуклеиновым мономером с  $EC_{50}$ , составляющей 500 нМ или более, и связываются с PFF с  $EC_{50}$ , составляющей 0,5 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются с  $\alpha$ -синуклеиновым мономером с  $EC_{50}$ , составляющей 500 нМ или более, и связываются с PFF с  $EC_{50}$ , составляющей 0,3 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются с  $\alpha$ -синуклеиновым мономером с  $EC_{50}$ , составляющей 500 нМ или более, и связываются с PFF с  $EC_{50}$ , составляющей 0,2 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются с мономерной  $\alpha$ -синуклеина с  $EC_{50}$ , составляющей 700 нМ или более, и связывается с PFF с  $EC_{50}$ , составляющей 1 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются с  $\alpha$ -синуклеиновым мономером с  $EC_{50}$ , составляющей 700 нМ или более, и связываются с PFF с  $EC_{50}$ , составляющей 0,5 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются с  $\alpha$ -синуклеиновым мономером с  $EC_{50}$ , составляющей 700 нМ или более, и связываются с PFF с  $EC_{50}$ , составляющей 0,3 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются с  $\alpha$ -синуклеиновым мономером с  $EC_{50}$ , составляющей 700 нМ или более, и связываются с PFF с  $EC_{50}$ , составляющей 0,2 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления значения  $EC_{50}$  для олигомерного и мономерного  $\alpha$ -синуклеина определяют, используя ELISA, например, как описано в примере 3.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются с олигомерным  $\alpha$ -синуклеином, например, PFF (например, PFF полученными, как описано в примере 3), с  $EC_{50}$ , составляющей 50 нМ или менее, 40 нМ или менее, 30 нМ или менее, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 5 нМ или менее, 4 нМ или менее, 3 нМ или менее, 2 нМ или менее, 1 нМ или менее, 0,9 нМ или менее, 0,8 нМ или менее, 0,7 нМ или менее, 0,6 нМ или менее, 0,5 нМ или менее, 0,4 нМ или менее, 0,3 нМ или менее, 0,2 нМ или менее, 0,1 нМ или менее, 0,07 нМ или менее, 0,05 нМ или менее, 0,03 нМ или менее, или 0,01 нМ или менее, как определено способом ELISA, например, как описано в примере 3.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут ингибировать генерирование PFF-индуцированных нерастворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина). Соответственно в некоторых вариантах осуществления антитела ингибируют PFF-индуцированное фосфорилирование  $\alpha$ -синуклеина по серину-129 с  $IC_{50}$ , составляющей 0,2 нМ или менее, 0,15 нМ или менее, 0,1 нМ или менее, 0,09 нМ или менее, 0,08 нМ или менее, 0,07 нМ или менее, 0,06 нМ или менее, 0,05 нМ или менее, 0,04 нМ или менее, 0,03 нМ или менее, 0,02 нМ или менее, 0,01 нМ или менее или 0,005 нМ или менее, согласно оценке, например, с использованием высокоинформативного анализа иммунофлюоресценции, описанного в примере 10.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут истощать индуцирующую фосфорилирование  $\alpha$ -синуклеина по серину-129 активность PFF и/или лизата головного мозга, полученного от пациентов с тельцами Леви или агрегацией  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут связываться с эпитопом в С-концевой области  $\alpha$ -синуклеина. Например, антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут связываться со всеми или с частью аминокислот 123-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1), как определено, например, посредством связывания антител с перекрывающимися пептидами человеческого  $\alpha$ -синуклеина (см. пример 2). В другом варианте осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут связываться со всеми или с частью аминокислот 125-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1), как определено, например, посредством связывания антител с перекрывающимися пептидами человеческого  $\alpha$ -синуклеина (см. пример 2). В другом варианте осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут связываться со всеми или с частью аминокислот 130-139 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1), как определено, например, посредством связывания антител с перекрывающимися пептидами человеческого  $\alpha$ -синуклеина (см. пример 2). В другом варианте осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут связываться со всеми или с частью аминокислот 119-126 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1), как определено, например, посредством связывания антител с перекрывающимися пептидами человеческого  $\alpha$ -синуклеина (см. пример 2). В другом варианте осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут связываться со всеми или с частью аминокислот 130-138 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1), как определено, например, посредством связывания антител с перекрывающимися пептидами человеческого  $\alpha$ -синуклеина (см. пример 2).

Следует понимать, что антитело, которое проявляет одно или несколько функциональных свойств,

описанных выше (например, биохимическая, иммунохимическая, клеточная, физиологическая или другая биологическая активность или тому подобное), как определено в соответствии с методологиями, известными в настоящей области техники и описанными в настоящем документе, проявляет статистически значимое различие в конкретной активности относительно активности, наблюдаемой в отсутствие данного антитела (например, или когда присутствует контрольное антитело несоответствующей специфичности). Предпочтительно вызванное антителом к  $\alpha$ -синуклеину увеличение измеряемого параметра представляет собой увеличение по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 100% (т.е. в 2 раза), в 3 раза, 5 или 10 раз. И наоборот, вызванное антителом к  $\alpha$ -синуклеину уменьшение измеренного параметра представляет собой уменьшение по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 или 100%.

Стандартные анализы для оценки способности антител связываться с  $\alpha$ -синуклеином (например, мономерным  $\alpha$ -синуклеином и олигомерным  $\alpha$ -синуклеином) известны в настоящей области техники, включая, например, анализы ELISA, Вестерн-блоттинги и RIA. Подходящие анализы подробно описаны в примерах. Кинетика связывания (например, аффинность связывания) антител также может быть оценена с помощью стандартных анализов, известных в настоящей области техники, таких как анализ Biacore. Анализы для оценки влияния антител на функциональные свойства  $\alpha$ -синуклеина описаны более подробно ниже и в примерах.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину не являются нативными антителами или являются антителами, не встречающимися в природе.

## II. Иллюстративные антитела к $\alpha$ -синуклеину ( $\alpha$ Syn).

Конкретными антителами, описанными в настоящем документе, являются антитела, например моноклональные антитела, имеющие последовательности CDR и/или переменных участков антител 7A10, 7A10-T93A, 11H11 (11H11-1 и 11H11-2), 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8 (23H8-1, 23H8-2, 23H8-3) и 1E8, выделенные и структурно охарактеризованные, как описано в примере 1, а также антитела, имеющие по меньшей мере 80% идентичности (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере 99% идентичности) с последовательностями их переменных участков или CDR. Аминокислотные последовательности  $V_H$  антител 7A10, 7A10-T93A, 11H11 (11H11-1 и 11H11-2), 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8 и 1E8 представлены в SEQ ID NO: 8, 18, 31, 43, 53, 63, 73, 83, 99 и 113 соответственно. Аминокислотные последовательности  $V_L$  антител 7A10, 7A10-T93A, 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и 1E8 представлены в SEQ ID NO: 9, 19, 32, 33, 44, 54, 64, 74, 84, 100, 101, 102 и 114 соответственно.

Соответственно настоящее изобретение обеспечивает выделенные антитела или их антигенсвязывающую часть, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, причем переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 18, 31, 43, 53, 63, 73, 83, 99 и 113.

Настоящее изобретение также обеспечивает выделенные антитела или их антигенсвязывающие части, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, причем переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 19, 32, 33, 44, 54, 64, 74, 84, 100, 101, 102 и 114.

Настоящее изобретение также обеспечивает изолированные антитела или их антигенсвязывающую часть, содержащие

- (a) последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 8 и 9 соответственно;
- (b) последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно;
- (c) последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 31 и 32 соответственно;
- (d) последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 31 и 33 соответственно;
- (e) последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 43 и 44 соответственно;
- (f) последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 53 и 54 соответственно;
- (g) последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 63 и 64 соответственно;
- (h) последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 73 и 74 соответственно;
- (i) последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 83 и 84 соответственно;
- (j) последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 99 и 100 соответственно;

(к) последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 99 и 101 соответственно;

(л) последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 99 и 102 соответственно; и

(м) последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 113 и 114 соответственно.

Антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут включать CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой и легкой цепей из 7A10 (и 7A10-T93A, которое имеет такие же последовательности VHCDR1-3 и VLCDR1-3, что и 7A10), 11H11 (11H11-1 и 11H11-2 имеют общий  $V_H$ , но имеют разные  $V_L$ ), 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8 (23H8-1, 23H8-2, 23H8-3, которые имеют общий  $V_H$ , но имеют разные  $V_L$ ) и 1E8 или их сочетания. Аминокислотные последовательности  $V_H$  CDR1 из 7A10 (и 7A10-T93A), 11H11, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8 и 1E8 представлены в SEQ ID NO: 2, 22, 37, 47, 57, 67, 77, 87 и 107 соответственно. Аминокислотные последовательности  $V_H$  CDR2 из 7A10 (и 7A10-T93A), 11H11, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8 и 1E8 представлены в SEQ ID NO: 3, 23, 38, 48, 58, 68, 78, 88 и 108 соответственно. Аминокислотные последовательности  $V_H$  CDR3 из 7A10 (и 7A10-T93A), 11H11, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8 и 1E8 представлены в SEQ ID NO: 4, 24, 39, 49, 59, 69, 79, 89 и 109. Аминокислотные последовательности  $V_L$  CDR1 из 7A10 (и 7A10-T93A), 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и 1E8 представлены в SEQ ID NO: 5, 25, 28, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 93, 96 и 110 соответственно. Аминокислотные последовательности  $V_L$  CDR2 из 7A10 (и 7A10-T93A), 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и 1E8 представлены в SEQ ID NO: 6, 26, 29, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 94, 97 и 111, соответственно. Аминокислотные последовательности  $V_L$  CDR3 из 7A10 (и 7A10-T93A), 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и 1E8 представлены в SEQ ID NO: 7, 27, 30, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 95, 98 и 112 соответственно. CDR-участки очерчены с использованием системы Kabat (Kabat, E.A. et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication, № 91-3242).

Учитывая, что каждое из данных антител связывается с  $\alpha$ -синуклеином и что антигенсвязывающая специфичность обеспечивается в основном участками CDR1, 2 и 3, последовательности  $V_H$  CDR1, 2 и 3 и последовательности  $V_L$  CDR1, 2 и 3 могут быть "смешаны и совмещены (соответствующим образом подобраны друг к другу)" (т.е. CDR от различных антител можно смешивать и совмещать, хотя каждое антитело должно содержать  $V_H$  CDR1, 2 и 3 и  $V_L$  CDR1, 2 и 3) для создания других связывающих  $\alpha$ -синуклеин молекул, описанных в настоящем документе. Связывание  $\alpha$ -синуклеина с такими "смешанными и совмещенными" антителами может быть проверено с использованием анализов связывания, описанных выше и в примерах (например, анализы ELISA). Предпочтительно, когда последовательности  $V_H$  CDR смешивают и совмещают, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности  $V_H$  заменяют структурно сходной последовательностью (последовательностями) CDR. Аналогично, когда последовательности  $V_L$  CDR смешивают и совмещают, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности  $V_L$  предпочтительно заменяют структурно сходной последовательностью (последовательностями) CDR. Специалисту в настоящей области техники будет очевидно, что новые последовательности  $V_H$  и  $V_L$  могут быть созданы путем замены одной или нескольких последовательностей участков CDR  $V_H$  и/или  $V_L$  структурно сходными последовательностями из последовательностей CDR, описанных в настоящем документе, для моноклональных антител 7A10 (и 7A10-T93A), 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и 1E8.

Соответственно в настоящем изобретении обеспечены выделенные антитела или их антигенсвязывающая часть, содержащие

(a) CDR1 переменного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 37, 47, 57, 67, 77, 87 и 107;

(b) CDR2 переменного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 23, 38, 48, 58, 68, 78, 88 и 108;

(c) CDR3 переменного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 39, 49, 59, 69, 79, 89 и 109;

(d) CDR1 переменного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25, 28, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 93, 96 и 110;

(e) CDR2 переменного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 29, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 94, 97 и 111; и

(f) CDR3 переменного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 27, 30, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 95, 98 и 112;

причем антитело специфично связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином.

В одном варианте осуществления антитело содержит переменные участки тяжелой и легкой цепей, причем области CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи содержат

(a) SEQ ID NO: 2-4;

(b) SEQ ID NO: 22-24;

- (c) SEQ ID NO: 37-39;
- (d) SEQ ID NO: 47-49;
- (e) SEQ ID NO: 57-59;
- (f) SEQ ID NO: 67-69;
- (g) SEQ ID NO: 77-79;
- (h) SEQ ID NO: 87-89; или же
- (i) SEQ ID NO: 107-109,

причем антитело специфично связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином.

В другом варианте осуществления антитело содержит переменные участки тяжелой и легкой цепей, причем области CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи содержат

- (a) SEQ ID NO: 5-7;
- (b) SEQ ID NO: 25-27;
- (c) SEQ ID NO: 28-30;
- (d) SEQ ID NO: 40-42;
- (e) SEQ ID NO: 50-52;
- (f) SEQ ID NO: 60-62;
- (g) SEQ ID NO: 70-72;
- (h) SEQ ID NO: 80-82;
- (i) SEQ ID NO: 90-92;
- (j) SEQ ID NO: 93-92
- (k) SEQ ID NO: 96-98; или же
- (l) SEQ ID NO: 110-112,

причем антитело специфично связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином.

В конкретном варианте осуществления антитело содержит переменные участки тяжелой и легкой цепей, где

(a) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 2-4 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи включает SEQ ID NO: 5-7 соответственно;

(b) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 22-24 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи включает SEQ ID NO: 25-27 соответственно;

(c) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 22-24 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи включает SEQ ID NO: 28-30 соответственно;

(d) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 37-39 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи включает SEQ ID NO: 40-42 соответственно;

(e) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 47-49 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи включает SEQ ID NO: 50-52 соответственно;

(f) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 57-59 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи включает SEQ ID NO: 60-62 соответственно;

(g) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 67-69 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи включает SEQ ID NO: 70-72 соответственно;

(h) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 77-79 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи включает SEQ ID NO: 80-82 соответственно;

(i) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 87-89 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи включает SEQ ID NO: 90-92 соответственно;

(j) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 87-89 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи включает SEQ ID NO: 93-95 соответственно;

(k) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 87-89 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи включает SEQ ID NO: 96-98 соответственно; или же

(l) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 107-109 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи включает SEQ ID NO: 110-112 соответственно, причем антитело специфично связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином.

Домен  $V_H$  или один или несколько его CDR, описанных в настоящем документе, могут быть связаны с константным доменом для образования тяжелой цепи, например полноразмерной тяжелой цепи. Аналогично домен  $V_L$  или один или несколько его CDR, описанных в настоящем документе, могут быть связаны с константным доменом для образования легкой цепи, например, полноразмерной легкой цепи. Полноразмерную тяжелую цепь (за исключением С-концевого лизина (К) или за исключением С-концевого глицина и лизина (GК), которые могут отсутствовать) и полноразмерную легкую цепь объединяют, чтобы образовать полноразмерное антитела.

Описанный в настоящем документе домен  $V_H$  может быть слит с константным доменом человеческого IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, которые либо встречаются в природе, либо модифицированы, например, как дополнительно описано в настоящем документе. Например, домен  $V_H$  может содержать аминокислотную последовательность любого домена  $V_H$ , описанного в настоящем документе, слитую со следующей аминокислотной последовательностью человеческого IgG1:

ASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV

LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTCPPCPAPE

LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE

EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP

SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD

KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKLSLSL SPG (SEQ ID NO: 117)

Константный домен человеческого IgG1 также может быть доменом аллотипического варианта. Например, аллотипический вариант IgG1 содержит R107K, E189D и M191L (подчеркнуто выше). В пределах полноразмерного тяжелого участка данные аминокислотные замены пронумерованы как R214K, E356D и M358L.

Описанный в настоящем документе домен  $V_L$  может быть слит с константным доменом легкой цепи каппа или лямбда человека. Например, домен  $V_L$  может содержать аминокислотную последовательность любого домена  $V_L$ , описанного в настоящем документе, слитого со следующей аминокислотной последовательностью легкой цепи каппа IgG1 человека:

RTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ

ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEQ (SEQ ID NO: 120)

В определенных вариантах осуществления константный участок тяжелой цепи содержит лизин или другую аминокислоту на С-конце. В определенных вариантах осуществления в константном участке тяжелой цепи отсутствует одна или несколько аминокислот на С-конце и он имеет, например, С-концевую последовательность LSPG (SEQ ID NO: 127) или LSP.

Аминокислотные последовательности типичных тяжелых и легких цепей антител к  $\alpha$ -синуклеину, описанных в настоящем документе, приведены в табл. 22.

В некоторых вариантах осуществления антитело к  $\alpha$ -синуклеину содержит тяжелую и легкую цепи, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, 20, 34, 45, 55, 65, 75, 85, 103 и 115.

В некоторых вариантах осуществления антитело к  $\alpha$ -синуклеину содержит тяжелую и легкую цепи, причем легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, 21, 35, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 104, 105, 106 и 116.

В некоторых вариантах осуществления антитело к  $\alpha$ -синуклеину содержит тяжелую и легкую цепи, причем тяжелая и легкая цепи содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из

- (a) 10 и 11;
- (b) 20 и 21;
- (c) 34 и 35;
- (d) 34 и 36;
- (e) 45 и 46;
- (f) 55 и 56;
- (g) 65 и 66;
- (h) 75 и 76;
- (i) 85 и 86;
- (j) 103 и 104;
- (k) 103 и 105;
- (l) 103 и 106; и
- (m) 115 и 116.

Тяжелые и легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80, 75 или 70% идентична любой из тяжелых или легких цепей, представленных в табл. 22 (или их переменные участки), например SEQ ID NO: 10, 11, 20, 21, 34, 35, 36, 45, 46, 55, 56, 65, 66, 75, 76, 85, 86, 103, 104, 105, 106, 115 и 116, могут быть использованы для образования антител к  $\alpha$ -синуклеину человека, обладающих желаемыми характеристиками, например тех, которые дополнительно описаны в настоящем документе. Типичными вариантами являются варианты, содержащие аллотипическую вариацию, например, в константном домене и/или мутацию в переменном или константном участках, такую как мутации, раскрытые в настоящем документе. Тяжелые и легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность, которая отличается максимально от 1 до 30, от 1 до 25, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2 или 1 аминокислотами (путем замены, добавления или делеции) из любой из тяжелых или легких цепей, упомянутых в табл. 22 (или их переменных участков), могут быть использованы для образования антител к  $\alpha$ -синуклеину, обладающих желаемыми характеристиками, например, тех, которые дополнительно описаны в настоящем документе.

В различных вариантах осуществления описанные выше антитела проявляют одно или несколько из следующих функциональных свойств:

- (a) связывается с мышинным и крысиным  $\alpha$ -синуклеином;
- (b) связывается с  $\beta$ -синуклеином и  $\gamma$ -синуклеином;
- (c) обладает большей аффинностью к  $\alpha$ -синуклеиновым олигомерам (например, PFF) по сравнению с  $\alpha$ -синуклеиновыми мономерами;
- (d) ингибирует образование индуцированных  $\alpha$ -синуклеиновым олигомером (например, PFF) нерастворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина);
- (e) истощает молекулярную частицу, которая продуцирует растворимые или нерастворимые агрегаты  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегаты фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина) из PFF и/или лизата головного мозга, полученного от пациентов с патологическими агрегатами  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге;
- (f) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 123-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1);
- (g) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 125-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1);
- (h) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-139 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1);
- (i) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 119-126 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1); и
- (j) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-138 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер представляет собой PFF. В некоторых вариантах осуществления PFF получают с использованием способа, описанного в примере 3. В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер является растворимым. В других вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер является нерастворимым.

Такие антитела включают, например, человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела.

В одном варианте осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются со всей или с частью следующей последовательности человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1):

EAYEMP (SEQ ID NO: 121),

которая соответствует аминокислотным остаткам 123-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются со всей или с частью следующей последовательности человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1):

YEMP (SEQ ID NO: 122),

которая соответствует аминокислотным остаткам 125-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются со всей или с частью следующей последовательности человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1):

EEGYQDYEP (SEQ ID NO: 124),

которая соответствует аминокислотным остаткам 130-139 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются со всей или с частью следующей последовательности человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1):

DPDNEAYE (SEQ ID NO: 125),

которая соответствует аминокислотным остаткам 119-126 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину связываются со всей или с частью следующей последовательности человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1):

EEGYQDYEP (SEQ ID NO: 123),

которая соответствует аминокислотным остаткам 130-138 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1).

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела к  $\alpha$ -синуклеину, которые конкурируют за связывание с  $\alpha$ -синуклеином с анти- $\alpha$ -синуклеиновыми антителами, содержащими последовательности CDR или переменные участки, описанные в настоящем изобретении, например любые антитела из 7A10, 7A10-T93A, 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и 1E8. В некоторых вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину ингибируют связывание любого из 7A10, 7A10-T93A, 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и 1E8 с человеческим  $\alpha$ -синуклеином (например, мономерным  $\alpha$ -синуклеином или олигомерным  $\alpha$ -синуклеином) по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 100%. Конкурирующие антитела могут быть идентифицированы на основании их способности конкурентно ингибировать связывание с  $\alpha$ -синуклеином с использованием стандартных анализов связывания, известных в настоящей области техники (например, конкурентный анализ ELISA).

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела к  $\alpha$ -синуклеину, которые связываются с одним и тем же эпитопом на  $\alpha$ -синуклеине с анти- $\alpha$ -синуклеиновыми антителами, содержащими последовательности CDR или переменные участки, описанные в настоящем изобретении, например любые антитела из 7A10, 7A10-T93A, 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и 1E8. Способы определения того, связываются ли антитела с одним и тем же эпитопом на  $\alpha$ -синуклеине с антителами, описанными в настоящем документе, включают, например, способы картирования эпитопа, мониторинг связывания антитела с фрагментами антигена или мутированными вариантами антигена, где потеря связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в антигенной последовательности считается показателем компонента эпитопа (например, сканирующий аланином мутагенез); основанный на масс-спектрометрии (MS) футпринтинг белков и оценку способности представляющего интерес антитела к аффинному выделению специфических коротких пептидов (как в нативной трехмерной форме, так и в денатурированной форме) из комбинаторных пептидных библиотек в формате фагового дисплея.

Антитела, раскрытые в настоящем документе, включают все известные формы антител и другие каркасные белки с антителоподобными свойствами. Например, антитело может представлять собой человеческое антитело, гуманизированное антитело, биспецифичное антитело, иммуноконъюгат, химерное антитело или белковый каркас с антителоподобными свойствами, такой как фибронектин или анкириновые повторы. Антитело также может представлять собой Fab, (Fab)<sub>2</sub>, scFv, affibody®, авимер, нанотело или доменное антитело. Антитело также может иметь любой изотип, включая любой из следующих изотипов: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD и IgE. Антитела IgG являются предпочтительными. Полноразмерные антитела могут быть получены из последовательностей V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК и нуклеиновой кислоты, кодирующей желаемые последовательности константного участка, которые должны быть функционально связаны с последовательностями переменного участка.

III. Антитела, содержащие конкретные последовательности зародышевой линии.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину содержат переменный участок тяжелой цепи из конкретного гена иммуноглобулина тяжелой цепи зародышевой линии и/или переменный участок легкой цепи из конкретного гена иммуноглобулина легкой цепи зародышевой линии.

Как используется в настоящем документе, человеческое антитело содержит переменные участки тяжелой или легкой цепи, которые являются "продуктом" или "происходит от" конкретной последовательности зародышевой линии, если переменные участки антитела получены из системы, где используются гены иммуноглобулина зародышевой линии человека. Такие системы включают в себя иммунизацию трансгенной мыши, несущей гены человеческого иммуноглобулина с представляющим интерес антигеном, или скрининг библиотеки генов иммуноглобулина человека, отображаемой на фаге с представляющим интерес антигеном. Человеческое антитело, которое является "продуктом" или "происходит от" человеческой последовательности иммуноглобулина зародышевой линии, можно идентифицировать путем сравнения аминокислотной последовательности человеческого антитела с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека и отбора последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, которая представляет собой наиболее близкую по последовательности (т.е. наибольший % идентичности) к последовательности человеческого антитела. Человеческое антитело, которое является "продуктом" или "происходит от" конкретной последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, может содержать различия в аминокислотах по сравнению с последовательностью зародышевой линии, например, из-за естественных соматических мутаций или преднамеренного введения сайт-направленной мутации. Однако выбранное человеческое антитело, как правило, по меньшей мере на 90% идентично по аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии человека, и содержит

аминокислотные остатки, которые идентифицируют человеческое антитело как человеческое по сравнению с аминокислотными последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии других видов (например, последовательностями зародышевой линии мыши). В некоторых случаях человеческое антитело может быть по меньшей мере на 95% или даже по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентично по аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Как правило, человеческое антитело, происходящее от конкретной последовательности зародышевой линии человека, будет отображать не более 10 аминокислотных различий от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина человеческой линии. В некоторых случаях человеческое антитело может отображать не более 5 или даже не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотного различия от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии.

#### IV. Гомологичные антитела.

Настоящее изобретение охватывает антитела к  $\alpha$ -синуклеину, имеющие переменные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые гомологичны аминокислотным последовательностям предпочтительных антител, описанных в настоящем документе, и причем антитела сохраняют желаемые функциональные свойства антител к  $\alpha$ -синуклеину, описанных в настоящем изобретении.

Например, выделенное антитело к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающая часть могут содержать переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, где

(a) переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 18, 31, 43, 53, 63, 73, 83, 99 и 113, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 1 до 10, от 1 до 15, от 1 до 20, от 1 до 25 или от 1 до 50 аминокислотных изменений (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) относительно аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 18, 31, 43, 53, 63, 73, 83, 99 и 113;

(b) переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 19, 32, 33, 44, 54, 64, 74, 84, 100, 101, 102, и 114, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 1 до 10, от 1 до 15, от 1 до 20, от 1 до 25 или от 1 до 50 аминокислотных изменений (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) относительно аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 19, 32, 33, 44, 54, 64, 74, 84, 100, 101, 102 и 114;

(c) антитело специфично связывается с  $\alpha$ -синуклеином, и

(d) антитело проявляет одно или несколько из следующих функциональных свойств:

(1) связывается с мышинным и крысиным  $\alpha$ -синуклеином;

(2) связывается с  $\beta$ -синуклеином и  $\gamma$ -синуклеином;

(3) обладает большей аффинностью к  $\alpha$ -синуклеиновым олигомерам (например, PFF) по сравнению с  $\alpha$ -синуклеиновыми мономерами;

(4) ингибирует образование индуцированных  $\alpha$ -синуклеиновым олигомером (например, PFF) нерастворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина);

(5) приводит к истощению разновидности молекул, которая продуцирует растворимые или нерастворимые агрегаты  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегаты фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина) из PFF и/или лизата головного мозга, полученного от пациентов с патологическими агрегатами  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге;

(6) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 123-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 121);

(7) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 125-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 122);

(8) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-139 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 124);

(9) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 119-126 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 125); и

(10) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-138 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 123).

В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер представляет собой PFF. В некоторых вариантах осуществления PFF получают с использованием способа, описанного в примере 3. В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер является растворимым. В других вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер является нерастворимым.

В некоторых вариантах осуществления обеспечено выделенное моноклональное антитело или его

антигенсвязывающая часть, содержащее последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям переменных участков тяжелой и легкой цепей, которые выбраны из группы, состоящей из

- (a) SEQ ID NO: 8 и 9;
- (b) SEQ ID NO: 18 и 19;
- (c) SEQ ID NO: 31 и 32;
- (d) SEQ ID NO: 31 и 33;
- (e) SEQ ID NO: 43 и 44;
- (f) SEQ ID NO: 53 и 54;
- (g) SEQ ID NO: 63 и 64;
- (h) SEQ ID NO: 73 и 74;
- (i) SEQ ID NO: 83 и 84;
- (j) SEQ ID NO: 99 и 100;
- (k) SEQ ID NO: 99 и 101;
- (l) SEQ ID NO: 99 и 102; и
- (m) SEQ ID NO: 113 и 114,

причем антитело связывается с  $\alpha$ -синуклеином.

В одном варианте осуществления обеспечено антитело (например, выделенное моноклональное антитело), содержащее последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 8 и 9 соответственно, причем

вариабельный участок тяжелой цепи антитела содержит следующие CDR:

- i) CDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;
  - ii) CDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и
  - iii) CDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; и
- вариабельный участок легкой цепи антитела содержит следующие CDR:
- i) CDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;
  - ii) CDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и
  - iii) CDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и

причем антитело связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином (SEQ ID NO: 1).

В одном варианте осуществления обеспечено антитело (например, выделенное моноклональное антитело), содержащее последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно, причем

вариабельный участок тяжелой цепи антитела содержит следующие CDR:

- i) CDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;
  - ii) CDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и
  - iii) CDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и
- вариабельный участок легкой цепи антитела содержит следующие CDR:

- i) CDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
- ii) CDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; и
- iii) CDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и

причем антитело связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином (SEQ ID NO: 1).

В одном варианте осуществления обеспечено антитело (например, выделенное моноклональное антитело), содержащее последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 31 и 32 соответственно, причем:

вариабельный участок тяжелой цепи антитела содержит следующие CDR:

- i) CDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;
- ii) CDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и
- iii) CDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и

вариабельный участок легкой цепи антитела содержит следующие CDR:

- i) CDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;
- ii) CDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и
- iii) CDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и

причем антитело связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином (SEQ ID NO: 1).

В одном варианте осуществления обеспечено антитело (например, выделенное моноклональное антитело), содержащее последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 31 и 33 соответственно, причем

вариабельный участок тяжелой цепи антитела содержит следующие CDR:





- ii) CDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111; и
  - iii) CDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; и
- причем антитело связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающая часть могут содержать тяжелую цепь и легкую цепь, причем

(а) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 20, 34, 45, 55, 65, 75, 85, 103 и 115, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 1 до 10, от 1 до 15, от 1 до 20, от 1 до 25 или от 1 до 50 аминокислотных изменений (т.е. аминокислотный замен, добавлений или делеций) относительно аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 20, 34, 45, 55, 65, 75, 85, 103 и 115, при условии, что в определенных вариантах осуществления, если последовательность представляет собой последовательность тяжелой цепи с отсутствующей эффекторной функцией, мутации, которые приводят к утрате эффекторной функции тяжелой цепи, не модифицируются;

(b) легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 21, 35, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 104, 105, 106, и 116, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 1 до 10, от 1 до 15, от 1 до 20, от 1 до 25 или от 1 до 50 аминокислотных изменений (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) относительно аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы состоящий из SEQ ID NO: 11, 21, 35, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 104, 105, 106 и 116;

(c) антитело специфично связывается с  $\alpha$ -синуклеином, и

(d) антитело проявляет одно или несколько из следующих функциональных свойств:

(1) связывается с мышинным и крысиным  $\alpha$ -синуклеином;

(2) связывается с  $\beta$ -синуклеином и  $\gamma$ -синуклеином;

(3) обладает большей аффинностью к  $\alpha$ -синуклеиновым олигомерам (например, PFF) по сравнению с  $\alpha$ -синуклеиновыми мономерами;

(4) ингибирует образование индуцированных  $\alpha$ -синуклеиновым олигомером (например, PFF) нерастворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина);

(5) приводит к исчерпанию разновидности молекул, которая продуцируют растворимые или нерастворимые агрегаты  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегаты фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина) из PFF и/или лизата головного мозга, полученного от пациентов с патологическими агрегатами  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге;

(6) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 123-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 121);

(7) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 125-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 122);

(8) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-139 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 124);

(9) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 119-126 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 125); и

(10) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-138 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 123).

В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер представляет собой PFF. В некоторых вариантах осуществления PFF получают с использованием способа, описанного в примере 3. В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер является растворимым. В других вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер является нерастворимым.

В некоторых вариантах осуществления обеспечено выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее последовательности варьируемых участков тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям варьируемых участков тяжелой и легкой цепей, которые выбраны из группы, состоящей из

(a) SEQ ID NO: 10 и 11;

(b) SEQ ID NO: 20 и 21;

(c) SEQ ID NO: 34 и 35;

(d) SEQ ID NO: 34 и 36;

(e) SEQ ID NO: 45 и 46;

(f) SEQ ID NO: 55 и 56;

(g) SEQ ID NO: 65 и 66;

- (h) SEQ ID NO: 75 и 76;
- (i) SEQ ID NO: 85 и 86;
- (j) SEQ ID NO: 103 и 104;
- (k) SEQ ID NO: 103 и 105;
- (l) SEQ ID NO: 103 и 106; и
- (m) SEQ ID NO: 115 и 116,

причем антитело связывается с  $\alpha$ -синуклеином.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела к  $\alpha$ -синуклеину, содержащие VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 и/или VLCDR3, который отличается от соответствующего CDR из 7A10, 7A10-T93A, 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и/или 1E8 1, 2, 3, 4, 5, от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4 или от 1 до 5 аминокислотными изменениями (т.е. аминокислотными заменами, добавлениями или делециями). В определенных вариантах осуществления антитело к  $\alpha$ -синуклеину содержит от 1 до 5 аминокислотных изменений в каждой из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей CDR относительно соответствующей последовательности в 7A10, 7A10-T93A, 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и/или 1E8. В определенных вариантах осуществления антитело к  $\alpha$ -синуклеину содержит всего от 1 до 5 аминокислотных изменений во всех CDR относительно последовательностей CDR в 7A10, 7A10-T93A, 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и/или 1E8. Данные измененные антитела можно тестировать, используя анализы *in vitro* и *in vivo*, описанные в настоящем изобретении и в примерах, чтобы определить, сохраняют ли они одно или несколько функциональных свойств, перечисленных выше.

Антитела, имеющие последовательности, гомологичные последовательностям 7A10, 11H11 (11H11-1 и 11H11-2), 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8 (23H8-1, 23H8-2 и 23H8-3) и/или 1E8, например участки  $V_H$  и  $V_L$  последовательностей SEQ ID NO: 8, 18, 31, 43, 53, 63, 73, 83, 99 и 113 и SEQ ID NO: 9, 19, 32, 33, 44, 54, 64, 74, 84, 100, 101, 102 и 114 соответственно, или тяжелые и легкие цепи последовательностей SEQ ID NO: 10, 20, 34, 45, 55, 65, 75, 85, 103 и 115 и SEQ ID NO: 11, 21, 35, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 104, 105, 106 и 116 соответственно, или CDR, могут быть получены путем мутагенеза (например, сайт-направленный или ПЦР-опосредованный мутагенез) молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих аминокислотные последовательности, с последующим тестированием кодированного измененного антитела на сохраненную функцию с использованием функциональных анализов, описанных в настоящем документе.

#### V. Антитела с консервативными модификациями.

Антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут содержать вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где одна или несколько из данных последовательностей CDR содержат определенные аминокислотные последовательности на основе описанных в настоящем документе предпочтительных антител или их консервативные модификации и где антитела сохраняют желаемые функциональные свойства антител к  $\alpha$ -синуклеину, описанных в настоящем документе.

Соответственно выделенное антитело к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающая часть может содержать вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем

(а) последовательность CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 39, 49, 59, 69, 79, 89 и 109, и их консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4 или от 1 до 5 консервативных аминокислотных замен;

(б) последовательность CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 27, 30, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 95, 98 и 102, и их консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4 или от 1 до 5 консервативных аминокислотных замен;

(с) антитело специфично связывается с  $\alpha$ -синуклеином, и

(d) антитело проявляет одно или несколько из следующих функциональных свойств:

(1) связывается с мышинным и крысиным  $\alpha$ -синуклеином;

(2) связывается с  $\beta$ -синуклеином и  $\gamma$ -синуклеином;

(3) обладает большей аффинностью к  $\alpha$ -синуклеиновым олигомерам (например, PFF) по сравнению с  $\alpha$ -синуклеиновыми мономерами;

(4) ингибирует образование индуцированных  $\alpha$ -синуклеиновым олигомером (например, PFF) нерастворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина);

(5) приводит к исчерпанию разновидности молекул, которая продуцирует растворимые или нерастворимые агрегаты  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегаты фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина) из PFF и/или лизата головного мозга, полученного от пациентов с патологическими агрегатами  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге;

(6) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 123-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 121);

- (7) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 125-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 122);
- (8) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-139 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 124);
- (9) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 119-126 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 125); и
- (10) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-138 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 123).

В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер представляет собой PFF. В некоторых вариантах осуществления PFF получают с использованием способа, описанного в примере 3. В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер является растворимым. В других вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер является нерастворимым.

В предпочтительном варианте осуществления последовательность CDR2 варибельного участка тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 23, 38, 48, 58, 68, 78, 88 и 108, и их консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4 или от 1 до 5 консервативных аминокислотных замен; и последовательность CDR2 варибельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 29, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 94, 97 и 111, и их консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4 или от 1 до 5 консервативных аминокислотных замен. В другом предпочтительном варианте осуществления последовательность CDR1 варибельного участка тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 37, 47, 57, 67, 77, 87 и 107, и их консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4 или от 1 до 5 консервативных аминокислотных замен; и последовательность CDR1 варибельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25, 28, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 93, 96 и 110, и их консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4 или от 1 до 5 консервативных аминокислотных замен.

В различных вариантах осуществления антитело может демонстрировать одно или несколько из функциональных свойств, перечисленных выше. Такими антителами могут быть, например, человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела.

Консервативные аминокислотные замены также могут быть сделаны в частях антител, отличных от CDR или в дополнение к ним. Например, консервативные модификации аминокислот могут быть сделаны в каркасном участке или в Fc-области.

Варибельный участок или тяжелая или легкая цепь может включать 1, 2, 3, 4, 5, от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 1 до 10, от 1 до 15, от 1 до 20, от 1 до 25 или от 1 до 50 консервативных аминокислотных замен относительно последовательностей антител к  $\alpha$ -синуклеину, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к  $\alpha$ -синуклеину содержит комбинацию консервативной и неконсервативной модификации аминокислот.

#### VI. Сконструированные и модифицированные антитела $V_H$ и $V_L$ участки.

Настоящее изобретение также обеспечивает сконструированные и модифицированные антитела, которые могут быть получены с использованием антитела, имеющего одну или несколько последовательностей  $V_H$  и/или  $V_L$ , раскрытых в настоящем документе, в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела, причем модифицированное антитело может обладать измененными свойствами по сравнению с исходным антителом. Антитело может быть сконструировано путем модификации одного или нескольких остатков в пределах одного или обоих варибельных участков (т.е.  $V_H$  и/или  $V_L$ ), в пределах одного или нескольких участков CDR и/или в пределах один или нескольких каркасных доменов. Дополнительно или альтернативно антитело может быть сконструировано путем модификации остатков в пределах константного участка(ов), например, для изменения эффекторной функции(й) антитела.

Одним из возможных типов конструирования варибельной области является пересадка CDR. Антитела преимущественно взаимодействуют с целевыми антигенами через аминокислотные остатки, которые расположены в легкой и тяжелой цепях в шести определяющих комплементарность участках (CDR). Поэтому у различных антител аминокислотные последовательности в CDR различаются в большей степени, чем за пределами CDR. Поскольку последовательности CDR отвечают за большинство взаимодействий антитело-антиген, имеется возможность экспрессии рекомбинантных антител, которые имитируют свойства конкретных природных антител, путем конструирования векторов экспрессии, которые включают последовательности CDR из конкретного природного антитела, пересаженные на каркасные последовательности другого антитела с отличающимися свойствами (см., например, Riechmann, L. et al. (1998), *Nature*, 332:323-327; Jones, P. et al. (1986), *Nature*, 321:522-525; Queen, C. et al. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86:10029-10033; патент США № 5225539, выданный Winter, и патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen и соавторам).

Соответственно другой вариант осуществления, описанный в настоящем документе, относится к изолированному моноклональному антителу или его антигенсвязывающей части, включающему переменный участок тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, включающие аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 37, 47, 57, 67, 77, 87 и 107; SEQ ID NO: 3, 23, 38, 48, 58, 68, 78, 88 и 108; и SEQ ID NO: 4, 24, 39, 49, 59, 69, 79, 89 и 109 соответственно, и переменный участок легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, включающие аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25, 28, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 93, 96 и 110; SEQ ID NO: 6, 26, 29, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 94, 97 и 111; и SEQ ID NO: 7, 27, 30, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 95, 98 и 102 соответственно. Таким образом, такие антитела содержат последовательности CDR V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> моноклональных антител 7A10, 7A10-T93A, 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и 1E8, но могут содержать различные каркасные последовательности из данных антител.

Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованной справочной информации, которая включает последовательности генов антител зародышевых линий. Например, последовательности ДНК зародышевых линий для генов переменных областей тяжелой и легкой цепей человека могут быть найдены в базе данных "VBase" последовательностей зародышевых линий человека (доступной в Интернете по адресу [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)), а также в Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication, № 91-3242; Tomlinson, I. M. et al. (1992), "The Repertoire of Human Germline V<sub>H</sub> Sequences Reveals about Fifty Groups of V<sub>H</sub> Segments with Different Hypervariable Loops", J. Mol. Biol., 227:776-798; и Cox J.P.L. et al. (1994), "A Directory of Human Germ-line V<sub>H</sub> Segments Reveals a Strong Bias in their Usage", Eur. J. Immunol., 24:827-836; причем содержание каждого из указанных источников непосредственно включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Предпочтительными каркасными последовательностями для применения в антителах по настоящему изобретению являются те последовательности, которые структурно близки к каркасным последовательностям, имеющимся в выбранных антителах, описанными в настоящем документе. Последовательности V<sub>H</sub> CDR1, 2 и 3 и последовательности V<sub>L</sub> CDR1, 2 и 3 могут быть пересажены в каркасные области, которые имеют те же последовательности, которые были обнаружены в гене иммуноглобулина зародышевой линии, из которого образуется каркасная последовательность, или последовательности CDR могут быть пересажены в каркасные области, которые содержат одну или большее число мутаций по сравнению с последовательностями зародышевых линий. Например, было обнаружено, что в некоторых случаях выгодно подвергнуть мутации остатки в каркасных областях для сохранения или улучшения антигенсвязывающей способности антитела (см., например, патенты США № 5530101, 5586889, 5693662 и 6180370, выданные Queen и соавторам).

Сконструированные антитела по настоящему изобретению включают такие антитела, в которых были осуществлены модификации в каркасных остатках в V<sub>H</sub> и/или V<sub>L</sub>, например, для улучшения свойств антитела. Как правило, такие каркасные модификации осуществляются для уменьшения иммуногенности антитела. Например, один из подходов заключается в "обратной мутации" одного или нескольких каркасных остатков к соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое подверглось соматической мутации, может содержать в каркасной области остатки, отличающиеся от последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело. Такие остатки могут быть идентифицированы путем сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевых линий, из которых получено антитело. Для возвращения данных последовательностей каркасной области к их зародышевой конфигурации, соматические мутации могут подвергаться "обратной мутации" в последовательность зародышевой линии, например, с помощью сайт-направленного мутагенеза или ПЦР-опосредованного мутагенеза. Такие подвергшиеся "обратной мутации" антитела также включены в объем настоящего изобретения.

Другой тип каркасных модификации включает в себя мутацию одного или нескольких остатков в пределах каркасной области или даже в пределах одного или нескольких участков CDR для устранения Т-клеточных эпитопов, чтобы тем самым уменьшить потенциальную иммуногенность антитела. Данный подход также называют "деиммунизацией" и он более подробно описан в патентной публикации США № 20030153043 Carг и соавторами.

Другой тип модификации переменного участка заключается в мутации остатков аминокислот в пределах участков CDR1, CDR2 и/или CDR3 V<sub>H</sub> и/или V<sub>L</sub>, чтобы таким образом улучшить одно или несколько свойств связывания (например, аффинность) представляющего интерес антитела. Сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез может осуществляться с целью введения мутации(й), и влияние на связывание антител или другое интересующее функциональное свойство может быть оценено в анализах *in vitro* или *in vivo*, как описано в настоящем документе и обеспечено в примерах. Предпочтительно вводят консервативные модификации (как обсуждалось выше). Мутации могут представлять собой замены, добавление или делеции аминокислот, но предпочтительными являются замены. Кроме того, обычно изменяют не более чем один, два, три, четыре или пять остатков в пределах участка CDR. Соответственно настоящее изобретение также обеспечивает выделенные монокло-

нальные антитела к  $\alpha$ -синуклеину или их антигенсвязывающие части, содержащие варибельный участок тяжелой цепи, содержащий

(a) участок CDR1  $V_H$ , содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 37, 47, 57, 67, 77, 87 и 107, или аминокислотную последовательность, содержащую одну, две, три, четыре или пять замен, делеций или добавлений аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 2, 22, 37, 47, 57, 67, 77, 87 и 107;

(b) участок CDR2  $V_H$ , содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 23, 38, 48, 58, 68, 78, 88 и 108, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять замен, делеций или добавлений аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 3, 23, 38, 48, 58, 68, 78, 88 и 108;

(c) участок CDR3  $V_H$ , содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 39, 49, 59, 69, 79, 89 и 109, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять замен, делеций или добавлений аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 4, 24, 39, 49, 59, 69, 79, 89 и 109;

(d) участок CDR1  $V_L$ , содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25, 28, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 93, 96 и 110, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять замен, делеций или добавлений аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 5, 25, 28, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 93, 96 и 110;

(e) участок CDR2  $V_L$ , содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 29, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 94, 97 и 111, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять замен, делеций или добавлений аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 6, 26, 29, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 94, 97 и 111; и

(f) участок CDR3  $V_L$ , содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 27, 30, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 95, 98 и 102, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять замен, делеций или добавлений аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 7, 27, 30, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 95, 98 и 102.

Остатки метионина в CDR антител могут быть окислены, что приводит к потенциальной химической деградации и последующему снижению активности антитела. Соответственно настоящее изобретение также обеспечивает антитела к  $\alpha$ -синуклеину, которые имеют один или несколько остатков метионина в последовательностях CDR тяжелой и/или легкой цепи, замененных аминокислотными остатками, которые не подвергают окислительной деградации.

Точно так же сайты дезамидирования могут быть удалены из антител к  $\alpha$ -синуклеину особенно в последовательностях CDR.

Fc<sub>s</sub> и модифицированные Fc<sub>s</sub>.

Описанные в настоящем изобретении варибельные участки антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут быть соединены (например, ковалентно связаны или слиты) с областью Fc, например Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, которая может быть любого аллотипа или изоаллотипа, например, для IgG1: G1m, G1m1 (a), G1m2 (x), G1m3 (f), G1m17 (z); для IgG2: G2m, G2m23 (n); для IgG3: G3m, G3m21 (g1), G3m28 (g5), G3m11 (b0), G3m5 (b1), G3m13 (b3), G3m14 (b4), G3m10 (b5), G3m15 (s), G3m16 (t), G3m6 (c3), G3m24 (c5), G3m26 (u), G3m27 (v); и для K: Km, Km1, Km2, Km3 (см., например, Jefferies et al. (2009) mAbs 1:1).

В определенных вариантах осуществления антитела к  $\alpha$ -синуклеину имеют Fc-рецептор без или со сниженным связыванием FcR, например со сниженным связыванием с активирующими FcR.

В определенных вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении варибельные участки антитела к  $\alpha$ -синуклеину соединены с Fc с отсутствующей эффекторной функцией или по большей части с отсутствующей эффекторной функцией, например IgG2 или IgG4.

Как правило, варибельные участки, описанные в настоящем изобретении, могут быть связаны с Fc, включающим одну или несколько модификаций, обычно с целью изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, например периода полувыведения из сыворотки, фиксации комплекса, связывания с рецептором Fc и/или антигензависимой клеточной цитотоксичности. Кроме того, антитело в соответствии с данным изобретением может быть модифицировано химически (например, один или больше химических фрагментов могут быть присоединены к антителу) или оно может быть модифицировано таким образом, чтобы изменить его гликозилирование, изменить одно или больше функциональных свойств антитела. Каждый из данных вариантов подробнее описан ниже. Нумерация остатков в участке Fc представляет собой нумерацию индекса EU по Kabat.

Fc-область охватывает домены, полученные из константного участка иммуноглобулина, предпочтительно человеческого иммуноглобулина, включая фрагмент, аналог, вариант, мутант или производное константного участка. Подходящие иммуноглобулины включают IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и другие классы, такие как IgA, IgD, IgE и IgM. Константный участок иммуноглобулина определяется как встречающийся в природе или синтетически полученный полипептид, гомологичный C-концевой области иммуноглобулина, и может включать домен CH1, шарнир, домен CH2, домен CH3 или домен CH4 отдельно или в сочетании.

Константный участок иммуноглобулина отвечает за многие важные функции антител, включая связывание с Fc-рецептором (FcR) и фиксацию комплемента. Существует пять основных классов константных участков тяжелой цепи, классифицированных как IgA, IgG, IgD, IgE, IgM, каждый с характерными эффекторными функциями, обозначенными изотипом. Например, IgG разделен на четыре подкласса, известные как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Молекулы Ig взаимодействуют с несколькими классами клеточных рецепторов. Например, молекулы IgG взаимодействуют с тремя классами рецепторов Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R), специфичными для класса антител IgG, а именно Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII и Fc $\gamma$ RIII. Сообщалось, что важные последовательности для связывания IgG с рецепторами Fc $\gamma$ R расположены в доменах CH2 и CH3. Период полувыведения антитела из сыворотки зависит от способности данного антитела связываться с Fc-рецептором (FcR).

В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой вариант области Fc, например последовательность Fc, которая была модифицирована (например, путем замены, делеции и/или вставки аминокислоты) относительно исходной последовательности Fc (например, немодифицированного полипептида Fc, который впоследствии модифицируется для создания варианта) с целью обеспечить желательные структурные особенности и/или биологическую активность.

Например, можно вносить модификации в Fc-область для того, чтобы генерировать вариант Fc, который

- (a) имеет пониженную антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC),
- (b) имеет пониженную опосредованную комплементом цитотоксичность (CDC),
- (c) имеет пониженную аффинность к C1q, и/или
- (d) имеет пониженную аффинность к Fc-рецептору по сравнению с родительским Fc.

Такие варианты Fc-области обычно содержат по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в Fc-области. Считается, что объединение модификаций аминокислот является особенно желательным. Например, вариант Fc-области может включать в себя две, три, четыре, пять и т. д. замены, например определенных позиций в Fc-области, определенных в настоящем документе.

Вариант Fc-области может также включать изменение последовательности, при котором аминокислоты, участвующие в образовании дисульфидной связи, удаляются или заменяются другими аминокислотами. Такое удаление может избежать реакции с другими цистеинсодержащими белками, присутствующими в клетке-хозяине, которые используются для получения антител, описанных в настоящем документе. Даже когда остатки цистеина удалены, одноцепочечные Fc-домены все еще могут образовывать димерный Fc-домен, который удерживается вместе нековалентно. В других вариантах осуществления Fc-область может быть модифицирована, чтобы сделать ее более совместимой с выбранной клеткой-хозяином. Например, можно удалить последовательность PA рядом с N-концом типичной нативной области Fc, которая может распознаваться пищеварительным ферментом в *E.coli*, таким как пролин-аминопептидаза. В других вариантах осуществления могут быть удалены один или несколько сайтов гликозилирования в домене Fc. Остатки, которые обычно гликозилированы (например, аспарагин), могут вызывать цитолитический ответ. Такие остатки могут быть удалены или замещены негликозилированными остатками (например, аланином). В других вариантах осуществления сайты, вовлеченные во взаимодействие с комплементом, такие как сайт связывания C1q, могут быть удалены из области Fc. Например, можно удалить или заменить последовательность ЕКК человеческого IgG1. В определенных вариантах осуществления сайты, которые влияют на связывание с Fc-рецепторами, могут быть удалены, предпочтительно сайты, отличные от сайтов связывания с "рецептором спасения" (salvage receptor). В других вариантах осуществления Fc-область может быть модифицирована для удаления сайта ADCC. Сайты ADCC известны в настоящей области техники; см., например, *Molec. Immunol.*, 29(5):633-9 (1992) в отношении сайтов ADCC в IgG1. Конкретные примеры вариантов доменов Fc раскрыты, например, в WO 97/34631 и WO 96/32478.

В одном из вариантов осуществления шарнирную область Fc изменяют таким образом, что в данной области изменяется количество остатков цистеина, например увеличивается или уменьшается. Данный подход описан дополнительно в патенте США № 5677425 Vodmer и соавторами. Число цистеиновых остатков в Fc изменяют, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела. В одном варианте осуществления изобретения шарнирную область Fc антитела подвергают мутации для уменьшения биологического времени полужизни антитела. Более конкретно, одну или несколько мутаций аминокислот вводят в участок домена CH2-CH3 на границе фрагмента Fc-шарнир таким образом, что снижается способность антитела связываться с *Staphylococcus* (стафилококковым) протеином А (SpA) относительно связывания природного Fc-шарнирного домена с SpA. Данный подход описан более подробно Ward et al., в патенте США 6165745.

В еще других вариантах осуществления Fc-область изменяют, заменяя по меньшей мере один аминокислотный остаток другим аминокислотным остатком, чтобы изменить эффекторную(ые) функцию(и). Например, одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, можно заменить другим аминокислотным остатком таким образом, что изменится средство антитела к эффекторному лиганду, но сохранится способность связывания с антигеном роди-

тельского антитела. Эффекторный лиганд, к которому изменяется аффинность, может представлять собой, например, рецептор Fc или компонент C1 комплемента. Данный подход более подробно описан в патентах США № 5624821 и 5648260, авторы Winter et al.

В другом примере одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322 могут быть заменены другим аминокислотным остатком, так что изменяется связывание антитела с C1q и/или снижается или ликвидируется комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Данный подход более подробно описан в патенте США № 6194551, выданном Idusogie et al.

В другом примере изменяют один или больше остатков аминокислот в пределах положений аминокислот 231 и 239, чтобы таким образом изменить способность антитела к связыванию комплемента. Данный подход описан подробнее в публикации PCT WO 94/29351 Bodmer et al.

Другие модификации Fc, которые могут быть внесены в области Fc, представляют собой модификации, которые уменьшают или устраняют связывание с FcγR и/или комплементарными белками, тем самым уменьшая или уменьшая Fc-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC, ADCP и CDC. Примеры модификаций включают в себя, но не ограничиваются ими, замены, вставки и удаления в положениях 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325 и 328, причем нумерация соответствует индексу ЕС. Типичные замены включают, но не ограничиваются ими, 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L и 328R, где нумерация соответствует индексу ЕС. Вариант Fc может содержать 236R/328R. Другие модификации для уменьшения взаимодействия FcγR и комплемента включают замены 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P и 234V, и удаление гликозилирования в положении 297 посредством мутации и под действием фермента или путем продуцирования в организмах, таких как бактерии, которые не гликозилируют белки. Данные и другие модификации рассмотрены в Strohl, 2009, *Current Opinion in Biotechnology*, 20:685-691.

Fc-область необязательно может содержать не встречающийся в природе аминокислотный остаток в дополнительных и/или альтернативных положениях, известных специалисту в данной области техники (см., например, патенты США № 5624821; 6277375; 6737056; 6194551; 7317091; 8101720; патентные публикации PCT WO 00/42072; WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 и WO 06/020114).

Аффинность и связывающие свойства Fc участка с его лигандом можно определить различными известными методами анализа *in vitro* (биохимическими или иммунологическими анализами), включая, но не ограничиваясь этим, равновесные методы (например, меченый ферментом иммуносорбентный анализ (ELISA) или радиоиммуноанализ (RIA)) или кинетические методы (например, анализ BIACORE) и другие методы, такие как анализы непрямого связывания, анализы конкурентного ингибирования, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). В данных и других методах можно использовать метку на одном или нескольких изучаемых компонентах и/или использовать разные методы детектирования, включая, но не ограничиваясь этим, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинности связывания и кинетики можно найти в работе Paul, W.E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), в которой предметом исследования является взаимодействие антител с иммуногеном.

В определенных вариантах осуществления антитело модифицируют для увеличения времени его биологического периода полувыведения. Возможны разные подходы. Например, это может быть сделано путем увеличения аффинности связывания участка Fc с FcRn. Например, один или несколько из следующих остатков могут быть мутированы: 252, 254, 256, 433, 435, 436, как описано в патенте США № 6277375. Конкретные примерные замены включают одну или несколько из следующих: T252L, T254S и/или T256F. Альтернативно для увеличения времени его биологического периода полувыведения антитело может быть изменено в CH1 или CL участке для включения эпитопа, связывающего восстанавливающий рецептор, взятого из двух петель домена CH2 области Fc IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022 Presta и соавторами. Другие иллюстративные варианты, которые увеличивают связывание с FcRn и/или улучшают фармакокинетические свойства, включают замены в положениях 259, 308, 428 и 434, включая, например, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y и 434M. Другие варианты, которые увеличивают связывание Fc с FcRn, включают замены 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al., 2004, *J. Biol. Chem.*, 279 (8):6213-6216, Hinton et al., 2006, *Journal of Immunology*, 176:346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 307Q, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall'Acqua et al., *Journal of Immunology*, 2002, 169:5171-5180; Dall'Acqua et al., 2006, *Journal of Biological Chemistry*, 281:23514-23524). Другие модификации для модуляции связывания FcRn описаны в Yeung et al., 2010, *J. Immunol.*, 182:7663-7671. В определенных вариантах осуществления могут использоваться гибридные изотипы IgG с конкретными биологическими характеристиками. Например, гибридный вариант IgG1/IgG3 может быть сконструирован заменой позиций IgG1 в участке CH2

и/или СН3 аминокислотами из IgG3 в положениях, где два изотипа различаются между собой. Таким образом, может быть сконструирован гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или несколько замен, например 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R и 436F. В других вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, гибридный вариант IgG1/IgG2 может быть сконструирован путем замены позиций IgG2 в участке СН2 и/или СН3 аминокислотами из положений IgG1, где два изотипа различаются. Таким образом, может быть сконструирован гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или несколько замен, например одну или несколько из следующих аминокислотных замен: 233E, 234L, 235L, -236G (что относится к вставке глицина в положении 236) и 327A.

В определенных вариантах осуществления выбрана область Fc, которая имеет пониженное связывание с FcγR. Типичная область Fc, например, Fc IgG1 с пониженным связыванием FcγR, содержит следующие три аминокислотные замены: L234A, L235E и G237A. Данный тройной мутант Fc IgG1 обозначается в настоящем документе как "IgG1.3f".

В определенных вариантах осуществления выбрана область Fc, которая характеризуется пониженной фиксацией комплемента. Типичная область Fc, например Fc IgG1 с пониженной фиксацией комплемента, имеет следующие две аминокислотные замены: A330S и P331S.

В некоторых вариантах осуществления выбрана область Fc, которая по существу не имеет эффекторной функции, т.е. она характеризуется пониженным связыванием с FcγR и пониженной фиксацией комплемента. Типичная область Fc, например IgG1 Fc, которая не обладает эффекторной функцией, содержит следующие пять мутаций: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S.

При использовании константного домена IgG4 обычно предпочтительно включать замену S228P, которая имитирует последовательность петли в IgG1 и тем самым стабилизирует молекулы IgG4.

В еще одном варианте гликозилирование антитела модифицировано. Например, может быть получено агликозилированное антитело (т.е. антитело без гликозилирования). Гликозилирование может быть изменено с целью, например, для увеличения аффинности антитела к антигену. Такие модификации углеводов могут быть выполнены, например, путем изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, могут быть осуществлены одно или несколько аминокислотных замещений, которые приводят к устранению одного или нескольких сайтов гликозилирования каркасного участка вариабельного участка, благодаря чему устраняется гликозилирование в данном сайте. Данное агликозилирование может увеличивать аффинность антитела в отношении антигена. Такой подход более подробно описан в патентах США № 5714350 и 6350861, Со и соавторами.

Гликозилирование константного участка на N297 может быть предотвращено путем мутации остатка N297 с другим остатком, например N297A, и/или путем мутации соседней аминокислоты, например 298, чтобы тем самым уменьшить гликозилирование на N297.

В качестве дополнения или альтернативы может быть получено такое антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, как, например, гипофукозилированное антитело, имеющее уменьшенное количество фукозильных остатков, или антитело, имеющее увеличенное количество биссекторных структур GlcNac. Было показано, что такие измененные модели гликозилирования увеличивают ADCC способность антител. Данные углеводные модификации могут осуществляться, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным комплексом механизмов гликозилирования. Клетки с измененным комплексом механизмов гликозилирования описаны в технике и могут применяться в качестве клеток-хозяев, в которых осуществляется экспрессия рекомбинантных антител по настоящему изобретению, для получения тем самым антитела с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195 Hanaï и соавторами описана клеточная линия с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, так что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии выявляют гипофукозилирование. В публикации PCT WO 03/035835 Presta описывает вариант клеточной линии CHO, а именно клетки Lec 13, с пониженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, также приводящую к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине

(см. также Shields R.L. et al. (2002), J. Biol. Chem., 277:26733-26740). В публикации PCT WO 99/54342 Umana и соавторы описывают клеточные линии, созданные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), так что антитела, экспрессируемые в разработанных клеточных линиях, выявляют повышенное количество биссекторных структур GlcNac, что приводит к возросшей ADCC-активности антител (см. также Umana et al. (1999), Nat. Biotech., 17:176-180).

Другая модификация антител, описанных в настоящем документе, представляет собой пегилирование, например, для повышения биологического (например, в сыворотке) времени полужизни антитела. Для осуществления пегилирования антитела антитело или его фрагмент, как правило, вводят во взаимодействие с полиэтиленгликолем (ПЭГ), как, например, реакционно-способным сложным эфиром или альдегидным производным ПЭГ, в условиях, при которых одна или несколько групп ПЭГ присоединяются к антителу или его фрагменту. Предпочтительно пегилирование выполняют с помощью реакции

ацилирования или реакции алкилирования с реакционно-способной молекулой ПЭГ (или аналогичного реакционно-способного водорастворимого полимера). В настоящем описании термин "полиэтиленгликоль" служит для обозначения любых форм ПЭГ, которые применялись для получения производных других белков, таких как моно(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкокси или арилокси полиэтиленгликолей или полиэтиленгликольмалеимид. В определенных вариантах осуществления антители, которое предполагается пэгиллировать, представляет собой дегликозилированное антители. Способы пэгиллирования белков известны в технике, и они могут быть применены к антителям по настоящему изобретению. См., например, EP 0154316, Nishimura et al., и EP 0401384, Ishikawa et al.

#### VII. Молекулы нуклеиновых кислот.

Другой аспект, описанный в настоящем документе, имеет отношение к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют антители к  $\alpha$ -синуклеину, описанные в настоящем изобретении. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "по существу чистой", если она очищена от других клеточных компонентов или других примесей, например от других клеточных нуклеиновых кислот или белков, стандартными способами, включая обработку щелочью/ДСН, расслоение в CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие способы, хорошо известные из уровня техники. См., Ausubel et al., ed. (1987), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновая кислота по изобретению может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или не содержать интронные последовательности. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

Описанные в настоящем изобретении нуклеиновые кислоты могут быть получены с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Для антител, экспрессируемых гибридомами (например, гибридомами, полученными из трансгенной мыши, несущей гены иммуноглобулина человека, как описано далее по тексту), созданные гибридомой кДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антитела, могут быть получены стандартными методиками амплификации ПНР или клонирования к ДНК. Для антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулина (например, с применением методики фагового дисплея), нуклеиновая кислота, кодирующая антители, может быть восстановлена из библиотеки.

Предпочтительными молекулами нуклеиновых кислот, описанными в настоящем документе, являются молекулы, кодирующие последовательности моноклональных антител V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> 7A10, 7A10-T93A, 11N11-1, 11N11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23N8-1, 23N8-2, 23N8-3 и 1E8 (см., например, табл. 22).

Способ получения антител к  $\alpha$ -синуклеину может включать экспрессию тяжелой цепи и легких цепей в клеточной линии, содержащей нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи соответственно. Клетки-хозяева, содержащие данные нуклеотидные последовательности (например, или векторы, содержащие данные нуклеотидные последовательности), охватываются настоящим изобретением.

Если фрагменты ДНК, кодирующие сегменты V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, уже когда-либо были получены, данные фрагменты ДНК в дальнейшем можно обрабатывать с помощью стандартных методик работы с рекомбинантными ДНК, например, превращать гены вариабельной области в гены полноразмерной цепи антитела, гены фрагмента Fab или ген scFv. В ходе таких превращений фрагмент ДНК, кодирующий V<sub>L</sub> или V<sub>H</sub>, оказывается функционально связанным с другим фрагментом ДНК, кодирующим другую белковую последовательность, такую как константный участок или гибкий линкер антитела. Термин "функционально связанный" в данном контексте используется для обозначения того, что два фрагмента ДНК объединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые данными двумя фрагментами ДНК, сохраняются в рамке считывания.

Выделенную ДНК, кодирующую область V<sub>H</sub>, можно превратить в полноразмерный ген тяжелой цепи с помощью функционального связывания V<sub>H</sub>-кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные участки тяжелой цепи (шарнир, CH1, CH2 и/или CH3). Последовательности генов константных участков тяжелой цепи человека известны из уровня техники (см., например, Kabat E.A., et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication, № 91-3242) и фрагменты ДНК, соответствующие таким участкам, могут быть получены стандартной ПЦР-амплификацией. Константный участок тяжелой цепи может представлять собой константный участок IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например участок IgG1. Для гена Fab фрагмента тяжелой цепи V<sub>H</sub>-кодирующая ДНК может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только константный участок CH1 тяжелой цепи.

Выделенная ДНК, кодирующая участок V<sub>L</sub>, может быть превращена в полноразмерный ген легкой цепи (а также ген Fab легкой цепи) с помощью функционального связывания V<sub>L</sub>-кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константный участок легкой цепи CL. Последовательности генов константных участков легкой цепи человека известны из уровня техники (см., например, Kabat E.A., et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication, № 91-3242), и фрагменты ДНК, соответствующие таким участкам, могут быть получены стандартной ПЦР-амплификацией. В предпочтительных вариантах осуществления констант-

ный участок легкой цепи может представлять собой константный участок каппа или лямбда.

Для создания гена scFv, V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-кодирующие фрагменты ДНК функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например кодирующим аминокислотную последовательность (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, так что последовательности V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть экспрессированы в виде непрерывного одноцепочечного белка с участками V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, соединенными гибким линкером (см., например, Bird et al. (1988), *Science*, 242:423-426; Huston et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85:5879-5883; McCafferty et al. (1990), *Nature*, 348:552-554).

Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, которые гомологичны последовательностям моноклональных антител 7A10, 7A10-T93A, 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и 1E8 (например, последовательности, показанные в табл. 22). Типичные молекулы нуклеиновой кислоты кодируют последовательности V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, которые по меньшей мере на 70% идентичны, например, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичны молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим последовательности V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> моноклональных антител 7A10, 7A10-T93A, 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11, 2E2, 23H8-1, 23H8-2, 23H8-3 и 1E8 (например, показанные в табл. 22). Настоящее изобретение также обеспечивает векторы, например векторы экспрессии, кодирующие нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, которые содержат описанные выше векторы или нуклеиновые кислоты. Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты с "молчащими" заменами (т.е. заменами, которые не изменяют полученную аминокислотную последовательность при трансляции молекулы нуклеиновой кислоты), например, для оптимизации кодонов.

#### VIII. Получение антител.

Моноклональные антитела, описанные в настоящем изобретении, могут быть получены различными известными способами, включая, например, стандартную методику гибридизации соматических клеток, описанную в Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). Хотя предпочтительными являются методики гибридизации соматических клеток, в принципе могут применяться другие способы получения моноклональных антител, например вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов.

Предпочтительной животной системой для получения гибридом является мышьяная система. Методика получения гибридом в мышьях является очень хорошо разработанной. В технике известны протоколы иммунизации и методики выделения иммунизированных спленоцитов для слияния. Также известны клетки-партнеры при слиянии (например, клетки миеломы мышья) и методики слияния.

Химерные или гуманизированные антитела по настоящему изобретению могут быть получены на основе последовательностей моноклональных антител мышья, полученных, как описано выше. ДНК, кодирующая тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов, может быть получена с применением стандартных методик молекулярной биологии из представляющей интерес гибридомы мышья и сконструирована таким образом, что она содержит немышьяные (например, человеческие) иммуноглобулиновые последовательности. Например, для создания химерного антитела, варибельные области мышья могут быть связаны с константными областями человека с применением известных в технике способов (см., например, патент США № 4816567, выданный Cabilly и соавторам). Для создания гуманизированного антитела области CDR мышья могут быть внедрены в каркасный участок человека с применением способов, известных в технике (см., например, патент США № 5225539, выданный Winter, и патенты США № 5530101; 5585089; 5693762; и 6180370 для Queen и соавторов).

В одном варианте осуществления антитела, описанные в настоящем изобретении, представляют собой моноклональные человеческие антитела. Такие человеческие моноклональные антитела, направленные против  $\alpha$ -синуклеина, могут быть получены с применением трансгенных или трансхромосомных мышья, несущих части человеческой иммунной системы, а не иммунной системы мышья. Такие трансгенные и трансхромосомные мышья включают мышья, которые в настоящей заявке называются мышьями HuMAb и мышьями KM соответственно, и, вместе взятые, именуются "мышьями с Ig человека".

Мышь HuMAb® (Medarex, Inc.) содержит минилокусы иммуноглобулинового гена человека, которые кодируют неперегруппированные последовательности тяжелой ( $\mu$  и  $\gamma$ ) и легкой цепей человеческого иммуноглобулина, совместно с нацеленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы цепей  $\mu$  и  $\kappa$  (см., например, Lonberg, et al. (1994), *Nature*, 368(6474):856-859). Соответственно данная мышья демонстрирует уменьшенную экспрессию мышьяного IgM или  $\kappa$ , и в ответ на иммунизацию введенные трансгены тяжелой и легкой цепей человека испытывают переключение классов и соматическую мутацию, генерируя моноклональный IgG<sub>κ</sub> человека с высокой аффинностью (Lonberg, N. et al. (1994), *supra*; reviewed in Lonberg, N. (1994), *Handbook of Experimental Pharmacology*, 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995), *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995), *Ann. NY. Acad. Sci.*, 764:536-546). Получение и использование мышья HuMAb и модификации генома, которые несет такая мышья, более подробно описаны в Taylor, L. et al. (1992), *Nucleic Acids Research*, 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993), *International Immunology*, 5:647-656; Tuaille et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:3720-3724; Choi et al. (1993), *Nature Genetics*, 4:117-123; Chen, J. et al. (1993), *EMBO J.*, 12:821-830;

Tuaille et al. (1994), *J. Immunol.*, 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994), *International Immunology*, 6:579-591; и Fishwild, D. et al. (1996), *Nature Biotechnology*, 14:845-851, содержание которых полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки. См. также патенты США № 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; и 5770429; все выданы Lonberg и Kay; патент США № 5545807, выданный Surani и соавторам; публикации PCT № WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все Lonberg и Kay; а также публикацию PCT № WO 01/14424 для Korman и соавторов.

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем изобретении, получают с применением мыши, которая является носителем последовательности человеческого иммуноглобулина на трансгенах и трансхромосомах, как, например, мышь, являющаяся носителем трансгена тяжелой цепи человека и трансхромосомы легкой цепи человека. Такие мыши, называемые в настоящем документе "мышьями КМ", подробно описаны в публикации PCT WO 02/43478 для Ishida et al.

В уровне техники известны и другие альтернативные трансгенные животные системы, экспрессирующие гены иммуноглобулина человека, причем данные системы могут применяться для получения антител к  $\alpha$ -синуклеину, описанных в настоящем документе. Например, может применяться альтернативная трансгенная система, называемая Xenomouse (Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в патентах США № 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963, выданных Kucherlapati и соавторам.

Кроме того, в уровне техники имеются альтернативные трансхромосомные животные системы, экспрессирующие иммуноглобулиновые гены человека, и их можно применять для выработки антител к  $\alpha$ -синуклеину, описанных в настоящем документе. Например, могут применяться мыши, являющиеся носителями как трансхромосомы тяжелой цепи человека, так и трансхромосомы легкой цепи человека, называемые "ТС мышьями"; такие мыши описаны в Tomizuka et al. (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97:722-727. Кроме того, в технике были описаны коровы, являющиеся носителями трансхромосом тяжелой и легкой цепей человека (Kuroiwa et al. (2002), *Nature Biotechnology*, 20:889-894), причем их можно применять для выработки антител к  $\alpha$ -синуклеину, описанных в настоящем документе.

Дополнительные описанные в уровне техники мышьяные системы для получения человеческих антител, включают в себя

(i) мышь VelocImmune® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), у которой вариабельные участки эндогенной мышьяной тяжелой и легкой цепей были заменены посредством гомологичной рекомбинации вариабельными участками тяжелой и легкой цепей человека, функционально связанными с эндогенными константными участками мышья, так что химерные антитела (человеческая V/мышьяная C) появляются у мышья и затем превращаются в полностью человеческие антитела с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК; и

(ii) мышь MeMo(r) (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), причем мышь содержит неперегруппированные вариабельные участки тяжелой цепи человека, но один перегруппированный суммарный участок легкой цепи человека.

Такие мыши и их применение для получения антител описаны, например, в публикации международной заявки WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 и US 2012/0073004.

Моноклональные человеческие антитела по настоящему изобретению также могут быть получены с применением методик фагового дисплея для скрининга библиотек иммуноглобулиновых генов человека. В уровне техники разработаны такие методики фагового дисплея для выделенных антител человека. См., например, патенты США № 5223409; 5403484 и 5571698, выданные Ladner и соавторам; патенты США № 5427908 и 5580717, выданные Dower и соавторам; патенты США № 5969108 и 6172197, выданные McCafferty и соавторам; и патенты США № 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081, выданные Griffiths и соавторам.

Моноклональные человеческие антитела по настоящему изобретению также могут быть получены с применением мышья SCID, в которых воспроизведены иммунные клетки человека, так что при иммунизации генерируется иммунный ответ с выработкой антител человека. Такие мыши описаны, например, в патентах США № 5476996 и 5698767, выданных Wilson и соавторам.

#### Иммунизация.

Для выработки полностью человеческих антител к  $\alpha$ -синуклеину трансгенные или трансхромосомные мыши, содержащие гены человеческого иммуноглобулина (например, мыши HCo12, HCo7 или КМ), могут быть иммунизированы очищенным или обогащенным препаратом  $\alpha$ -синуклеинового антигена и/или клетками, экспрессирующими  $\alpha$ -синуклеин или его фрагмент, как описано для других антигенов, например, в Lonberg et al. (1994), *Nature*, 368(6474):856-859; Fishwild et al. (1996), *Nature Biotechnology*, 14:845-851 и WO 98/24884. Например, в одном варианте осуществления мышья иммунизируют рекомбинантным человеческим  $\alpha$ Syn дикого типа (WT). В другом варианте осуществления мышья иммунизируют мутантным белком  $\alpha$ Syn A53T-PFF. В другом варианте осуществления мышья иммунизируют  $\alpha$ Syn WT-PFF. В другом варианте осуществления мышья иммунизируют сшитым  $\alpha$ Syn WT. В другом варианте осуществления мышья иммунизируют сшитым A53T PFF. В другом варианте осуществления мышья им-

мунизируют смесью  $\alpha$ Syn WT-PFF,  $\alpha$ Syn A53T-PFF, сшитого  $\alpha$ Syn WT-PFF и сшитого  $\alpha$ Syn A53T-PFF. Альтернативно мышей можно иммунизировать ДНК, кодирующей человеческий  $\alpha$ -синуклеин или его фрагмент. Предпочтительно при первой инфузии мыши должны иметь возраст от 6 до 16 недель. Например, для иммунизации мышей NuMAb может быть применено внутрибрюшинное введение очищенного или обогащенного препарата (от 5 до 50 мкг) рекомбинантного  $\alpha$ -синуклеинового антигена. В случае, если иммунизация с применением очищенного или обогащенного препарата  $\alpha$ -синуклеинового антигена не приводит к образованию антител, мышей также можно иммунизировать клетками, экспрессирующими  $\alpha$ -синуклеин, например клеточной линией, с целью стимулирования иммунных реакций.

Типичные клеточные линии включают сверхэкспрессирующие  $\alpha$ -синуклеин стабильные клеточные линии CHO и Raji.

Накопленный опыт с различными антигенами показал, что трансгенные мыши NuMAb реагируют лучше всего, когда первоначально иммунизируют внутрибрюшинно (IP) или подкожно (SC) антигеном с адьювантом Райби (Ribi), IP/SC с последующими иммунизациями один раз в неделю (в общей сложности до 10) с антигеном в адьюванте Райби. Иммунную реакцию можно отслеживать в ходе выполнения протокола иммунизации с использованием образцов плазмы, полученных из крови, забранной из ретроорбитального синуса. Плазму можно подвергать скринингу с помощью методов ELISA и FACS (как описано ниже), и мышей с достаточными титрами иммуноглобулина человеческого антитела к  $\alpha$ -синуклеину можно использовать для слияний. Мышей можно подвергнуть бустер-иммунизации антигеном внутривенно за 3 суток до умерщвления и удаления селезенки и лимфатических узлов. Ожидается, что может быть необходимо осуществление от 2 до 3 слияний для каждой иммунизации. Каждым антигеном иммунизируют, как правило, от 6 до 24 мышей. Обычно используют линии HCo7, HCo12 и KM. Кроме того, оба трансгена HCo7 и HCo12 можно ввести посредством скрещивания в одну мышь, имеющую два разных трансгена человеческой тяжелой цепи (HCo7/HCo12).

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к  $\alpha$ -синуклеину.

Для получения гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела, описанные в данном документе, спленоциты и/или клетки лимфатических узлов из иммунизированных мышей можно выделить и подвергнуть слиянию с соответствующей линией immortalized клеток, такой как линия клеток миеломы мышши. Полученные в результате гибридомы можно подвергнуть скринингу в отношении продуцирования антигенспецифичных антител. Например, суспензии отдельных клеток лимфоцитов селезенки из иммунизированных мышей можно подвергнуть слиянию с Sp2/0 клетками несекретирующей миеломы мышши (ATCC, CRL 1581) с использованием 50% PEG. Клетки высаживают в количестве приблизительно  $2 \times 10^5$  в плоскодонный микротитровальный планшет с последующим двухнедельным инкубированием в селективной среде, содержащей 10% фетальной сыворотки (fetal Clone Serum), 18% кондиционированной среды "653", 5% реактива origen (IGEN), 4 mM L-глутамин, 1 mM пирувата натрия, 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-меркаптоэтанола, 50 единиц/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина, 50 мг/мл гентамицина и IX NAT (Sigma). Приблизительно через две недели клетки можно культивировать в среде, в которой NAT заменен на HT. Затем отдельные лунки можно подвергнуть скринингу в отношении человеческих моноклональных антител IgM и IgG с помощью анализа ELISA. Если имеет место существенный рост гибридомы, среду можно подвергнуть наблюдению обычно через 10-14 суток. Гибридомы, секретирующие антитело, можно пересадить, вновь подвергнуть скринингу, и если они все еще являются положительными в отношении человеческого IgG, моноклональные антитела можно субклонировать по меньшей мере дважды при использовании метода серийных разведений. Стабильные субклоны можно затем культивировать *in vitro* с получением небольших количеств антитела для характеристики в среде для тканевой культуры.

Чтобы очистить человеческие моноклональные антитела, отобранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых вращающихся колбах для очистки моноклональных антител. Надосадочные жидкости можно профильтровать и сконцентрировать перед проведением аффинной хроматографии с использованием иммобилизованного на сефарозе белка A (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Элюированный IgG можно подвергнуть проверке с помощью электрофореза в геле и высокоэффективной жидкостной хроматографии, чтобы гарантировать чистоту. Буферный раствор можно заменить на PBS, и концентрацию можно определить по OD280 (оптической плотности при длине волны 280 нм) с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разделить на аликвоты и хранить при  $-80^\circ\text{C}$ .

Получение трансфектом, продуцирующих моноклональные антитела к  $\alpha$ -синуклеину.

Антитела могут вырабатываться в трансфектоне на основе клетки-хозяина, например, с помощью комбинации методик с использованием рекомбинантной ДНК и методов трансфекции генов, которые широко известны в уровне техники (Morrison S. (1985), Science, 229:1202).

Например, для экспрессии антител или фрагментов данных антител, ДНК, кодирующие часть легкой и тяжелой цепей или полноразмерные легкую и тяжелую цепи, можно получить с помощью стандартных методик молекулярной биологии (например, ПНР-амплификации или клонирования кДНК с использованием гибридомы, которая экспрессирует антитело, представляющее интерес), и ДНК можно

встроить в векторы экспрессии таким образом, чтобы гены были функционально связаны с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. В данном контексте термин "функционально связанный", как предполагается, означает, что ген антитела лигирован в вектор таким образом, что последовательности контроля транскрипции и трансляции в векторе выполняют свою целевую функцию, заключающуюся в регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Вектор экспрессии и последовательности контроля экспрессии выбирают таким образом, чтобы они были совместимы с используемой для экспрессии клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела могут быть встроены в отдельные векторы или оба гена встроены в один и тот же вектор экспрессии. Гены антитела встраивают в вектор(ы) экспрессии с помощью стандартных способов (например, лигирования комплементарных сайтов рестрикции в фрагмент гена антитела и вектор или лигирования тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют). Вариабельные участки легкой и тяжелой цепи в антителах, описанных в данном документе, можно применять для создания генов полноразмерного антитела для антител любого изотипа посредством встраивания таких вариабельных участков в векторы экспрессии, уже кодирующие константные участки тяжелой цепи и константные участки легкой цепи желаемого изотипа, в результате чего  $V_H$  сегмент является функционально связанным с  $C_H$  сегментом(ами) в векторе, а  $V_L$  сегмент является функционально связанным с  $C_L$  сегментом в векторе.

В качестве дополнения или альтернативы рекомбинантный вектор экспрессии может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор таким образом, чтобы сигнальный пептид был связан в одной рамке считывания с аминоконцом в гене цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из белка, не являющегося иммуноглобулином).

В дополнение к генам цепи антитела рекомбинантные векторы экспрессии могут нести регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. Предполагается, что термин "регуляторная последовательность" включает в себя промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel (*Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалисту в данной области техники будет понятно, что построение вектора экспрессии, в том числе выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, уровень экспрессии желаемого белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетке-хозяине из млекопитающего животного включают в себя вирусные элементы, которые приводят к высоким уровням экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, происходящие из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян 40 (SV40), аденовируса (например, большой поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и вируса полиомы. В качестве альтернативы можно использовать невирусные регуляторные последовательности, такие как убиквитиновый промотор или  $\beta$ -глобиновый промотор. Кроме того, регуляторные элементы, состоящие из последовательностей из разных источников, такие как промоторная система SRA, которая содержит последовательности из раннего промотора SV40, и длинный концевой повтор из вируса Т-клеточного лейкоза человека типа I (Takebe, Y. et al. (1988), *Mol. Cell. Biol.*, 8:466-472).

В дополнение к генам цепей антител и регуляторным последовательностям, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селективируемых маркеров. Ген селективируемого маркера облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США № 4399216, 4634665 и 5179017, все за авторством Axel et al.). Например, как правило, ген селективируемого маркера придает клетке-хозяину, в которую был введен вектор, устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат. Предпочтительные гены селективируемых маркеров включают в себя ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для использования в dhfr-клетках-хозяевах с селекцией/увеличением численности с использованием метотрексата) и ген neo (для селекции с использованием G418).

Для экспрессии легких и тяжелых цепей вектор (векторы) экспрессии, кодирующие тяжелую и легкую цепи, трансфицируют в клетку-хозяина с помощью стандартных методик. Различные формы термина "трансфекция", как предполагается, охватывают широкий спектр методик, обычно используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например электропорацию, осаждение с фосфатом кальция, трансфекцию с использованием DEAE-декстрана (диэтиламиноэтилдекстран) и т.п. Несмотря на то что теоретически возможно экспрессировать антитела, описанные в данном документе в любой из прокариотических или эукариотических клеток-хозяев, экспрессия антител в эукариотических клетках и наиболее предпочтительно в клетках-хозяевах из млекопитающего животного является наиболее предпочтительной, поскольку сборка и секреция свернутого надлежащим образом и иммунологически активного антитела в таких эукариотических клетках и, в частности, в клетках млекопитающего более вероятна, чем в прокариотических клетках. Прокариотическая экспрессия генов

антитела, как сообщалось, является неэффективной для получения высоких выходов активного антитела (Boss, MA and Wood, CR (1985), Immunology Today, 6:12-13).

Предпочтительные клетки-хозяева из млекопитающего животного для экспрессии рекомбинантных антител, описанных в данном документе, включают клетки яичника китайского хомячка (CHO клетки) (включая клетки dhfr-CHO, описанные в Urlaub and Chasin (1980), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77:4216-4220, используемые с селективируемым маркером DHFR, например, как описано в R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982), Mol. Biol., 759:601-621), миеломные NSO клетки, COS клетки и SP2 клетки. В частности, для применения с миеломными NSO клетками другой предпочтительной системой экспрессии является GS система экспрессии генов, раскрытая в патентных документах WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841. Если рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие гены антитела вводят в клетки-хозяева из млекопитающего животного, антитела продуцируются при культивировании клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения возможности экспрессии антитела клетках-хозяевах или более предпочтительно для секреции антитела в среду культивирования, в которой выращиваются клетки-хозяева. Антитела можно выделять из среды культивирования с использованием стандартных способов очистки белков.

#### IX. Анализ.

Антитела, описанные в данном документе, можно исследовать в отношении связывания с  $\alpha$ -синуклеином, например, с помощью стандартного анализа ELISA, используя стандартные методики, такие как описанные в примерах.

Анализ ELISA, который описан выше, можно использовать для скрининга антител и, следовательно, гибридомы, которые продуцируют антитела, проявляющие положительную реактивность с иммуногеном  $\alpha$ -синуклеина. Гибридомы, продуцирующие антитела, которые связываются предпочтительно с высокой аффинностью с  $\alpha$ -синуклеином, можно затем субклонировать и дополнительно охарактеризовать. Затем можно выбрать один клон от каждой гибридомы, который сохраняет реактивность родительских клеток (с помощью ELISA), для создания банка клеток и для очистки антитела.

Для того чтобы определить, связываются ли отобранные моноклональные антитела к CD73 с уникальными эпитопами, каждое антитело можно биотинилировать с использованием коммерчески доступных реактивов (Pierce, Rockford, IL). Связывание биотинилированных MAbs можно выявить с использованием меченого стрептавидинового зонда. Исследования конкуренции с использованием немеченых моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител можно осуществлять с использованием покрытых  $\alpha$ -синуклеином планшетов для ELISA, как описано выше.

Способы оценки конкуренции между антителами включают, например, иммуноанализ, который показывает способность одного антитела блокировать (или не блокировать) связывание другого антитела с антигеном-мишенью, т.е. анализ конкурентного связывания. Конкурентное связывание определяют в анализе, в котором тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфичное связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как  $\alpha$ -синуклеин. Известны многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например

твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуоферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ;

твердофазный прямой биотин-аவிдиноновый EIA;

твердофазный анализ с прямым мечением, сэндвич-анализ твердой фазы с прямой детекцией и ферментативной меткой;

твердофазный анализ с прямой детекцией RIA с использованием метки  $^{125}\text{I}$ ;

твердофазный прямой биотин-аவிдиноновый EIA; и

RIA с прямым мечением.

Поверхностный плазмонный резонанс также может быть использован для данной цели. Обычно такой анализ включает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих немеченый тестируемый иммуноглобулин или меченый контрольный иммуноглобулин. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого иммуноглобулина. Тестируемый иммуноглобулин обычно присутствует в избытке. Обычно, когда конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать специфичное связывание контрольного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или более.

Другие способы скрининга для определения эпитопа, связанного с антителами, раскрытого в настоящем документе, включают, например, рентгеноструктурный анализ кристаллов комплексов антиген:антитело, который обеспечивает атомное разрешение эпитопа. Другие способы контролируют связывание антитела с фрагментами антигена или мутированными вариациями антигена, где потеря связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в антигенной последовательности часто считается показателем эпитопного компонента. В дополнение для картирования эпитопов можно также использовать вычислительные комбинаторные способы. Данные способы основаны на способности представ-

ляющего интерес антитела к аффинному выделению специфических коротких пептидов из комбинаторных пептидных библиотек фагового дисплея. Для картирования эпитопов также были разработаны вычислительные алгоритмы, которые, как было показано, отображают конформационные эпитопы с разрывными фрагментами.

Для определения изотипа очищенных антител можно проводить анализ ELISA изотипа с использованием реагентов, специфичных для антител определенного изотипа.

Антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут быть дополнительно исследованы на реактивность с  $\alpha$ -синуклеиновым антигеном с помощью Вестерн-блоттинга. Вкратце клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих  $\alpha$ -синуклеин, могут быть получены и подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. После электрофореза разделенные антигены будут переносить на нитроцеллюлозные мембраны, блокировать 20% мышинной сывороткой и исследовать моноклональные антитела, подлежащие анализу. Связывание IgG может быть обнаружено с использованием щелочной фосфатазы к IgG и проявлено с использованием таблеток субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Способы анализа аффинности связывания, перекрестной реактивности и кинетики связывания различных антител к  $\alpha$ -синуклеину включают в себя стандартные анализы, известные в настоящей области техники, например, анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore™ с использованием прибора SPR Biacore™ 2000 (Biacore AB, Uppsala, Sweden).

Антитела к  $\alpha$ -синуклеину также могут быть исследованы на их предпочтительное связывание с  $\alpha$ -синуклеиновыми олигомерами относительно  $\alpha$ -синуклеиновых мономеров. "Коэффициент связывания мономер/PFF" используется в настоящем документе в качестве показателя для описания поведения связывания антител к  $\alpha$ -синуклеину с PFF и  $\alpha$ -синуклеиновыми мономерами. Коэффициенты, превышающие 1, указывают на большее предпочтение связывания с PFF, чем с  $\alpha$ -синуклеиновыми мономерами. Например, если антитело связывается с  $\alpha$ -синуклеиновым мономером с  $EC_{50}$ , составляющей 291 нМ, и PFF с  $EC_{50}$ , составляющей 0,16 нМ, согласно анализу ELISA, например, как описано в примере 3, коэффициент связывания мономер/PFF данного антитела будет составлять  $291/0,16=1819$ . В некоторых вариантах осуществления PFF получают в соответствии со способом, описанным в примере 3.

Антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут быть исследованы на их способность уменьшать скопления агрегатов  $\alpha$ -синуклеиновых олигомеров в головном мозге, используя, например, анализы, описанные в примере 11, или анализы ELISA на олигомеры, описанные в примере 12. Антитела могут быть исследованы на их способность уменьшать или ингибировать индуцированное  $\alpha$ -синуклеиновым олигомером (PFF) фосфорилирование по S129  $\alpha$ -синуклеина с использованием, например, способов, описанных в примерах 10 и 11, или способность истощать молекулярную частицу, которая продуцирует нерастворимые агрегаты  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегаты фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина) из PFF и/или лизата головного мозга, полученные от пациентов с патологическими агрегатами  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге (например, лизаты мозга, полученные от пациентов с синуклеинопатиями, например MSA).

X. Иммуноконъюгаты, производные антител и диагностика.

Описанные в настоящем изобретении антитела можно применять для диагностических целей, в том числе для анализа образцов и *in vivo* визуализации, и с данной целью антитело (или его связывающий фрагмент) можно конъюгировать с соответствующим детектируемым средством с образованием иммуноконъюгата. В случае диагностических целей соответствующими средствами являются детектируемые метки, которые включают в себя радиоактивные изотопы для визуализации всего тела и радиоактивные изотопы, ферменты, флуоресцентные метки и другие подходящие маркирующие антитело элементы для анализа образцов.

Детектируемые метки могут относиться к различным типам, используемым в настоящее время в области *in vitro* диагностики, включая метки на основе частиц, в том числе золи металлов, такие как коллоидное золото, изотопы, такие как  $I^{125}$  или  $Tc^{99}$ , присутствующие, например, с пептидным хелатирующим средством типа  $N_2S_2$ ,  $N_3S$  или  $N_4$ , хромофоры, в том числе флуоресцентные маркеры, биотин, люминесцентные маркеры, фосфоресцирующие маркеры и т.п., а также ферментные метки, которые превращают заданный субстрат в детектируемый маркер, и полинуклеотидные метки, которые выявляются после амплификации, такой как полимеразная цепная реакция. Подходящие ферментные метки включают в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и т.п. Например, метка может представлять собой фермент щелочную фосфатазу, выявляемую посредством измерения наличия или появления хемилюминесценции после превращения 1,2-диоксетановых субстратов, таких как адамантил-метокси-фосфорилокси-фенилдиоксетан (AMPPD), динатрия 3-(4-(метоксиспиро{1,2-диоксетан-3,2'-(5'-хлор)трицикло{3.3.1.1,3,7}декан}-4-ил)фенил)фосфат (CSPD), а также CDP и CDP-star® или других люминесцентных субстратов, хорошо известных специалистам в данной области техники, например хелатов подходящих лантаноидов, таких как тербий(III) и европий(III). Средства для детектирования определяются выбранной меткой. Появление метки или продуктов ее реакции можно оценить невооруженным глазом в случае, когда метка представляет собой материал в виде частиц и накапливается на соответствующих уровнях, или с использованием инструментов, таких как спектрофотометр, люминометр, флуориметр и т.п., причем все они соответствуют стандартной практике.

Предпочтительно способы конъюгации приводят в результате к связям, которые являются по существу (или почти) неиммуногенными, например пептидные (т.е. амидные), сульфидные, (стерически затрудненные), дисульфидные, гидразоновые и эфирные связи. Данные связи являются почти неиммуногенными и проявляют приемлемую стабильность в сыворотке (см., например, Senter, P.D., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13 (2009) 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886).

В зависимости от биохимической природы фрагмента и антитела можно использовать разные стратегии конъюгирования. В случае если фрагмент представляет собой встречающийся в естественных условиях или рекомбинантный полипептид длиной от 50 до 500 аминокислот, существуют стандартные процедуры в пособиях, описывающих химические особенности синтеза белковых конъюгатов, которым легко может следовать специалист в данной области техники (см., например, Hackenberger, C.P.R. and Schwarzer, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 47 (2008), 10030-10074). В соответствии с одним вариантом осуществления используется реакция малеинимидо-фрагмента с цистеиновым остатком в антителе или фрагменте. Она является особенно подходящим связывающим химическим процессом в случае использования, например Fab или Fab'-фрагмента антитела. В качестве альтернативы в соответствии с одним вариантом осуществления выполняется связывание с С-концом антитела или фрагмента. С-концевую модификацию белка, например, Fab-фрагмента, можно выполнить, как описано в источнике (Sunbul, M. and Yin, J., *Org. Biomol. Chem.*, 7 (2009), 3361-3371).

В целом сайт-специфичная реакция и ковалентное связывание основываются на превращении природной аминокислоты в аминокислоту с реакционной способностью, которая является нетипичной для реакционной способности других присутствующих функциональных групп. Например, конкретный цистеин в редком контексте последовательности может подвергаться ферментативному превращению в альдегид (см. Frese, M.A., и Dierks, T., *ChemBioChem.*, 10 (2009), 425-427). Также возможно получить желательную модификацию аминокислоты при использовании специфичной ферментативной активности определенных ферментов в отношении реакции с природной аминокислотой в заданном контексте последовательности (см., например, Taki M. et al., *Prot. Eng. Des. Sel.*, 17 (2004), 119-126; Gautier, A. et al., *Chem. Biol.*, 15 (2008), 128-136. Катализируемое протеазой образование C-N связей описано в Bordusa, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004), 389-403).

Сайт-специфичной реакции и ковалентного связывания также можно достичь с помощью селективной реакции взаимодействия концевых аминокислот с соответствующими модифицирующими реактивами.

Способность N-концевого цистеина к реакции взаимодействия с бензонитрилами (см., Ren H. et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 48 (2009), 9658-9662) можно использовать для достижения сайт-специфичного ковалентного связывания.

Нативное химическое лигирование также основывается на С-концевых цистеиновых остатках (Taylor, E. Vogel; Imperiali, B., *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (*Protein Engineering*), 65-96).

В европейском патенте EP 1074563 описывается способ конъюгирования, который основывается на более быстром взаимодействии цистеина в пределах участка последовательности, содержащего отрицательно заряженные аминокислоты, чем цистеина, расположенного в пределах участка последовательности, содержащего положительно заряженные аминокислоты.

Фрагмент также может представлять собой синтетический пептид или пептидомиметик. В случае, если полипептид является химически синтезированным, аминокислоты с нетипичной химической реакционной способностью могут быть включены в ходе синтеза (см., например, de Graaf, A.J. et al., *Bioconj. Chem.*, 20 (2009), 1281-1295). Поскольку речь идет о широком спектре нетипичных функциональных групп, и их можно ввести в синтетический пептид, конъюгирование такого пептида с линкером является стандартной химической процедурой.

Для получения меченого одной меткой полипептида, конъюгат со стехиометрическим соотношением 1:1 можно отделить от других побочных продуктов с помощью хроматографии. Данную процедуру может облегчить использование меченого красителем связывающего элемента в составе пары и заряженного линкера. При использовании данного вида меченого и имеющего сильный отрицательный заряд связывающего элемента в составе пары, конъюгированные с одной меткой полипептиды легко отделяются от немеченых полипептидов и полипептидов, которые несут более чем один линкер, поскольку различие в заряде и молекулярной массе можно использовать для разделения. Флуоресцентный краситель может быть полезен для очистки комплекса от несвязавшихся компонентов, таких как меченый моновалентный связывающий элемент.

В одном варианте осуществления фрагмент, прикрепленный к антителу против  $\alpha$ -синуклеина, выбран из группы, состоящей из связывающего фрагмента, маркирующего фрагмента и биологически активного фрагмента.

Антитела, описанные в настоящем изобретении, также можно подвергнуть конъюгации с терапевтическим средством с образованием иммуноконъюгата, такого как конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC). Подходящие терапевтические средства включают в себя антиметаболиты, алкилирующие средства, средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ДНК-интеркаляторы, ДНК-сшивающие средства, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы ядерного экспорта, ингибиторы протеасомы, ин-

гибиторы топоизомеразы I или II, ингибиторы белков теплового шока, ингибиторы тирозинкиназы, антибиотики и антимиотические средства. В ADC антитело и терапевтическое средство предпочтительно конъюгированы посредством расщепляемого линкера, такого как пептидильный, дисульфидный или гидразоновый линкер. Более предпочтительно линкер представляет собой пептидильный линкер, такой как Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 219), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser или Glu. ADC можно получать, как описано в патентах США № 7087600; 6989452 и 7129261; РСТ публикациях международных заявок WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312 и WO 08/103693; публикациях заявок на патент США 20060024317; 20060004081 и 20060247295; раскрытия которых включены в данный документе посредством ссылки.

Антитела к  $\alpha$ -синуклеину, например, описанные в настоящем изобретении, также можно использовать для обнаружения  $\alpha$ -синуклеина, такого как человеческий  $\alpha$ -синуклеин, например человеческого  $\alpha$ -синуклеина в тканях или образцах тканей. Антитела могут быть использованы, например, в анализе ELISA или в проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело к  $\alpha$ -синуклеину приводят в контакт с клетками, например клетками ткани, в течение времени, подходящего для специфического связывания, а затем добавляют реагент, например антитело, которое выявляет антитело к  $\alpha$ -синуклеину. Антитело к  $\alpha$ -синуклеину может представлять собой полностью человеческое антитело или оно может быть химерным антителом, таким как антитело, имеющее переменные участки человека и константные участки мыши или их часть. Типичные способы обнаружения  $\alpha$ -синуклеина, например человеческого  $\alpha$ -синуклеина, в образце (образце клетки или ткани) включают (1) приведение образца в контакт с антителом к  $\alpha$ -синуклеину в течение времени, достаточного для обеспечения специфического связывания антитела к  $\alpha$ -синуклеину с  $\alpha$ -синуклеином в образце и (2) приведение образца в контакт с детектирующим реагентом, например антителом, которое специфично связывается с антителом к  $\alpha$ -синуклеину, таким как Fc-область антитела к  $\alpha$ -синуклеину, чтобы тем самым детектировать  $\alpha$ -синуклеин, связанный антителом к  $\alpha$ -синуклеину. Стадии промывки могут быть включены после инкубации с антителом и/или детектирующим реагентом. Антитела к  $\alpha$ -синуклеину для применения в данных способах не обязательно должны быть связаны с меткой или детектирующими средствами, поскольку можно использовать отдельное детектирующее средство.

#### XI. Биспецифичные молекулы.

Антитела, описанные в настоящем изобретении, можно применять для образования биспецифичных молекул. Антитело к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающие части могут быть дериватизированы или связаны с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора) с образованием биспецифичной молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя разными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Например, антитело к  $\alpha$ -синуклеину может быть связано с антителом или scFv, которое специфично связывается с любым белком, который может быть использован в качестве потенциальных мишеней для комбинированной обработки, таким как белки, описанные в настоящем изобретении. В действительности описанное в данном документе антитело можно дериватизировать или связать более чем с одной другой функциональной молекулой с образованием мультиспецифичных молекул, которые связываются с более чем двумя разными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; причем имеется в виду, что такие мультиспецифичные молекулы также охвачены термином "биспецифичная молекула", используемым в данном документе. Для создания биспецифичной молекулы, описанной в данном документе, антитело по настоящему изобретению может быть функционально связано (например, путем химического сочетания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или другим способом) с одной или несколькими другими связывающимися молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающийся миметик, так что образуется биспецифичная молекула.

Соответственно, в данном документе обеспечены биспецифичные молекулы, содержащие по меньшей мере одну первую специфичность связывания для  $\alpha$ -синуклеина и вторую специфичность связывания для второго целевого эпитопа. В соответствии с вариантом осуществления, описанным в данном документе, в котором биспецифичная молекула является мультиспецифичной, молекула может дополнительно включать третью специфичность связывания.

В одном варианте осуществления описанные в настоящем изобретении биспецифичные молекулы содержат в качестве специфичности связывания по меньшей мере одно антитело или фрагмент такого антитела, в том числе, например, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv или одноцепочечный Fv. Антитело может представлять собой димер легкой цепи или тяжелой цепи или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv или одноцепочечный конструктор, который описан в Ladner et al., в патенте США № 4946778, содержание которого специально включено посредством ссылки.

Хотя моноклональные человеческие антитела являются предпочтительными, другие антитела, которые могут быть использованы в описанных в настоящем документе биспецифичных молекулах, представляют собой мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

Описанные в настоящем документе биспецифичные молекулы могут быть получены путем конъю-

гации составляющих специфичности связывания с использованием способов, известных в настоящей области техники. Например, каждая специфичность связывания биспецифичной молекулы может быть получена отдельно и затем конъюгирована с другой. Когда специфичности связывания представляют собой белки или пептиды, для ковалентной конъюгации можно использовать различные связывающие или сшивающие средства. Примеры сшивающих реагентов включают в себя белок А, карбодиимид, М-сукцинимидил-8-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дителиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(М-малеимидометил)циклохаксан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (смотрите, например, Karpovsky et al. (1984), *J. Exp. Med.*, 160:1686; Liu MA et al. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82:8648). Другие способы предусматривают методики, которые описаны в Paulus (1985), *Behring Ins. Mitt.*, № 78, 118-132; Brennan et al. (1985), *Science*, 229:81-83), and Glennie et al. (1987), *J. Immunol.*, 139:2367-2375). Предпочтительные реактивы для конъюгации представляют собой SATA и сульфо-SMCC, оба реактива могут быть приобретены у Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении биспецифичные молекулы имеют вторую специфичность связывания, которая увеличивает транспорт молекулы в мозг, например, через гематоэнцефалический барьер.

Если специфичности связывания представляют собой антитела, они могут быть конъюгированы через сульфгидрильное связывание С-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. В особенно предпочтительном варианте осуществления шарнирную область модифицируют так, чтобы она до конъюгации содержала нечетное число сульфгидрильных остатков, предпочтительно один.

Альтернативно обе специфичности связывания могут быть закодированы в одном и том же векторе и экспрессированы и собраны в одной и той же клетке-хозяине. Данный способ особенно применим, если биспецифичная молекула представляет собой mAb×mAb, mAb×Fab, Fab×F(ab')<sub>2</sub> или лиганд×Fab слитый белок. Биспецифичное антитело может содержать антитело, содержащее scFv на С-конце каждой тяжелой цепи. Биспецифичная молекула по настоящему изобретению может быть одноцепочечной молекулой, включающей одно одноцепочечное антитело и детерминанту связывания, или одноцепочечной биспецифичной молекулой, включающей две детерминанты связывания. Биспецифичные молекулы могут включать как минимум две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифичных молекул описаны, например, в патенте США № 5260203; патенте США № 5455030; патенте США № 4881175; патенте США № 5132405; патенте США № 5091513; патенте США № 5476786; патенте США № 5013653; патенте США № 5258498 и патенте США № 5482858.

Связывание биспецифичных молекул с их конкретными мишенями может быть подтверждено, например, твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA), радиоиммунным анализом (RIA), анализом FACS, биологическим анализом (например, ингибированием роста) или Вестерн-блоттингом. Каждый из перечисленных способов анализа, как правило, обнаруживает наличие интересующих комплексов белок-антитело за счет применения меченого реагента (например, антитела), специфичного в отношении интересующего комплекса.

## XII. Композиции.

Настоящее изобретение далее относится к композициям, например фармацевтическим композициям, содержащим одно антитело к  $\alpha$ -синуклеину или сочетание антител к  $\alpha$ -синуклеину или сочетание с антителами к другим мишеням, или их антигенсвязывающую часть(и), описанную в настоящем документе, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать одно антитело или сочетание (например, двух или более разных) антител или иммуноконъюгатов или биспецифичных молекул, описанных в настоящем документе. Например, фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, может содержать сочетание антител (или иммуноконъюгатов или биспецифичных веществ), которые связываются с различными эпитопами на целевом антигене или которые имеют дополнительные активности.

В определенных вариантах осуществления композиция содержит антитело к  $\alpha$ -синуклеину в концентрации, составляющей по меньшей мере 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, от 1 до 300 мг/мл или от 100 до 300 мг/мл.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, также могут быть введены в комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими средствами (либо в той же композиции, либо в отдельных композициях). Примеры терапевтических средств, которые можно использовать в комбинированной терапии, включают, например, леводопу, амантадин (симметрел), антихолинергические средства (тригексифенил, бензтропин мезилат, проциклидин, артан, когентин), бромкриптин (парлодел), перголид (пермакс), ропинирол (Requip), прамипексол (Mirapex), ингибиторы моноаминоксидазы-В (МАО), такие как селегилин (дипренил или элдеприл), ингибиторы катехол-О-метилтрансферазы (COMT), такие как энтокапон, тасмар или толкапон, ингибиторы холинэстеразы, антагонисты D2-рецептора, агонисты DA, антисмысловые олигонуклеотиды (например, антисмысловые олигонуклеотиды, направленные против  $\alpha$ -синуклеина), ингибиторы киназы и ингибиторы обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2). Дополнительные средства включают, например, терапевтические сред-

ва, нацеленные на молекулы, о которых известно, что они участвуют в патологии синуклеинопатий, такие как PINK, PARKIN, DJ1, глюкоцереброзидаза (GBA), и средства, нацеленные на активные формы кислорода.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, посредством инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное соединение, т.е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифичную молекулу можно обеспечить покрытием из материала для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения, описанные в настоящем изобретении, могут включать в себя одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не придает каких-либо нежелательных токсических эффектов (см., например, Berge S.M., et al. (1977), J. Pharm. Sci., 66:1-19). Примеры таких солей включают в себя соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Соли присоединения кислоты включают в себя соли, полученные с нетоксичными неорганическими кислотами, такими как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и т.п., а также с нетоксичными органическими кислотами, такими как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксилалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и тому подобное. Соли присоединения основания включают в себя соли, полученные с щелочноземельными металлами, такими как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также с нетоксичными органическими аминами, такими как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, также может включать в себя фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают в себя

(1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.;

(2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и

(3) средства, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях, включают в себя воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Правильную текучесть можно поддерживать, например, путем использования материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ.

Данные композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгаторы и диспергирующие средства. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено как процедурами стерилизации, выше, так и включением различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенол-сорбиновой кислоты и тому подобного. Также может быть желательным включать в композиции изотонические средства, такие как сахара, хлорид натрия и тому подобное. Кроме того, длительная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть вызвана включением средств, которые замедляют всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов для инъекций или дисперсии. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно в настоящей области техники. За исключением того что любая обычная среда или средство несовместимы с активным соединением, предполагается их использование в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно приготовить в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и под-

ходящие их смеси. Правильную текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия в композицию. Длительная абсорбция инъеклируемых композиций может быть достигнута путем включения в состав средства, которое задерживает абсорбцию, например, моностеаратные соли и желатин.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящем растворителе с использованием одного ингредиента или комбинации перечисленных выше ингредиентов с последующей стерилизационной микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и замораживание-высушивание (лиофилизацию), которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из ранее стерильно-фильтрованного раствора.

Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения разовой лекарственной формы, будет варьировать в зависимости от подвергаемого лечению субъекта и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения разовой лекарственной формы, как правило, будет представлять собой такое количество композиции, которое дает терапевтический эффект. Как правило, из ста процентов данное количество будет составлять от около 0,01% до около девяноста девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно от около 0,1% до около 70%, наиболее предпочтительно от около 1% до около 30% активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Схемы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введен один болюс, может быть введено несколько разделенных доз с течением времени или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Особенно целесообразно составлять парентеральные композиции в форме дозированной единицы для удобства введения и единообразия дозировки. Используемая в настоящем документе форма дозированной единицы относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве унифицированных дозровок для подлежащих лечению пациентов; каждая единица содержит предопределенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация описанных в настоящем документе форм дозированных единиц продиктована и непосредственно зависит от

(а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут; и

(б) ограничений, присущих в настоящей области техники составления такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

Для введения антитела дозировка составляет от около 0,0001 до 100 мг/кг и более обычно от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или быть в пределах от 1 до 10 мг/кг. Иллюстративная схема лечения предусматривает введение один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в месяц, один раз в 3 месяца или один раз каждые от трех до шести месяцев. В некоторых вариантах осуществления антитело к  $\alpha$ -синуклеину может быть введено в фиксированной дозе (режим фиксированной дозы).

В некоторых способах осуществления одновременно вводят два или более моноклональных антитела с различной специфичностью связывания и в данном случае доза каждого вводимого антитела попадает в указанные диапазоны. Антитело, как правило, вводят несколько раз. Интервалы между разовыми дозировками могут составлять, например, неделю, месяц, три месяца или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, как указано путем измерения содержания антител к антигену-мишени у пациента. В некоторых способах дозировка корректируется для достижения концентрации антитела в плазме крови от около 1 мкг/мл до около 1000 мкг/мл, а в некоторых способах от около 25 мкг/мл до около 300 мкг/мл.

Антитело может быть введено в виде препарата с замедленным высвобождением, и в данном случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируют в зависимости от периода полувыведения антитела у пациента. В общем человеческие антитела показывают самый длинный период полувыведения, за которыми следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и отличные от человеческих антитела. Дозировка и частота введения могут варьировать в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических применениях относительно низкую дозировку вводят с относительно небольшими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение всю оставшуюся жизнь. В терапевтических применениях иногда требуется относительно высокая дозировка с относительно короткими интервалами, пока прогрессия болезни не будет уменьшена или не прекращена и предпочтительно до тех пор, пока пациент

не продемонстрирует частичное или полное улучшение симптомов заболевания. После данного пациенту может быть назначен профилактический режим.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях могут варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая в себя активность конкретных описанных в настоящем документе композиций или их сложного эфира, соли или амида, способа введения, времени введения, скорости выделения конкретного используемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в сочетании с конкретными используемыми составами, возраста, пола, массы, состояния, общего состояния здоровья, анамнеза подлежащего лечению пациента и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Описанная в настоящем документе композиция может быть введена посредством одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких из множества способов, известных в настоящей области техники. Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, путь и/или способ введения будет варьировать в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения для описанных в настоящем документе антигенов включают в себя внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другой парентеральный путь введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции, и включает в себя без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидную, интраспинальную, эпидуральную и внутрисуставную инъекцию и инфузию. Альтернативно, описанное в настоящем документе антигено может быть введено с помощью непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или слизистый путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения могут быть получены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, например состав с контролируемым высвобождением, включая в себя имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Могут использоваться биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов запатентованы или известны специалистам в настоящей области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции могут быть введены с помощью медицинских устройств, известных в настоящей области техники. Например, согласно предпочтительному варианту осуществления, описанная в настоящем документе терапевтическая композиция может вводиться посредством безыгольного инъектора для подкожных инъекций, такого как устройства, раскрытые в патентах США № 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры известных имплантатов и модулей для применения с описанными в настоящем документе антигенами к  $\alpha$ -синуклеину включают в себя патент США № 4487603, который раскрывает имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования лекарственных средств с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, который раскрывает терапевтическое устройство для введения лекарственных средств через кожу; патент США № 4447233, в котором раскрыт инфузионный насос лекарственного средства для доставки лекарственного средства с точной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором раскрыт имплантируемый инфузионный прибор с регулируемым потоком для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США № 4439196, который описывает осмотическую систему доставки лекарственного средства, имеющую многокамерные отсеки; и патент США № 4475196, который описывает осмотическую систему доставки лекарственного средства. Данные патенты включены в настоящий документ посредством ссылки. Многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули известны специалистам в настоящей области техники.

В определенных вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении антигена к  $\alpha$ -синуклеину могут быть составлены для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ, blood-brain barrier (BBB)) исключает многие высокогидрофильные соединения. Чтобы гарантировать, что терапевтические соединения, описанные в настоящем изобретении, пересекают ГЭБ (при желании, например, при раке головного мозга), их можно приготовить, например, в липосомах. Способы изготовления липосом смотрите, например, в патентах США № 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые избирательно переносятся в определенные клетки или органы, таким образом, повышая нацеленную доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade (1989), *J. Clin. Pharmacol.*, 29:685). Иллюстра-

тивные нацеливающие фрагменты включают в себя фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016 на имя Low et al.); маннозиды (Umezawa et al. (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995), *FEBS Lett.*, 357:140; M. Owais et al. (1995), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39:180); рецептор поверхностно-активного белка А (Briscoe et al. (1995), *Am. J. Physiol.*, 1233:134); p120 (Schreiere et al. (1994), *J. Biol. Chem.*, 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994), *FEBS Lett.*, 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994), *Immunomethods*, 4:273.

### XIII. Наборы.

Настоящее изобретение также обеспечивает наборы, содержащие антитела к  $\alpha$ -синуклеину, биспецифичные антитела или иммуноконъюгаты, раскрытые в настоящем изобретении, необязательно содержащиеся в одном флаконе или контейнере, и включают, например, инструкции к применению для лечения или диагностики заболевания, связанного с присутствием телец Леви или агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге. Наборы могут включать в себя этикетку, указывающую на предполагаемое использование содержимого комплекта. Термин "этикетка" включает в себя любые письменные, маркетинговые материалы или записанные материалы, поставляемые в комплекте или вместе с ним, или иным образом сопровождающие комплект. Такие наборы могут содержать антитело, биспецифичные антитела или иммуноконъюгат в стандартной лекарственной форме, такой как флакон с однократной дозой или предварительно загруженный шприц с однократной дозой.

### XIV. Применения и способы.

В настоящем документе обеспечены способы лечения субъектов (например, пациентов-людей) с заболеваниями, характеризующимися наличием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, а также способы профилактики данных заболеваний.

Соответственно в одном аспекте в настоящем изобретении обеспечены способы лечения заболевания, характеризующегося присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, включающие введение субъекту с заболеванием эффективного количества антитела к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающей части, описанных в настоящем документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены способы уменьшения тяжести заболевания, характеризующегося присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, включающие введение субъекту с заболеванием эффективного количества антитела к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающей части, описанных в настоящем изобретении.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены способы задержки прогрессирования заболевания, характеризующегося присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, включающие введение субъекту с заболеванием эффективного количества антитела к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающей части, описанных в настоящем изобретении.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены способы снижения риска развития заболевания, характеризующегося присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, включающие введение субъекту, подверженному риску развития заболевания, эффективного количества антитела к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающей части, описанных в настоящем изобретении.

В другом аспекте в настоящем изобретении обеспечены способы отсрочки наступления заболевания, характеризующегося наличием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, включающие введение субъекту, подверженному риску развития заболевания, эффективного количества антитела к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающей части, описанных в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления субъекты, подвергаемые лечению, проявляют симптомы (признаки) синуклеинопатий, такие как психоневрологические проявления (депрессия, деменция, галлюцинации, тревога, апатия, ангедония), изменения вегетативной нервной системы (ортостатическая гипотензия, дисфункция мочевого пузыря, запор, недержание кала, повышенное слюноотделение, дисфагия, сексуальная дисфункция, изменения мозгового кровообращения), сенсорные изменения (искажение обонятельных ощущений, боли, цвета), нарушения сна (нарушение поведения во время сна (RBD) в фазе REM, синдром беспокойных ног/периодических движений конечностями, гиперсомния, инсомния) и разные другие признаки и симптомы (утомляемость, диплопия, расфокусированное зрение, снижение/набор массы тела).

В некоторых вариантах осуществления субъекты, подлежащие лечению, не проявляют симптомов заболевания, но, как известно, имеют генетический риск развития заболевания, характеризующегося присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге. Например, такие индивидуумы могут иметь родственников, испытывающих данное заболевание, или их риск определен по анализу генетических или биохимических маркеров. Например, мутации в SNCA (PARK1, кодирующей  $\alpha$ -синуклеин), включая A30P, E46K, H50Q, G51D и A53T, и дупликации и трипликации всего гена SNCA вызывают аутосомные доминантные формы PD. Мутации в LRRK2 (PARK8, обогащенная лейциновыми повторами киназа 2) и мутация в VPS35 (PARK17, vacuolar protein sorting 35) также вызывает аутосомно-доминантную форму PD (Hernandez et al. (2016), *Genetics in Parkinson disease: Mendelian*

versus non-Mendelian inheritance. Journal of Neurochemistry 10.1111/jnc.13593). Мутации в PINK1 (PARK6, PTEN-индуцированная киназа 1), DJ-1 (PARK7), Parkin (PARK2), ATP13A2 (PARK9, ATPase тип 13A2), FBXO7 (PARK15, только F-бокс белок 7) и PLA2GB (PARK14, фосфолипаза A2, группа VI), как было показано, вызывают аутосомно-рецессивный PD/паркинсонизм. Кроме того, было идентифицировано 28 различных генетических локусов риска, связанных с PD и родственными синуклеинопатиями, включая

*SNCA, LRRK2, GBA/SYT11, MAPT, HLA-DRB5, GAK, GCH1, NUCKS1/RAB7L1, SLC41A1, BST1, SIPA1L2, ACMSD/TMEM163, STK39, MCCC1, TMEM175/GAK/DGKQ, FAM47E/SCARB2, GPNMB, FGF20, INPP5F, MIR4697, CCDC62, GCH1, VPS13C, BCKDK/STX1B, SREBF/RAI1, RIT2 и DDRGK1* (Nalls et al. (2014)).

Крупномасштабный мета-анализ данных об ассоциации всего генома идентифицирует шесть новых локусов риска для болезни Паркинсона. Nature Genetics, 46(9):989-993). Соответственно в профилактических применениях антитела, описанные в настоящем изобретении, или фармацевтические композиции, содержащие их, вводят пациенту, восприимчивому или иным образом подверженному риску развития заболевания в режиме (доза, частота и способ введения), эффективном для снижения риска заболевания, уменьшения остроты или задержки появления по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В некоторых профилактических применениях режим введения является эффективным для ингибирования или замедления накопления  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, и/или ингибирования или задержки его токсических эффектов, и/или ингибирования или замедления развития поведенческих дефицитов у пациента.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные выше, вызывают благоприятный терапевтический ответ у пациента (например, снижение агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, улучшение когнитивной функции и/или регрессию, лечение или предупреждение ухудшения когнитивных способностей) у пациента. Соответственно в некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем изобретении, вводят пациенту, у которого подозревается или уже имеется заболевание, характеризующееся присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, в режиме введения (доза, частота и способ введения), эффективном для того чтобы ослабить или, по меньшей мере, ингибировать дальнейшее ухудшение по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В некоторых терапевтических применениях режим введения является эффективным для того, чтобы уменьшить или, по меньшей мере, ингибировать дальнейшее повышение уровней  $\alpha$ -синуклеина, связанных токсичностей и/или поведенческих дефицитов. В определенных вариантах осуществления лечение может приводить, например, к снижению агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге на 10% или более, 20% или более, 30% или более, 40% или более, 50% или более, 60% или более, 70% или более, 80% или более, или 90% или более по сравнению с началом лечения или по сравнению с популяцией не прошедших лечение контрольных пациентов.

В некоторых вариантах осуществления заболевание, характеризующееся наличием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, представляет собой болезнь Паркинсона (включая идиопатическую болезнь Паркинсона), DLB, DLBD, LBVAD, чистую вегетативную недостаточность, дисфагию с тельцами Леви, случайную LBD, наследуемую LBD (например, мутации

*SNCA (PARK1), LRRK2 (Park8), VPS35 (PARK17), PINK1 (PARK6), DJ-1 (PARK7), Parkin (PARK2), ATP13A2 (PARK9), FBXO7 (PARK15) и PLA2GB (PARK14)*)

или мультисистемную атрофию (MSA; например, оливопонтocerebellарная атрофия, стриатонигральная дегенерация и синдром Shy-Drageri).

Настоящее изобретение также обеспечивает способы ингибирования образования нерастворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина (например, агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина) в клетке (in vitro или in vivo), включающие приведение клетки в контакт с эффективным количеством антитела к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающей части, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления фосфорилирование серина-129 индуцируется  $\alpha$ -синуклеиновыми олигомерами (например, PFF).

Настоящее изобретение также обеспечивает способы сохранения или увеличения синаптической плотности и/или дендритной плотности, которые измеряются с использованием маркеров образования синапса (синаптофизин) и/или дендритов (MAP2). Соответственно в некоторых вариантах осуществления субъекты, которых лечат антителами, описанными в настоящем документе, демонстрируют повышение синаптической или дендритной плотности на 10% или более, 20% или более, 30% или более, 40% или более или 50% или более относительно момента времени до начала лечения или по сравнению с популяцией не прошедших лечение контрольных пациентов.

Антитела, раскрытые в настоящем документе, также могут быть использованы для диагностики или прогнозирования заболевания, характеризующегося присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, например, путем введения антитела, раскрытого в настоящем до-

кументе (например, *ex vivo* или *in vivo*), в контакт с клетками, полученными от субъекта, и измерения уровня связывания с  $\alpha$ -синуклеином на клетках, причем аномально высокие уровни связывания с  $\alpha$ -синуклеином указывают на то, что у субъекта имеется заболевание, характеризующееся присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге. Для диагностических или прогностических целей антитела, описанные в настоящем изобретении, могут быть введены внутривенной инъекцией в тело пациента или непосредственно в головной мозг посредством внутривенной инъекции или путем сверления отверстия в черепе. Доза реагента должна находиться в таких же диапазонах, как и для способов лечения. Подходящие метки включают, например, флуоресцентные метки (например, для обнаружения оптическими методами), парамагнитные метки (например, для томографического обнаружения без хирургического вмешательства) и радиоактивные метки (например, для обнаружения с использованием позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (СПЕКТ)). Диагностику выполняют путем сравнения числа, размера и/или интенсивности меченых локусов с соответствующими исходными значениями. Исходные значения могут представлять средние уровни у популяции не имеющих заболевания индивидуумов. Исходные значения также могут представлять предшествующие уровни, определенные у этого же пациента. Например, исходные значения могут быть определены у пациента до начала лечения, и после этого произведено сравнение измеренных значений с исходными значениями. Снижение значений относительно исходных значений указывает на положительный ответ на лечение.

В одном варианте осуществления в настоящем документе обеспечен способ диагностики заболевания, характеризующегося присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина у субъекта, включающий

- (a) приведение образца от субъекта в контакт с антителом или его антигенсвязывающей частью, описанными в настоящем документе, таким образом, что образуется комплекс антитело-антиген;
- (b) измерение количества образовавшегося комплекса; и
- (c) сравнение количества комплекса в образце с количеством в контроле, причем повышенный уровень комплекса в образце относительно контроля указывает на то, что у субъекта имеется заболевание, характеризующееся присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой спинномозговую жидкость, экстракт тканей головного мозга, мочу или кровь. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой популяцию здоровых субъектов, которые не проявляют симптомов заболевания и не имеют генетической предрасположенности к заболеванию (например, синуклеинопатии).

В предпочтительных вариантах осуществления антитело к  $\alpha$ -синуклеину, описанное в настоящем документе, не является существенно токсичным. Например, антитело к  $\alpha$ -синуклеину не является существенно токсичным для органа человека, например одного или более из печени, почек, мозга, легких и сердца, как определено, например, в клинических испытаниях. В определенных вариантах осуществления антитело к  $\alpha$ -синуклеину не вызывает существенной нежелательной иммунной реакции, например аутоиммунитета или воспаления.

Антитело может быть введено отдельно или вместе с другим терапевтическим средством, которое действует совместно или синергически с антителом для лечения заболевания, связанного с тельцами Леви или агрегатами  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге (например, мультисистемной атрофии).

Типичные терапевтические средства, подходящие для применения в сочетании с антителами, описанными в настоящем документе, включают, например, леводопу, амантадин (симметрел), антихолинэргические средства (тригексифенидил, мезилат бензтропина, проциклидин, артан, когентин), бромкриптидин (парлодел), перголид (Permax), ропинирол (Requip), прамипексол (Mirapex), ингибиторы моноаминоксидазы-B (MAO), такие как селегилин (дипренил или элдеприл), ингибиторы катехол-О-метилтрансферазы (COMT), такие как энтокапон, тасмар или толкапон, ингибиторы катехол-О-метилтрансферазы (COMT), такие как энтокапон, тасмар или толкапон, ингибиторы холинэстеразы, антагонисты D2-рецептора, агонисты DA, антисмысловые олигонуклеотиды (например, антисмысловые олигонуклеотиды, направленные против  $\alpha$ -синуклеина), ингибиторы киназы и ингибиторы обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2). Дополнительные средства включают, например, терапевтические средства, нацеленные на молекулы, о которых известно, что они участвуют в патологии синуклеинопатий, такие как PINK, PARKIN, DJ1, глюкоцереброзидаза (GBA), и средства, нацеленные на активные формы кислорода.

Дополнительные терапевтические средства могут быть введены вместе (например, одновременно или последовательно) с антителами, описанными в настоящем документе, или отдельно (например, с интервалом в несколько часов или дней).

Также охватываются способы обнаружения присутствия человеческого  $\alpha$ -синуклеинового антигена в образце или измерения количества человеческого  $\alpha$ -синуклеинового антигена, включающие приведение образца и контрольного образца в контакт с моноклональным антителом, например человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью, которое специфично связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином, в условиях, которые позволяют образовывать комплекс между антителом

или его частью и человеческим  $\alpha$ -синуклеином. Затем детектируется образование комплекса, причем образование другого комплекса с образцом по сравнению с контрольным образцом указывает на присутствие в образце человеческого  $\alpha$ -синуклеинового антигена. В одном варианте осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут применяться для очистки человеческого  $\alpha$ -синуклеина посредством иммуноаффинной очистки. В другом варианте осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут применяться для определения количества  $\alpha$ -синуклеиновых белков в биологическом образце (например, при биопсии). В еще одном варианте осуществления описанные в настоящем изобретении антитела к  $\alpha$ -синуклеину могут применяться в анализах *in vitro* (например, иммуноанализах, таких как Вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ, ELISA) для обнаружения  $\alpha$ -синуклеиновых белков.

XV. Иллюстративные варианты осуществления.

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с  $\alpha$ -синуклеином и проявляет одно или несколько из следующих свойств:

- (a) связывается с мышинным и крысиным  $\alpha$ -синуклеином;
- (b) связывается с человеческим  $\beta$ -синуклеином и человеческим  $\gamma$ -синуклеином;
- (c) обладает большей аффинностью к  $\alpha$ -синуклеиновым олигомерам по сравнению с  $\alpha$ -синуклеиновыми мономерами;
- (d) ингибирует образование индуцированных  $\alpha$ -синуклеиновым олигомером нерастворимых агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина;
- (e) истощает молекулярную частицу, которая продуцирует растворимые или нерастворимые агрегаты  $\alpha$ -синуклеина, характеризующиеся фосфорилированием серина-129, из PFF и/или лизата головного мозга, полученного от пациентов с патологическими агрегатами  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге;
- (f) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 123-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1);
- (g) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 125-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1);
- (h) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-139 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1);
- (i) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 119-126 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1); и
- (j) связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-138 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1).

2. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 1, причем  $\alpha$ -синуклеиновый олигомер представляет собой PFF.

3. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 2, причем PFF получают, как описано в примере 3.

4. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов осуществления 1-3, причем  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры представляют собой растворимые  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры.

5. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов осуществления 1-3, причем  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры представляют собой нерастворимые  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры.

6. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов осуществления 1-5, причем более высокую аффинность к  $\alpha$ -синуклеиновым PFF по сравнению с  $\alpha$ -синуклеиновым мономерами измеряют с использованием коэффициента связывания  $\alpha$ -синуклеиновый мономер/ $\alpha$ -синуклеиновая PFF, как определено с помощью анализа связывания на основе люминесценции (например, как описано в примере 3).

7. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 6, причем антитело или его антигенсвязывающая часть имеет коэффициент связывания  $\alpha$ -синуклеиновый мономер/ $\alpha$ -синуклеиновая PFF, составляющий 100 или более.

8. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 7, причем коэффициент связывания мономер/PFF составляет 500 или более.

9. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 8, причем коэффициент связывания мономер/PFF составляет 700 или более.

10. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 9, причем коэффициент связывания мономер/PFF составляет 1500 или более.

11. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 10, в котором коэффициент связывания мономер/PFF составляет 3000 или более.

12. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 11, в котором коэффициент связывания мономер/PFF составляет 5000 или более.

13. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с  $\alpha$ -синуклеиновым мономе-

ром с EC<sub>50</sub>, составляющей 100 нМ или более, и связывается с PFF с EC<sub>50</sub>, составляющей 2 нМ или менее, как измерено способом ELIS A.

14. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 13, причем антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с α-синуклеиновым мономером с EC<sub>50</sub>, составляющей 500 нМ или более, и связывается с PFF с EC<sub>50</sub>, составляющей 0,5 нМ или менее.

15. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело или его антигенсвязывающая часть ингибирует PFF-индуцированное фосфорилирование α-синуклеина по серину-129 с IC<sub>50</sub>, составляющей 0,1 нМ или менее, как оценено с использованием анализа, описанного в примере 10.

16. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое специфично связывается с α-синуклеином и содержит три CDR варибельного участка тяжелой цепи и три CDR варибельного участка легкой цепи, которые находятся в парах варибельного участка тяжелой цепи и варибельного участка легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из

- (a) SEQ ID NO: 8 и 9;
- (b) SEQ ID NO: 18 и 19;
- (c) SEQ ID NO: 20 и 21;
- (d) SEQ ID NO: 31 и 32;
- (e) SEQ ID NO: 31 и 33;
- (f) SEQ ID NO: 43 и 44;
- (g) SEQ ID NO: 53 и 54;
- (h) SEQ ID NO: 63 и 64;
- (i) SEQ ID NO: 73 и 74;
- (j) SEQ ID NO: 83 и 84;
- (k) SEQ ID NO: 99 и 100;
- (l) SEQ ID NO: 99 и 101;
- (m) SEQ ID NO: 99 и 102; и
- (n) SEQ ID NO: 113 и 114.

17. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с α-синуклеином, содержащее

(a) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 2-4 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 5-7 соответственно;

(b) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 12-14 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 15-17 соответственно;

(c) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 22-24 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 25-27 соответственно;

(d) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 22-24 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 28-30 соответственно;

(e) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 37-39 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 40-42 соответственно;

(f) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 47-49 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 50-52 соответственно;

(g) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 57-59 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 60-62 соответственно;

(h) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 67-69 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 70-72 соответственно;

(i) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 77-79 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 80-82 соответственно;

(j) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 87-89 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 90-92 соответственно;

(k) CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 87-89 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 93-95

соответственно;

(l) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 87-89 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 96-98 соответственно; или же

(m) CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 107-109 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 110-112 соответственно.

18. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с  $\alpha$ -синуклеином и содержит переменные участки тяжелой и легкой цепей, причем переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 18, 31, 43, 53, 63, 73, 83, 99 и 113.

19. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с  $\alpha$ -синуклеином и содержит переменные участки тяжелой и легкой цепей, причем переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 19, 32, 33, 44, 54, 64, 74, 84, 100, 101, 102 и 114.

20. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с  $\alpha$ -синуклеином и содержит последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 90% идентичны аминокислотным последовательностям, которые выбраны из группы, состоящей из

- (a) SEQ ID NO: 8 и 9;
- (b) SEQ ID NO: 18 и 19;
- (c) SEQ ID NO: 31 и 32;
- (d) SEQ ID NO: 31 и 33;
- (e) SEQ ID NO: 43 и 44;
- (f) SEQ ID NO: 53 и 54;
- (g) SEQ ID NO: 63 и 64;
- (h) SEQ ID NO: 73 и 74;
- (i) SEQ ID NO: 83 и 84;
- (j) SEQ ID NO: 99 и 100;
- (k) SEQ ID NO: 99 и 101;
- (l) SEQ ID NO: 99 и 102; и
- (m) SEQ ID NO: 113 и 114.

21. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 20, причем переменные участки тяжелой и легкой цепей содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95, 98, 99 или 100% идентичную переменным участкам тяжелой и легкой цепей, выбранным из группы, состоящей из (a)-(m).

22. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с  $\alpha$ -синуклеином и содержит последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или на 100% идентичные аминокислотным последовательностям, которые выбраны из группы, состоящей из

- (n) SEQ ID NO: 10 и 11;
- (o) SEQ ID NO: 20 и 21;
- (p) SEQ ID NO: 34 и 35;
- (q) SEQ ID NO: 34 и 36;
- (r) SEQ ID NO: 45 и 46;
- (s) SEQ ID NO: 55 и 56;
- (t) SEQ ID NO: 65 и 66;
- (u) SEQ ID NO: 75 и 76;
- (v) SEQ ID NO: 85 и 86;
- (w) SEQ ID NO: 103 и 104;
- (x) SEQ ID NO: 103 и 105;
- (y) SEQ ID NO: 103 и 106; и
- (z) SEQ ID NO: 115 и 116.

23. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 123-128 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1), как определено пептидным картированием (например, как описано в примере 1).

24. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 23, причем антитело связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 125-128 человеческого

$\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1), как определено пептидным картированием (например, как описано в примере 1).

25. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов осуществления 1-22, причем антитело связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-139 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1), как определено пептидным картированием (например, как описано в примере 1).

26. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов осуществления 1-22, причем антитело связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 119-126 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1), как определено пептидным картированием (например, как описано в примере 1).

27. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов осуществления 1-22, причем антитело связывается со всеми или с частью аминокислотных остатков в положениях 130-138 человеческого  $\alpha$ -синуклеина (SEQ ID NO: 1), как определено пептидным картированием (например, как описано в примере 1).

28. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело связывается с крысиным и мышинным  $\alpha$ -синуклеином.

29. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело связывается с человеческим  $\beta$ -синуклеином и человеческим  $\gamma$ -синуклеином.

30. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело обладает большей аффинностью к  $\alpha$ -синуклеиновым PFF, чем к  $\alpha$ -синуклеиновым мономерам, что оценивают по коэффициенту связывания  $\alpha$ -синуклеиновый мономер/ $\alpha$ -синуклеиновая PFF (коэффициент связывания мономер:PFF), как определено анализом связывания на основе люминесценции (например, как описано в примере 3).

31. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 30, причем коэффициент связывания мономер:PFF составляет 100 или более, 500 или более, 700 или более, 1500 или более, 3000 или более или 5000 или более.

32. Антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело по варианту осуществления 21.

33. Антитело или его антигенсвязывающая часть, которое конкурирует за связывание с человеческим  $\alpha$ -синуклеином с антителом по варианту осуществления 21.

34. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или их варианта.

35. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 34, причем антитело представляет собой антитело IgG1.

36. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело содержит Fc-область с пониженной или с отсутствующей эффекторной функцией.

37. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 36, причем антитело или его антигенсвязывающая часть содержит Fc IgG1 без эффекторной функции, который содержит следующие мутации: L234A, L235E и G257A.

38. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой химерное, гуманизованное или человеческое антитело.

39. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело модифицировано для снижения иммуногенности у людей.

40. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 39, причем антитело содержит переменные участки тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно.

41. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, которое представляет собой моноклональное антитело.

42. Биспецифичная молекула, содержащая антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, связанная с молекулой, имеющей вторую специфичность связывания.

43. Биспецифичная молекула варианта осуществления 42, причем вторая специфичность связывания увеличивает транспорт молекулы в головной мозг.

44. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменный участок тяжелой и/или легкой цепи антитела, или его антигенсвязывающую часть, или биспецифичное антитело по любому из вариантов осуществления 1-43.

45. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 44.

46. Клетка, трансформированная экспрессионным вектором по варианту осуществления 45.

47. Иммуноконъюгат, содержащий антитело или биспецифичное антитело по любому из вариантов осуществления 1-43, связанное с фрагментом.

48. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 47, причем фрагмент представляет собой связывающий фрагмент, метящий фрагмент, биологически активный фрагмент или терапевтическое средство.

49. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть, биспецифичную молекулу или иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-43, 47 и 48 и фармацевтически приемлемый носитель.

50. Набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающую часть, или биспецифичную молекулу, или иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-43, 47 и 48 и инструкции к применению.

51. Способ получения антитела к  $\alpha$ -синуклеину или его антигенсвязывающей части, включающий экспрессию антитела или его антигенсвязывающей части в клетке по варианту осуществления 46 и выделение антитела или его антигенсвязывающей части из клетки.

52. Способ ингибирования образования нерастворимых агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина в клетке, включающий приведение клетки в контакт с эффективным количеством антитела или антигенсвязывающей части, биспецифичного антитела или иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1-43, 47 и 48.

53. Способ по варианту осуществления 52, причем фосфорилирование серина-129 индуцируется  $\alpha$ -синуклеиновыми олигомерами.

54. Способ по варианту осуществления 53, причем  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры представляют собой предварительно сформированные фибриллы  $\alpha$ -синуклеина.

55. Способ по варианту осуществления 53, причем  $\alpha$ -синуклеиновые олигомеры получают из образцов головного мозга пациентов с синуклеинопатиями.

56. Способ лечения заболевания, характеризующегося наличием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, включающий введение субъекту с заболеванием эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичного антитела или иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1-43, 47 и 48.

57. Способ уменьшения тяжести заболевания, характеризующегося наличием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, включающий введение субъекту с заболеванием эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичного антитела или иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1-43, 47 и 48.

58. Способ задержки прогрессирования заболевания, характеризующегося наличием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, включающий введение субъекту с заболеванием эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичного антитела или иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1-43, 47 и 48.

59. Способ снижения риска развития заболевания, характеризующегося наличием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, включающий введение субъекту, подверженному риску развития заболевания, эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичного антитела или иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1-43, 47 и 48.

60. Способ задержки наступления заболевания, характеризующегося наличием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, включающий введение субъекту, подверженному риску развития заболевания, эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичного антитела или иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1-43, 47 и 48.

61. Способ диагностики заболевания, характеризующегося наличием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина у субъекта, включающий

(a) приведение образца от субъекта в контакт с антителом или его антигенсвязывающей частью, биспецифичным антителом или иммуноконъюгатом по любому из вариантов осуществления 1-43, 47 и 48 таким образом, что образуется комплекс антитело-антиген;

(b) измерение количества образовавшегося комплекса; и

(c) сравнение количества комплекса в образце с количеством в контроле, причем повышенный уровень комплекса в образце относительно контроля указывает на то, что у субъекта имеется заболевание, характеризующееся присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина.

62. Способ по варианту осуществления 61, в котором образец представляет собой спинномозговую жидкость, экстракт тканей головного мозга, мочу или кровь.

63. Способ по любому из вариантов осуществления 56-62, причем заболевание представляет собой болезнь Паркинсона, деменцию при болезни Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, болезнь с тельцами Леви, мультисистемную атрофию или истинно вегетативную недостаточность.

64. Способ по любому из вариантов осуществления 56-63, включающий введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств.

65. Способ выявления  $\alpha$ -синуклеина в образце, включающий приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающей частью, биспецифичным антителом или иммуноконъюгатом по любому из вариантов осуществления 1-43, 47 и 48 в условиях, которые позволяют образовать комплекс между антителом или его антигенсвязывающей частью и  $\alpha$ -синуклеином, и выявление образования ком-

плекса.

Настоящее раскрытие дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не следует рассматривать как дополнительное ограничение. Содержание всех рисунков и всех ссылок, последовательностей Genbank, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в настоящей заявке, специально включено в настоящий документ посредством ссылки. В частности, раскрытия публикаций PCT WO 09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546, WO 09/054863 и PCT/US2013/072918 и публикация патента США № 2011/0150892 специально включены сюда в качестве ссылки.

### Примеры

Коммерчески доступные реактивы, указанные в примерах ниже, использовали в соответствии с инструкциями производителя, если не указано иное. Если не указано иное, в настоящем изобретении используются стандартные процедуры технологии рекомбинантных ДНК, такие как те, которые описаны выше и в следующих учебниках: Sambrook et al., выше; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989); Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Inc.: N.Y., 1990); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988); Gait, *Oligonucleotide Synthesis* (IRL Press: Oxford, 1984); Freshney, *Animal Cell Culture*, 1987; Coligan et al., *Current Protocols in Immunology*, 1991.

Пример 1. Получение антител к альфа-синуклеину (анти- $\alpha$ Syn).

В данном примере описано получение полностью человеческого моноклональных анти- $\alpha$ Syn антител (mAb), которые связываются преимущественно с предварительно сформированными фибриллами (PFF), состоящими из человеческого рекомбинантного  $\alpha$ Syn дикого типа, по сравнению с  $\alpha$ Syn-мономером.

Человеческие анти- $\alpha$ Syn моноклональные антитела были получены в штамме HCo42 трансгенных мышей HuMAb® ("HuMAb" является торговой маркой Medarex, Inc., Принстон, Нью-Джерси) и мышей KM (штамм KM Mouse® содержит трансхромосому SC20 в виде, как описано в публикации PCT WO 02/43478).

Рекомбинантный человеческий  $\alpha$ Syn дикого типа (WT) или мутантный белок  $\alpha$ Syn A53T-PFF и сшитый  $\alpha$ Syn WT или A53T PFF использовали для иммунизации рекомбинантных человеческих трансгенных мышей. Мышей, используемых в Fusion 5448, иммунизировали посредством внутрибрюшинных (IP) и подкожных (SC) инъекций 25 мкг на мышью  $\alpha$ Syn A53T-PFF в адьюванте Райби. Мышей HCo42, используемых в Fusion 5450, иммунизировали IP+Sc+Hock с 25 мкг на мышью смеси (1:1: 1:1)  $\alpha$ Syn WT-PFF,  $\alpha$ Syn A53T-PFF, сшитого  $\alpha$ Syn WT-PFF и сшитого  $\alpha$ Syn A53T-PFF. Исходную смесь антигенов PFF получали путем смешивания 200 мкл каждого 1 мг/мл исходного PFF (WT, A53T и сшитые WT и A53T). Антигены были суспендированы в адьюванте Райби. Мыши, отобранные для слияния и генерации гибридомы, получили дополнительную внутривенную/внутрибрюшинную (IV/IP) инъекцию (бустинг) антигена в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (DPBS) за 3 дня до слияния.

После слияния спленоцитов или лимфатических узлов с клетками P3x63Ag8.653 планшеты после слияния подвергали скринингу на антиген-специфические антитела путем тестирования на наличие человеческих гамма/человеческих каппа mAb. Клетки из планшетов после слияния тестировали на специфичность связывания с  $\alpha$ Syn-PFF или нативными  $\alpha$ Syn-мономерами.  $\alpha$ Syn-PFF-позитивные гибридомы, выбранные из функционального скрининга, субклонировали путем субклонирования отдельных клеток для обеспечения стабильности клеточной линии и моноклональности гибридомы. Каждый субклон снова тестировали с помощью анализа ELISA на антиген-специфичное связывание (т.е. связывание  $\alpha$ Syn-PFF), получая следующие субклоны: 11H11-1, 11H11-2, 15A5, 7A10, 36A3, 44B11 и 21A3. Анализ изотипа показал, что все 6 антител были человеческими IgG1/каппа с использованием ELISA. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности тяжелой и легкой цепей, переменные участки тяжелой и легкой цепей и CDR1-3 тяжелой и легкой цепей представлены в табл. 22.

Переменные участки тяжелой и легкой цепей 7A10 состоят из аминокислотных последовательностей 8 и 9 соответственно. Переменные участки тяжелой и легкой цепей 11H11-1 состоят из аминокислотных последовательностей 28 и 29 соответственно. Переменные участки тяжелой и легкой цепей 11H11-2 состоят из аминокислотных последовательностей 28 и 29 соответственно. Переменные участки тяжелой и легкой цепей 15A5 состоят из аминокислотных последовательностей 38 и 39 соответственно. Переменные участки тяжелой и легкой цепей 21A3 состоят из аминокислотных последовательностей 48 и 49 соответственно. Переменные участки тяжелой и легкой цепей 36A3 состоят из аминокислотных последовательностей 58 и 59 соответственно. Переменные участки тяжелой и легкой цепей 44B11 состоят из аминокислотных последовательностей 68 и 69 соответственно. Переменные участки тяжелой и легкой цепей 2E2 состоят из аминокислотных последовательностей 78 и 79 соответственно. Переменные участки тяжелой и легкой цепей 23H8-1 состоят из аминокислотных последовательностей 94 и 95 соответственно. Переменные участки тяжелой и легкой цепей 23H8-2 состоят из аминокислотных последовательностей 94 и 96 соответственно. Переменные участки тяжелой и легкой цепей 23H8-3 состоят из аминокислотных последовательностей 94 и 97 соответственно. Переменные участки тяжелой и легкой цепей 1E8 состоят из аминокислотных последовательностей 106 и 107 соответственно.

Также были получены версии анти- $\alpha$ Syn антител, описанных выше, без эффекторной функции.

Используемый в настоящем документе термин hIgG1f относится к аллотипу IgG1, имеющему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 117, а hIgG1.3f относится к тройной мутантной версии hIgG1f (L234A, L235E, G237A), в которой отсутствует связывание с Fc-гамма-рецептором и эффекторная функция. hIgG1.3f имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 119.

Пример 2. Эпитопное картирование анти- $\alpha$ Syn антител.

Эпитопсвязывающие сайты анти- $\alpha$ Syn антител, описанных в примере 1, были определены с помощью серии перекрывающихся пептидов  $\alpha$ Syn.

Серия перекрывающихся пептидов с 10-аминокислотной последовательностью  $\alpha$ Syn человека была получена с N-концевой биотиновой группой и линкером PEG4 и C-концевым CONH<sub>2</sub> (табл. 1). Пептиды были растворены в DPBS в концентрации 1 мг/мл. Для исследований картирования 100 мкл 0,25 мкг/мл  $\alpha$ -синуклеиновых пептидов в DPBS добавляли в покрытый NeutrAvidin высокочувствительный 96-луночный планшет (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч (или в течение ночи при 4°C). Планшеты промывали 3 раза ~300 мкл промывочного буфера (0,05% Твин в DPBS). Планшеты затем блокировали 150 мкл 3% BSA (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) в DPBS при комнатной температуре в течение ~2 ч (или в течение ночи при 4°C). 100 мкл тестируемых образцов, разведенных в буфере для образцов (0,1% BSA/0,05% Tween/dPBS, 2 таблетки ингибиторов протеаз -(Roche complete, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) в 50 мл буфера, инкубировали на планшетах при комнатной температуре (RT) в течение 2 ч. Планшеты промывали 3 раза, добавляли 100 мкл вторичного антитела, разведенного 1:1000 в PBSTB (1% BSA/0,2% Tween/DPBS), и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшеты промывали 3 раза в течение от 5 до 10 мин на каждую промывку. Добавляли 100 мкл субстрата AP (Tropix CDP Star Ready-to-Use with Sapphire II, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) и инкубировали при RT в течение 30 мин. Сигналы люминесценции считывали с помощью Perkin Elmer EnVision (2102 Multilabel Reader, PerkinElmer, Waltham, MA). Планшеты выдерживали при постоянном встряхивании (встряхиватель планшетов Titer) во время анализа. В качестве вторичных антител использовали конъюгат ослиного анти-человеческого IgG с щелочной фосфатазой affiniPure, (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), конъюгат ослиного анти-кроличьего IgG с щелочной фосфатазой affiniPure (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), конъюгат ослиного анти-мышинного IgG с щелочной фосфатазой affiniPure (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Все вторичные антитела добавляли до конечной концентрации глицерина, равной 50%.

Первоначальный эксперимент определил, что все антитела распознают эпитопы, расположенные в пределах C-концевого участка в  $\alpha$ Syn. Перекрывающиеся пептиды, показанные в табл. 1, были использованы для дальнейшего уточнения эпитопсвязывающих сайтов каждого антитела.

Эпитопсвязывающие пептиды	
Участок <sup>a</sup> αSyn (а.к.)	Последовательность (SEQ ID NO)
105 - 115	EGAPQEGILED (130)
106 - 116	GAPQEGILEDM (131)
107 - 117	APQEGILEDMP (132)
108 - 118	PQEGILEDMPV (133)
109 - 119	QEGILEDMPVD (134)
110 - 120	EGILEDMPVDP (135)
111 - 121	GILEDMPVDPD (136)
112 - 122	ILEDMPVDPDN (137)
113 - 123	LLEDMPVDPDNE (138)
114 - 124	EDMPVDPDNEA (139)
115 - 125	DMPVDPDNEAY (140)
116 - 126	MPVDPDNEAYE (141)
117 - 127	PVDPDNEAYEM (142)
118 - 128	VDPDNEAYEMP (143)
119 - 129	DPDNEAYEMPS (144)
120 - 130	PDNEAYEMPSE (145)
121 - 131	DNEAYEMPSEE (146)
122 - 132	NEAYEMPSEEG (147)
123 - 133	EAYEMPSEEGY (148)
124 - 134	AYEMPSEEGYQ (149)
125 - 135	YEMPSEEGYQD (150)
126 - 136	EMPSEEGYQDY (151)
127 - 137	MPSEEGYQDYE (152)
128 - 138	PSEEGYQDYEP (153)
129 - 139	SEEGYQDYEP (154)
130 - 140	EEGYQDYEP (155)

<sup>a</sup> Перекрывающиеся пептиды с 10-аминокислотной последовательностью αSyn человека были получены с помощью N-концевой биотиновой группы и линкера PEG4 и C-концевого CONH<sub>2</sub>.

Результаты картирования эпитопа показаны на фиг. 1. Данные показывают, что 7A10, 21A3, 15A5, 36A3 и 1E8 связываются в пределах аминокислот 123-128 в αSyn, что соответствует аминокислотной последовательности EAYEMP (SEQ ID NO: 121);

11H11-1 связывается в пределах аминокислот 125-128 в αSyn, что соответствует аминокислотной последовательности YEMP (SEQ ID NO: 122);

44B11 связывается в пределах аминокислот 130-139 в αSyn, что соответствует аминокислотной последовательности EEGYQDYEP (SEQ ID NO: 124);

2E2 связывается в пределах аминокислот 119-126 в  $\alpha$ Syn, что соответствует аминокислотной последовательности DPDNEAYE (SEQ ID NO: 125);

и 23H8 связывается в пределах аминокислот 130-138 в  $\alpha$ Syn, что соответствует аминокислотной последовательности EEGYQDYEP (SEQ ID NO: 123).

Пример 3. Селективность анти- $\alpha$ Syn-антител для  $\alpha$ Syn-PFF по сравнению с  $\alpha$ Syn-мономерами.

Данный пример демонстрирует, что антитела к  $\alpha$ Syn предпочтительно связываются с  $\alpha$ Syn-PFF по сравнению с  $\alpha$ Syn-мономерами.

Рекомбинантный человеческий  $\alpha$ Syn дикого типа (rPeptide, Bogart, GA) и человеческий  $\alpha$ Syn, содержащий мутацию A53T (rPeptide, Bogart, GA), восстанавливали до 1 мг/мл в 20 мМ Трис/HCl, 100 мМ NaCl, pH 7,4. PFF генерировали с использованием стандартного протокола (Luk et al., PNAS 2007; 106:20051-6). Вкратце мономеры инкубировали в пробирках Eppendorf объемом 2 мл с замком safe-lock (~1 мл/флакон) при 37°C с постоянным встряхиванием (встряхиватель планшетов Titer) в течение 4 дней, а затем центрифугировали при 10000g при RT в течение 20 мин. Осадки ресуспендировали с PBS до конечной концентрации PFF, равной 1 мг/мл.

Фибриллизацию  $\alpha$ Syn контролировали с помощью анализа связывания тιοфлавина Т, денатурирующего (SDS-PAGE) и неденатурирующего (нативного) гель-электрофореза и эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC-HPLC). Для анализа на тιοфлавин-Т образцы разводили до 0,5 мг/мл в PBS и добавляли до равного объема 25 мкМ тιοфлавин-Т. Образцы затем измеряли с использованием прибора Envision multilabel plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA) с длинами волн возбуждения и испускания, установленными на 485 и 535 нм соответственно. Уровни суммарного белка оценивали как с помощью набора для анализа белка Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), так и с помощью анализа imperial protein stain assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Для анализа SDS-PAGE образцы PFF в реагенте-восстановителе NuPAGE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) инкубировали в тепловом блоке (70°C) в течение 10 мин, разделяли с помощью SDS-PAGE (1 мкг/10 мкл/дорожка), используя 4-12% бис-трис-гель (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) с рабочим буфером MES SDS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) при постоянном напряжении 200 В, и затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану (размер пор 0,45 мкм, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) с использованием трис/глицинового буфера (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), содержащего 10% метанола, при постоянном напряжении 50 В, 1,5 ч. Для анализа Native-PAGE образцы PFF разделяли с помощью NativePAGE (1 мкг/10 мкл/полоса), используя 3-12% бис-трис белковый гель (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) с рабочим буфером NativePAGE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) при постоянном напряжении 150 В, и затем переносили на мембрану PVDF (размер пор 0,45 мкм, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), используя буфер для переноса NuPAGE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) при постоянном напряжении 50 В, 1,5 ч. Мембраны из PVDF предварительно обрабатывали метанолом в течение 30 с, дистиллированной H<sub>2</sub>O в течение 2 мин и буфером для переноса в течение 10 мин. Мембраны блокировали 5%-ным обезжиренным сухим молоком (Thermo Fisher Scientific, Waltham) в 0,1% Tween/TBS при RT в течение 2 ч, затем инкубировали с первичным антителом 4B12 (BioLegend, San Diego, CA), разведенным 1:1000 в 1% BSA/0,1% Твин/TBS, при 4°C в течение ночи. Мембраны затем промывали 3 раза (от 5 до 10 мин на каждую промывку) 0,1% Tween/TBS, а затем инкубировали с антимышиным IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, конъюгированный с пероксидазой аффинно очищенный Fab<sub>2</sub>), разведенным 1:10000 в 1% BSA/0,1% Твин/TBS, при RT в течение 1 ч. Затем мембраны промывали 3 раза, как указано выше, и затем инкубировали в течение 5 мин с субстратом SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Детектирование выполняли с использованием прибора GE Amersham imager 600. Для SDS-PAGE были использованы MagicMark™ XP Western Protein Standard (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) и SeeBlue plus 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Для нативных гелей использовали неокрашенный стандарт белка NativeMark (Invitrogen). Промывочный буфер (TBST) состоял из 0,1% Tween-20 в трис-буферном солевом растворе.

Для анализа связывания 96-луночные планшеты (микропланшеты с высоким связыванием) покрывали 100 мкл 1 мкг/мл  $\alpha$ Syn WT PFF в DPBS при RT в течение 2 ч (или в течение ночи при 4°C). Планшеты промывали 3 раза ~300 мкл промывочного буфера (0,05% Твин в DPBS). Планшеты блокировали 150 мкл 3% BSA/DPBS при RT в течение 2 ч (или в течение ночи при 4°C). 3-кратные серийные разведения PFF (начиная с 2 мкг/мл) и мономера  $\alpha$ -syn WT (начиная с 20 мкг/мл) готовили в буфере для образцов (0,1% BSA/0,05% Tween/DPBS, 2 таблетки ингибиторов протеаз (Roche complete, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) в 50 мл буфера). Для инкубации антител равные объемы 2-кратной анализируемой концентрации  $\alpha$ Syn-PFF или мономера смешивали с 2-кратной концентрацией антител для анализа в планшетах с низким связыванием BD falcon и инкубировали при RT в течение ~2 ч. 100 мкл смесей антител и PFF или мономера добавляли в планшеты, покрытые PFF, и инкубировали при RT в течение 10 мин. Планшеты промывали 3 раза. Добавляли 100 мкл ослиного античеловеческого IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, 50% глицерин), разведенного 1:1000 в PBSTB (1% BSA/0,2% Tween/dPBS), и планшеты инкубировали при RT в течение 1 ч. Планшеты промывали 3 раза в течение 5~10 мин на каждую про-

мывку. Добавляли 100 мкл AP-субстрата (Tropix CDP Star Ready-to-Use с Sapphire II, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) и проявляли при RT в течение 30 мин. Подсчет люминесценции производили с помощью прибора Perkin Elmer EnVision (2102 Multilabel Reader, PerkinElmer, Waltham, MA). PFF обрабатывали ультразвуком 15 раз с импульсами продолжительностью 1 с перед нанесением покрытия или смешиванием с антителами. Планшеты выдерживали при постоянном встряхивании (шейкер для планшетов Titer) во время анализа.

Как показано на фиг. 2, антитела к  $\alpha$ Syn оценивали на способность к связыванию с  $\alpha$ Syn-мономером и с WT или A53T  $\alpha$ Syn-PFF. Данные для контрольного антитела 1 также показаны на фиг. 3. Подобное связывание с WT PFF и A53T PFF наблюдалось для всех протестированных антител. За исключением контрольных антител антитела 1 и антитела 2, все шесть антител к  $\alpha$ Syn преимущественно связываются с  $\alpha$ Syn-PFF по сравнению с  $\alpha$ Syn-мономерами, с коэффициентами M/P, составляющими по меньшей мере 500. Сводка данных по связыванию представлена в табл. 2.

Таблица 2

Антитело	Связывание мономера		Связывание PFF		Коэффициент M/P <sup>a</sup>	
	(нМ)	SD	(нМ)	SD	n	n
21A03	291	481	0,16	0,05	1819	4
7A10	+779	694	0,15	0,03	5193	5
15A5	582	795	0,18	0,06	3233	5
36A3	350	224	0,49	0,11	714	6
11H11-1	> 700		1,38	0,41	> 500	5
44B11	> 700		0,41	0,10	> 1700	6
Антитело 1 <sup>b</sup>	0,86	0,11	0,077	0,009	11	19
Антитело 2 <sup>b</sup>	17	1,3	5,18	0,53	3	3

<sup>a</sup> M/P=коэффициент связывания мономер/PFF (более низкий коэффициент означает более высокое предпочтение для PFF).

<sup>b</sup> Антитело 1 и антитело 2 являются контрольными антителами.

Пример 4. Деиммунизация анти- $\alpha$ Syn антител.

В данном примере определено влияние, которое деиммунизация подмножества анти- $\alpha$ Syn антител оказывает на связывание с  $\alpha$ Syn-мономерами и  $\alpha$ Syn-PFF.

Для того чтобы удалить возможные иммуногенные горячие точки посредством гуманизации, последовательности тяжелой и легкой цепей 7A10 анализировали на иммуногенность. Для определения возможных иммуногенных горячих точек был проведен анализ 7A10 на связывание с 27 обычно встречающимися HLA в аллелях мировой популяции и выявление сегментов незародышевой линии.

Связывание с аллелями МНС-II родственного пептида (образующегося как побочный продукт эндоцитоза и деградации биологических компонентов дендритными клетками) с последующим представлением на поверхности дендритных клеток является критическим для адаптивной иммунной реакции. В дополнение к связыванию с аллелями МНС-II, однако, представленный пептид должен быть неаборигенным (несобственным), чтобы рецепторы CD4<sup>+</sup> Т-клеток связывались с ним (распознавание Т-клеток), что приводило бы к активации и Т-клеточной пролиферации. Чтобы смоделировать данные эффекты в вычислительном отношении и смоделировать эффекты различных доноров, антитело сначала разбивают на 15-мерные пептиды, начиная с N-конца и систематически продвигаясь к C-концу по одной аминокислоте за один раз. Каждый из 15-членных пептидов оценивается на

(i) связывание с каждым из 27 обычно встречающихся HLA в мировой популяции; и

(ii) идеальная последовательность соответствует последовательностям зародышевой линии человеческого иммуноглобулина.

В случае идеального соответствия зародышевой линии 15-мерный пептид считается "собственным (self)" и, следовательно, не считается антигенным. С другой стороны, если он определен как "несобственный" (отсутствие идеального соответствия зародышевой линии), он считается потенциально антигенным, если связывается с достаточным сродством с некоторыми из 27 аллелей.

Прогнозы аффинности связывания пептид/МНСII были сделаны с использованием консенсусного

алгоритма анализа ресурсов IEDB (Immune Epitope Database). Прогнозируемые аффинности сообщались в виде процентильных рангов на основе консенсуса пяти различных способов прогнозирования связывания пептида с МНС-II.

Анализ иммуногенности тяжелой и легкой цепей 7A10 показан на фиг. 4. Результаты анализа показывают, что легкая цепь (VK) по прогнозам является в основном неиммуногенной с единственными горячими точками, лежащими в CDR3, который обычно участвует в связывании эпитопа. Тяжелая цепь (V<sub>H</sub>) имеет два участка, показывающие горячие точки, которые распространяются по большим участкам, т.е. CDR2 (остатки 49-65) и FW3-CDR3 (остатки 90-98). Игнорируя горячие точки длиной менее 8 участков, только два участка в цепи V<sub>H</sub> (49-65, 90-98) были рассмотрены с целью снижения риска мутагенеза.

Число под каждой аминокислотой на фиг. 4 обозначает долю аллелей, которые связывают 15-мерный пептид с центром в данной аминокислоте. Например, "5" в Y52 в 7A10\_VH относится к 15-членному пептиду с центром в Y52, т.е. LEWIGYIYYSGRTKY, и означает, что

(i) данный пептид не имеет соответствия зародышевой линии человека (следовательно, несобственный); и

(ii) от 50 до 60% из 27 аллелей показывают высокую аффинность связывания с данным пептидом.

Цифрам присваивается цвет по шкале от светло-серого (наименее вероятного иммуногенного) до темно-серого (наиболее вероятного иммуногенного очага). 3 выделенными жирным шрифтом стрелками показаны позиции для выбора мутантов: R56S, K58N и T93A.

Риск иммуногенности человека оценивали в отношении 7A10 и деиммунизированного 7A10-T93A с использованием анализа пролиферации PBMC человека *in vitro*. Авастин и  $\alpha$ IL-21R mAb использовали в качестве отрицательного и положительного аналитических контролей, поскольку их клиническая иммуногенность положительно коррелирует с результатами анализа иммуногенности *in vitro*. PBMC от здоровых добровольцев выделяли центрифугированием в градиенте Ficoll (GE Healthcare) и человеческий лейкоцитарный антиген (human leukocyte antigen (HLA)) класса II характеризовали с использованием амплификации и гибридизации полимеразной цепной реакции с олигонуклеотидными зондами (ProImmune). Группу из 40 доноров PBMC, состоящая из типов HLA класса II, близко соответствующих частотам мирового населения, использовали для каждого анализа. PBMC метили CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester (карбоксифлуоресцеин-сукцинимидиловый эфир), Invitrogen) для контроля пролиферации и высевали в 96-луночные планшеты в 6 повторах при 200000 клеток на лунку в RPMI (Lonza), содержащей 10% человеческой сыворотки AB (Bioreclamation), несущественные аминокислоты (Gibco) и пенициллин-стрептомицин (Gibco). Антитела к  $\alpha$ -синуклеину и контрольные белки культивировали с PBMC при 1 мкМ в течение 7 дней, после чего среду смывали и клетки, меченные античеловеческим CD4 mAb, подвергали конъюгации с APC (Allophycocyanin (аллофикоцианин), BD Biosciences). После удаления несвязанного анти-CD4 mAb на стадии промывки оставшиеся клетки фиксировали 3,7% формалином (Sigma) в PBS и анализировали проточной цитометрией для определения процента пролиферирующих CD4<sup>+</sup> T-клеток. Донор считается положительным, когда процент пролиферирующих CD4<sup>+</sup> T-клеток для конкретного антитела больше, чем процент пролиферирующих CD4<sup>+</sup> T-клеток только со средой плюс два стандартных отклонения. Данные представлены в виде процента от 40 доноров, для которых был показан положительный сигнал пролиферации.

Процент доноров, демонстрирующих значительный ответ пролиферации T-клеток CD4<sup>+</sup> после инкубации с данными антителами, показан на фиг. 5. 7A10 вызывал пролиферативный ответ у 21 из 40 (52,5%) доноров PBMC и 7A10-T93A показал пролиферативный ответ у 5 из 40 доноров (12,5%).

Пример 5. Связывание деиммунизированных анти- $\alpha$ Syn антител с  $\alpha$ Syn-мономерами и  $\alpha$ Syn PFF.

В данном примере оценивали связывание деиммунизированной версии 7A10, описанной в примере 4, и деиммунизированной версии 21A3, т.е. 21A3-V82L, с  $\alpha$ Syn-мономерами и  $\alpha$ Syn-PFF с использованием анализа ELISA, как описано в примере 3.

Как показано в табл. 3, реверсии 7A10-T93A и 21A3-V82L продемонстрировали эффективности связывания PFF в пределах 2-кратного увеличения эффективности, измеренного для родительских антител; значения связывания мономера были более вариabельными из-за сложности получения точных зависимостей концентрация-ответ для данных относительно слабых эффективностей. Реверсия K58Y-T93A была более чем в 10 раз слабее в отношении связывания PFF по сравнению с родителем 7A10, в то время как эффективности PFF-связывания R56S-T93A и R56S-K58N-T93A были в пределах 2-кратного увеличения эффективности, измеренной для 7A10.

Таблица 3

Антитело <sup>a</sup>	анализируемые концентрации (нг/мл) <sup>b</sup>	Связывание мономера		Связывание		
		SD	PF	SD	PF	n
7A10-Vh-R56S-T93A-hHC-IgG1.3f	30	23	15	0,290	0,099	3
7A10-Vh-K58Y-T93A-hHC-IgG1.3f	10	43	22	2,595	0,285	3
7A10-Vh-R56S-K58N-T93A-IgG1.3f	100	1046	174	0,335	0,035	3
7A10-Vh-T93A-hHC-IgG1.3f	1	3851	661	0,367	0,043	3
21A3-Vh-V82L-hHC-IgG1.3f	1	192	58	0,120	0,005	3
7A10-hIgG1.3f	1	+764	163	0,171	0,009	3
21A3-hIgG1.3f	1	700	0,0	0,073	0,013	3
Антитело 1	1	1,02	0,07	0,067	0,008	3

<sup>a</sup> Данные приведены для Fc инертного человеческого изоотипа IgG1.3, как указано.

<sup>b</sup> Концентрация антитела, необходимая для генерирования приемлемого контрольного сигнала.

Пример 6. Видовая перекрестная реактивность антител к  $\alpha$ Syn с крысиным, мышинным и человеческим  $\alpha$ Syn.

Для того чтобы оценить видовую перекрестную реактивность, антитела к  $\alpha$ Syn были протестированы на связывание с пептидами, представляющими аминокислотные остатки 111-140 крысиного, мышинного и человеческого  $\alpha$ Syn (табл. 4). Последовательности  $\alpha$ Syn в положениях 121-122 различны для человека, крысы и мыши. Анализ связывания проводили, как описано в примере 3.

Таблица 4

Человеческий, крысиный и мышинный $\alpha$ Syn 111-140 пептиды	
Пептид	Последовательность
мышь 111-140	H-RRR GILEDMPVDP GSEAYEMPSE EGYQDYEP EA-NH2
крыса 111-140	H-RRR GILEDMPVDP SSEAYEMPSE EGYQDYEP EA-NH2
человек 111-140	H-RRR GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEP EA-NH2

\* Мышиный 111-140 (SEQ ID NO: 156), крысиный 111-140 (SEQ ID NO: 157), человеческий 111-140 (SEQ ID NO: 158).

Антитела к  $\alpha$ Syn продемонстрировали аналогичное связывание крысиного и мышинного 111-140 пептидов  $\alpha$ Syn по сравнению с соответствующим человеческим пептидом (фиг. 6). Сводка результатов по связыванию пептидов показана в табл. 5. В целом антитела к  $\alpha$ Syn проявляли в 2-3 раза более слабую активность в отношении связывания с 111-140 пептида грызунов по сравнению с соответствующим человеческим пептидом.

Сводка данных по связыванию с пептидами  $\alpha$ Syn 111-140 человека, крысы и мыши

	PFF связывание (нМ)		Мышь 111-140 (нМ)		Крыса 111-140 (нМ)		Человек 111-140 (нМ)	
		SD		SD		SD		SD
36A3	0,416	0,062	8892	2888	8884	3591	3890	1207
15A5	0,144	0,012	9190	3505	8262	3195	3161	1658
44B11	0,389	0,038	93485	39183	78582	37897	75569	43663
11H11-1	2,675	1,196	5752	1708	5706	2338	3398	1149
7A10-Vh-T93A-hNC-IgG1.3f	0,423	0,024	8932	1350	9268	1492	4693	950
21A3-Vh-V82L-hNC-IgG1.3f	0,086	0,007	6656	3133	6413	3057	3702	2951
7A10-hIgG1.3f	0,135	0,020	11393	534	10964	809	4760	521
21A3-hIgG1.3f	0,095	0,016	13782	4139	12251	3248	6496	1939

Пример 7. Перекрестная реактивность анти- $\alpha$ Syn-антител с человеческими  $\alpha$ Syn,  $\beta$ Syn и  $\gamma$ Syn.

В данном примере анти- $\alpha$ Syn антитела были протестированы на связывание и перекрестную реактивность с человеческим  $\beta$ Syn и человеческим  $\gamma$ Syn с использованием анализа ELISA, как описано в примере 3.

Как показано на фиг. 7, антитела не различают человеческий  $\alpha$ Syn,  $\beta$ Syn или  $\gamma$ Syn. Связывание с PFF было включено в качестве положительного контроля.

Пример 8. Биофизическая характеристика анти- $\alpha$ Syn-антител Данный пример описывает характеристику биофизических свойств анти- $\alpha$ Syn антител с использованием различных способов. Результаты анализов термической стабильности, молекулярной массы, pI, гидрофобности суммированы в табл. 6.

Таблица 6

Биофизические свойства				
Способ	Результат	7A10-IgG1f	7A10-IgG1.3f	7A10-T93A-IgG1.3f
Масс-спект	LC			
	Неповрежденная Масса	Подтверждает идентичность	Подтверждает идентичность	Подтверждает идентичность
Масс-спект	HC			
	Неповрежденная Масса	Подтверждает идентичность	Подтверждает идентичность	Подтверждает идентичность
Масс-спект	Профиль гликозилирования	G0F 56%	G0F 48%	G0F 50%
		G1F 39%	G1F 46%	G1F 45%
		G2F 5%	G2F 6%	G2F 5%
Термическая стабильность (DSC)	Tm1	70,2	67,6	66,3
	Tm2	83,3	83,3	83,2
	Tt3	86,6	86,6	87,1
Аналитическая ТРЦ	% HMW	0	0	0
	% LMW	1,4	0	0
iCIEF	pI (измерено)	9,22	9,09	9,09
	% главный	84,9	87,2	84,4
	% кислый	10,7	10,9	12,5
	% основной	4,3	2,0	3,1
Гидрофобность (HIC)	% главный	100	100	100

Для дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) образцы сканировали отрегулировано при 60°C/ч при концентрации 1 мг/мл антитела. Как показано в табл. 6, все антитела 7A10 показали благоприятную стабильность сворачивания.

Идентичность всех трех антител 7A10, показанных в табл. 6, оценивали с помощью интактного масс-спектрометрического (MS) анализа. Для анализа использовали масс-спектрометр ACQUITY UPLC/WatersSynapt G2. Образцы восстанавливали с помощью DTT (100 мМ) при 1 мг/мл. Условия UPLC/MS: инъекция 1 мкг образца в колонку ВЕН С4 RP, частицы размером 2,1×50 мкм, 300 Å, 1,7 мкм при 60°C, градиент 20 мин: от 10 до 38% (подвижная фаза В) в течение 10 мин, расход LC 200 мкл/мин, режим положительных ионов MS. Данный способ также использовали для анализа профиля гликозилирования.

Идентичность всех трех антител 7A10 была подтверждена анализом интактной масс-спектропией (МС), основанным на согласии между измеренными массами и массами, теоретически предсказанными по аминокислотной последовательности. Кроме того, профили гликозилирования были определены и признаны типичными для mAb, гликозилированных по N297.

Затем с помощью iCIEF измеряли однородность заряда в следующих условиях: прибор ProteinSimple iCE3; 1-минутная предварительная фокусировка 1500 В, 10-минутная фокусировка 3000 В, образцы работают с концентрацией 0,2 мг/мл в 0,35% метилцеллюлозе, 2,0 М мочевины, 1% об./об. Pharmalyte 5-8 и 3% об./об. Pharmalyte 8-10,5. pI маркеры 5.8 и 10.10. Табл. 6 показывает измеренные значения pI около 9 и 84-87% в качестве основного пика, с 11-13% кислотными вариантами и основным остатком.

Гомогенность антител также определяли с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), используя следующие условия: колонка Tosoh TSKgel Butyl NPR, подвижная фаза А: 0,1 М фосфат натрия, pH 7,0, 2М сульфат аммония, подвижная фаза В: 0,1 М фосфат натрия pH 7,0, скорость потока: 1,0 мл/мин. Как показано в табл. 6, все три антитела показали 100% в качестве основного пика.

Чтобы оценить, агрегируют ли антитела или усечены, аналитическую SEC проводили в следующих условиях: колонка Shodex K403-4F, буфер=100 мМ фосфат натрия, 150 мМ хлорид натрия, pH 7,3, скорость потока=0,3 мл/мин. Как показано в табл. 6, все версии 7A10 не показали обнаруживаемых HMW видов.

Стабильность 7A10-IgG1f, 7A10-IgG1.3f и 7A10-T93A-IgG1.3f также исследовали в условиях принудительной стабильности, включая высокую концентрацию и высокую температуру. Антитела концентрировали до концентрации более 100 мг/мл в 20 мМ гистидине, 250 мМ сахарозе, pH 6,0 и хранили в течение 4 недель при 4°C. Затем антитела анализировали на увеличение видов HMW или LMW. Как показано в табл. 7, наблюдалось небольшое увеличение в любом типе видов, что указывает на то, что 7A10 обладает очень благоприятной способностью к концентрированию.

Антитела были также диализовали в том же самом гистидиновом буфере при конечной концентрации антитела 10 мг/мл, и инкубировали при 40°C в течение 4 недель, чтобы ускорить любую потенциальную химическую или физическую деградацию. Как показано в табл. 7, не наблюдалось увеличения видов HMW ни для одного из трех исследованных антител 7A10. Появилось небольшое количество видов LMW (от 2,5 до 5%).

Профиль заряда антител также измеряли с помощью CIEF. Антитела показали типичные распределения в основном главного пика, причем кислотные виды являются следующей по размеру популяцией, а основные являются наименьшей по размеру популяцией. Изменения в пропорциях данных заряженных частиц при воздействии 40°C в течение 4-х недель также характерны для антител.

Таблица 7

Принудительная стабильность					
Способ	Результат	7A10-IgG1f	7A10-IgG1.3f	7A10-T93A-IgG1.3f	7A10-T93A-IgG1f
Concentratability	Протестированная концентрация	126 мг/мл	119 мг/мл	140 мг/мл	TBD
	% HMW T = 0	0		0,0	TBD
	% HMW через 4 недели 4 °C	0	0,1	0,1	TBD
	% LMW T = 0	0	0,0	0,0	TBD
	% LMW через 4 недели 4 °C	0	0,0	0,0	TBD
Высокая температура (40 °C)	aSEC ΔHMW	0%	0%	0%	TBD
	aSEC ΔLMW	5%	2,5%	2,5%	TBD
	CIEF основной T = 0	ND	87,2	84,4	TBD
	CIEF основной 4 недели при 40 °C	ND	59,7	55,2	TBD
	CIEF кислый T = 0	ND	10,9	12,5	TBD
	CIEF кислый 4 недели при 40 °C	ND	30,7	34,1	TBD
	CIEF основной T = 0	ND	2,0	3,1	TBD
	CIEF основной 4 недели при 40 °C	ND	9,6	10,7	TBD

Пример 9. Авидность связывания анти- $\alpha$ Syn-антител с предварительно сформированными  $\alpha$ Syn фибриллами.

Данный пример описывает поведение связывания 7A10 с  $\alpha$ Syn с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

На фиг. 8 показан характер связывания с антителом, захваченным на поверхности, и мономерным  $\alpha$ Syn дикого типа в растворе. Данный формат позволяет измерять моновалентную аффинность.  $\alpha$ Syn дикого типа показал очень низкое и слабое связывание. Напротив, когда в качестве аналита в растворе тестировали PFF, наблюдали гораздо большую массу связавшегося  $\alpha$ Syn. Это согласуется с увеличением степени плотности посадки из-за бивалентной avidности многовалентного PFF. Было также испытано контрольное анти-человеческое  $\alpha$ Syn-антитело 1. Как показано на фиг. 8, антитело 1 связывается с мономерным и Pff  $\alpha$ Syn с аналогичной скоростью ассоциации и диссоциации, что позволяет предполагать отсутствие детектируемого усиления связывания с данным антителом, обусловленного бивалентностью/авидностью.

Затем формат анализа SPR был оптимизирован для облегчения оценки avidности связывания. Обратите внимание, что PFF является мультимерным, а 7A10 является нормальным бивалентным моноклональным антителом. Таким образом, данные связывания отражают увеличение аффинности связывания, обусловленное эффектами avidности (см. фиг. 8).

Как показано на фиг. 9, 7A10 и 7A10-T93A связываются с аналогичной avidностью с PFF, иммобилизованными на поверхности (7A10:  $k_a$  (1/Мс): 5,811E+7,  $k_d$  (1/с): 0,009834,  $K_D$ : 1,6692E-10 М; 7A10-T93A:  $k_a$  (1/Мс): 8,946E+7,  $k_d$  (1/с): 0,03873,  $K_D$ : 4,329E-10 М). Кинетика ассоциации для обоих антител была признана очень быстрой. Тем не менее два набора данных были проанализированы с максимально возможной точностью в модели связывания 1:1, чтобы определить, имеется ли заметная разница в avidности в данном формате анализа. На основании подгонки кривой выясняется, что антитела связываются с иммобилизованными на поверхности PFF с avidностями в пределах 4-кратного увеличения.

Пример 10. Индукция блокировки нерастворимого, агрегированного  $\alpha$ Syn анти- $\alpha$ Syn-антителами *in vitro*.

Данный пример описывает способность анти- $\alpha$ Syn-антител *in vitro* блокировать образование внут-

рикеточных, нерастворимых в детергенте, фосфорилированных (pS129)  $\alpha$ Syn-агрегатов, индуцированных PFF или MSA-лизатами головного мозга.

Внутриклеточные нерастворимые в детергенте фосфорилированные (pS129)  $\alpha$ Syn-агрегаты могут быть индуцированы в культивируемых клетках после обработки PFF или MSA-лизатами головного мозга (Prusiner et al., PNAS, 2015, 112:E5308-17; Luk et al., PNAS, 2007, 106:20051-6). Подобная система была разработана с использованием нейронов гиппокампа крысы путем гиперэкспрессии человеческого A53T  $\alpha$ Syn и измерения индукции нерастворимого pS129  $\alpha$ Syn после экспонирования клеток в течение 11 дней либо с PFF, либо с образцами MSA-лизатов головного мозга.

Способы.

а. Приготовление PFF и анализ фибриллизации PFF были приготовлены и проанализированы с использованием способа, описанного в примере 3.

б. Приготовление лизатов человеческого мозга.

Образцы коры головного мозга были получены из Banner Health Research Institute (Sun City, AZ). Ткани головного мозга от пациентов 12-18, 01-03 и 04-51 с диагнозом MSA использовались для экспериментов по иммуноистощению. Образцы головного мозга обрабатывали ультразвуком в отфильтрованном PBS (1 мл PBS/100 мг сырой массы ткани) с помощью прибора KONTES Micro Ultrasonic Cell Disrupter (выход 40, настройка 50) в течение  $2 \times 10$  с. Образцы помещали в пробирки типа Эппендорф объемом 2 мл и пробирки хранили на влажном льду во время обработки ультразвуком. Лизаты мозга центрифугировали при 3000 g, при 4°C в течение 5 мин. Аликвоты надосадочной жидкости замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C. Были выполнены анализы QC, включая анализы ELISA на  $\alpha$ Syn (суммарный и pS129). Для выделения осадков путем высокоскоростного осаждения, гомогенаты мозга, предварительно приготовленные в концентрации 100 мг/мл в PBS, разбавляли в 3 раза до 33,3 мг/мл в охлажденном льдом PBS с последующим центрифугированием при 100000 g в течение 30 мин при 4°C. Надосадочную жидкость удаляли и выбрасывали. Осадок ресуспендировали в ледяном PBS в том же объеме, что и исходный образец.

в. Выделение первичной клеточной культуры.

Первичные нейрональные культуры гиппокампа крыс готовили еженедельно из ~7 л на 19-й эмбриональный день (E19) с использованием системы Papain Dissociation System в соответствии с инструкциями производителя (Worthington Biochemical). Клетки гиппокампа крысы высевали на покрытые PDL 96-луночные планшеты для BD-визуализации (~16 планшетов в неделю) при 30000/луночку в нейрональной культуральной среде, содержащей нейрональную базальную среду (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) и 0,5 mM GlutaMax (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), дополненный 1X B-27 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

д. Иммунопреципитация.

Приготовленный ранее гомогенат головного мозга (100 мг/мл) разводили в 150 раз в полной нейробазальной среде (NBM) (нейробазальная среда, содержащая пенициллин/стрептококк, Glutamax и добавку B-27) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Функцию концентрация-ответ антител к синуклеину тестировали, добавляя тестируемую концентрацию антитела к аликвоте разбавленного гомогената головного мозга. Образец инкубировали при 4°C с инкубацией с переворачиванием в течение 2 ч с последующим добавлением промытой и заблокированной суспензии функционализированных белком A/G агарозных шариков при разведении 1:10 к образцу с инкубацией в течение ночи при 4°C с инкубацией с переворачиванием. Агарозные шарики, функционализированные белком A/G (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), промывали один раз PBS+0,05% Твин-20, промывали 3 раза PBS, затем блокировали в PBS+1% BSA в течение 2 ч при 4°C; 2 объема шариков для каждой стадии; конечная суспензия образца с шариками представляла собой 1:1 PBS:осадок с шариками. После инкубации образцы центрифугировали при 1500 g в течение 2 мин для осаждения шариков. Обедненную надосадочную жидкость удаляли и использовали для обработки в иммунофлуоресцентном анализе.

е. Иммунофлуоресцентный анализ.

В день *in vitro* (day *in vitro* (DIV)) 4 нейроны гиппокампа крыс трансдуцировали аденоассоциированным вирусным вектором AAV1, содержащим кДНК человеческого  $\alpha$ Syn, несущую мутацию A53T (GeneDetect, Bradenton, Florida), при MOI, составляющем 3000. На день DIV7 клетки обрабатывали исследуемыми образцами (6 лунок на обработку). Все обработки были сделаны при помощи обмена половины среды. Каждый планшет содержал отрицательный контроль (без условия обработки), положительный контроль (10 нМ PFF) и контроль с неистощенным индуктором. На DIV18 (11 дней после обработки) клетки фиксировали и окрашивали на нерастворимый  $\alpha$ Syn. Для фиксации в течение 15 мин добавляли раствор, содержащий 4% параформальдегида и 4% сахарозы и 1% тритона. После фиксации клетки трижды промывали промывочным буфером, содержащим DPBS плюс 0,05% твина. Затем клетки блокировали 3% BSA и 0,3% тритоном в DPBS в течение от 1 до 2 ч для блокирования неспецифического сигнала. После стадии блокирования клетки обрабатывали первичным антителом в течение ночи в блокирующем буфере. В качестве первичных антител использовали анти- $\alpha$ Syn и бета-синуклеин (EP1646Y, Millipore/Abcam; Cambridge, UK; моноклональное кроличье антитело к N-концевому фрагменту, разведе-

дение 1:100), анти- $\alpha$ Syn, phospho S129 (81A, Covance/Biolegend, Bogart, GAmouse моноклональное, разведение 1:1000) и анти-MAP2 (ab5392, Abcam; Cambridge, UK; поликлональное куриное, разведение 1:10000). На следующий день планшеты 3 раза промывали DPBS, содержащим 0,05% твина, с последующей 1-часовой инкубацией с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой. В качестве вторичных антител использовали козий антимышиный IgG Alexa Fluor 647, разведение 1:500; Alexa Fluor 488 козий анти-кроличий IgG, разведение 1:500, Alexa Fluor 568 козий анти-куриный IgG, разведение 1:500 и Hoechst, разведение 1:800. Все вторичные антитела были получены от Invitrogen. Затем планшеты промывали 3 раза в течение 15 мин, каждый с DPBS плюс 0,05% твина, с окончательной промывкой только в DPBS.

f. Высокоинформативный иммунофлуоресцентный анализ.

Изображения получали с помощью автоматизированной системы микроскопии и анализа изображений ArayScan™ VTi (Cellomics Inc., Pittsburgh, PA) с объективом  $\times 10$ . Полученные изображения анализировали с помощью пакета программного обеспечения High Content Studio 3.0 (Cellomics, США) с использованием приложения для профилирования нейронов. Клетки были идентифицированы с флуоресценцией Hoechst, которая определяет ядерную область, и нейриты были идентифицированы окрашиванием MAP2. Совокупность клеток идентифицировали наложением ядер и окрашивания MAP2. Суммарный нерастворимый  $\alpha$ Syn и суммарный фосфорилированный по S129  $\alpha$ Syn (pS129) идентифицировали по интенсивности флуоресценции в двух дополнительных каналах. Индукцию определяли количественно по общей интенсивности пятна pS129, колокализованной в нейритах. Величину индукции определяли нормированием относительно среднего значения, полученного для лунок отрицательного контроля. Индекс токсичности рассчитывали путем умножения нормированного числа ядер, нормированного числа нейронов и нормированной длины нейритов, причем каждая лунка была нормирована относительно соответствующих средних значений для лунок отрицательного контроля. Лунки с показателями токсичности ниже 0,6 были исключены из анализа. Значения индукции для каждой тестируемой концентрации антител были нормированы относительно среднего значения для лунок, обработанных неистощенным индуктором. Кривые зависимости концентрации были получены с помощью подгонки способом наименьших квадратов в программе Prism (GraphPad) с использованием уравнения

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(X - \text{LogIC}_{50})})$$

и  $\text{IC}_{50}$ , рассчитанных для каждого эксперимента.

Результаты.

Как показано на фиг. 10A, гиперэкспрессия A53T  $\alpha$ Syn с использованием AAV-hA53T- $\alpha$ Syn приводила к устойчивому увеличению PFF-индуцированного сигнала pS129, как измерено с помощью высокоинформативного иммунофлуоресцентного анализа. Индуцированный PFF сигнал pS129 зависел от дозы и не мог быть вызван различными концентрациями мономера hA53T- $\alpha$ Syn вплоть до 300 нМ (фиг. 10B). Кроме того, обработка 9 различными образцами лизата головного мозга с MSA также индуцировала сигнал pS129 (фиг. 10C); однако индукция не наблюдалась с контрольными лизатами головного мозга (фиг. 10D). PFF-зависимое увеличение сигнала pS129 коррелировало с уменьшением точек ветвления MAP2-позитивных нейронов (фиг. 10E). Индуцирующую активность в лизатах MSA можно выделить с помощью высокоскоростного центрифугирования (фиг. 10F), что позволяет предположить, что индуктор в данных образцах представляет собой агрегат с высокой молекулярной массой. Кроме того, зависящее от времени увеличение сигнала pS129 наблюдалось после обработки MSA-осадком (7-дневная инкубация:  $0,22 \pm 0,06$  10 нМ PFF,  $n=6$ ; 14-дневная инкубация:  $0,32 \pm 0,05$  10-нм PFF,  $n=6$ ; 18-дневная инкубация:  $0,52 \pm 0,08$  для 10 нМ PFF,  $n=6$ ) (фиг. 10G). Наконец, подобно индуцированной патологии, наблюдаемой с hA53T- $\alpha$ Syn-PFF, также наблюдалось уменьшение точек ветвления после обработки образцами лизата головного мозга MSA (10 нМ PFF:  $0,50 \pm 0,16$ ,  $n=4300$ ; MSA:  $0,58 \pm 0,17$ ,  $n=1842$ ; фиг. 10H).

Затем высокоинформативный анализ был использован для оценки способности различных антител  $\alpha$ Syn к иммуноистощению индуцирующей активности (т.е. PFF-индуцированного фосфорилирования S129) из PFF-образцов и образцов лизата головного мозга с MSA. Были протестированы лизаты, полученные от 3 разных пациентов с MSA, 12-18, 01-03, 04-51. Для иммуноистощения образцы инкубировали в течение ночи с антителами в определенном диапазоне концентраций. Иммунокомплексы затем удаляли и истощенные образцы инкубировали с нейронными культурами в течение 11 дней. Индукцию измеряли по интенсивности pS129, нормированной относительно среднего значения для неистощенных контрольных лунок. Служащие примерами кривые концентрация-ответ для иммуноистощения с эталонным анти- $\alpha$ Syn антителом 1 показаны на фиг. 11, и данные по  $\text{IC}_{50}$  суммированы в табл. 8-11. Антитело 1 демонстрировало сильное и полное истощение индуктора как из PFF, так и MSA-лизатов головного мозга. Данные результаты подтверждают, что индуцирующая активность в MSA-лизате зависит от  $\alpha$ Syn. Антитело 1 обладало большей эффективностью в снижении индуцирующей активности у PFF (0,032 нМ, табл. 8) по сравнению с MSA-лизатами (5,47, 2,48 и 0,43 нМ, табл. 9-11), что позволяет предположить, что могут быть различия в уровнях или конформации данных индуцирующих видов.

Затем, антитела 7A10, 21A3, 36A3, 15A5, 11H11-1 и 44B11 тестировали на иммуноистощение индуцирующей активности от PFF и лизатов головного мозга с MSA. Служащие примерами кривые концен-

трация-ответ для 7A10, 21A3, 36A3, 15A5, 11H11-1 и 44B11 показаны на фиг. 12-17 соответственно. Сводка средних значений  $IC_{50}$  для PFF, MSA 12-18, MSA 01-03, MSA 04-51 приведена в табл. 8-11 соответственно. Подобно антителу 1, все 6 антител истощали индуцирующую активность PFF в зависимости от концентрации (фиг. 12-17). Средние значения  $IC_{50}$  варьировали от 0,018 до 0,066 нМ и достоверно не отличались от  $IC_{50}$  для антитела 1 (табл. 8). Все 6 антител также полностью истощали MSA-лизаты в зависимости от концентрации; однако в отличие от результатов с PFF некоторые антитела были значительно более сильнодействующими, чем антитело 1 (табл. 9-11). Например, 7A10 было значительно активнее, чем антитело 1, в отношении истощения индуцирующей активности всех 3 лизатов MSA: 7A10 было в 14 раз активнее, чем антитело 1, в отношении истощения MSA 12-18 ( $p < 0,001$ , табл. 9), в 9 раз в отношении MSA 01-03 ( $p < 0,05$ , табл. 10) и в 12 раз в отношении MSA 04-51 ( $p < 0,01$ , табл. 11). Аналогично 21A3 было в 34 раза активнее, чем антитело 1, в отношении MSA 12-18 ( $p < 0,01$ , табл. 9), в 7 раз в отношении MSA 01-03 (незначительно, табл. 10) и в 10 раз в отношении MSA 04-51 ( $p < 0,01$ ). Родственные антитела 15A5 и 36A3 демонстрировали сходные тенденции (табл. 9-11). 11H11-1 продемонстрировало менее выраженные различия в эффективности по сравнению с антителом 1 (табл. 9-11). 44B11, которое связывает отчетливый эпитоп, было в 3 раза активнее, чем 9E4, в отношении иммуноистощения лизата MSA 12-18 ( $p < 0,05$ , табл. 9) и равносильно антителу 1 в отношении истощения лизата MSA 01-03 (табл. 10) и лизата MSA 04-51 (табл. 11). Наблюдаемые относительные различия в эффективности могут быть связаны с различиями в конформации или деформации индуктора, которые влияют на экспонирование или доступность эпитопов антител.

Таблица 8

Сводка данных по PFF $IC_{50}$				
Антитело	$IC_{50}$ (нМ) <sup>a</sup>	Std	N	Кратность относительно антитела 1
Антитело 1	0,032	0,049	10	
7A10	0,018	0,003	3	1,8
44B11	0,028	0,011	3	1,1
15A5	0,042	0,010	3	0,8
36A3	0,057	0,018	5	0,6
21A3	0,061	0,016	3	0,5
11H11-1	0,066	0,029	3	0,5

<sup>a</sup> Статистика относительно антитела 1 и основанная на парном t-тесте. ns:  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Результаты t-теста являются ns, если не указано иное.

Таблица 9

Сводка данных $IC_{50}$ для MSA-лизата 12-18				
Антитело	$IC_{50}$ (нМ) <sup>a</sup>	Std	N	Кратность относительно антитела 1
Антитело 1	5,47	6,76	25	
21A3	0,16**	0,11	10	34,1
7A10	0,39***	0,57	13	14,2
15A5	0,61*	0,44	10	8,9
36A3	0,63***	0,62	13	8,7
11H11-1	0,76*	0,67	6	7,2
44B11	2,21*	2,70	10	2,5

<sup>a</sup> Статистика относительно антитела 1 и основанная на парном t-тесте. ns:  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Результаты t-теста являются ns, если не указано иное.

Таблица 10

Сводка данных IC<sub>50</sub> для MSA-лизата 01-03

Антитело	IC <sub>50</sub> (нМ) <sup>a</sup>	Std	N	Кратность относительно антитела 1
Антитело 1	2,48	1,68	9	
7A10	0,28*	0,27	6	8,8
21A3	0,37	0,31	6	6,7
36A3	0,55	0,42	7	4,5
15A5	0,59*	0,60	6	4,2
11Н1-1	2,60	2,07	6	1,0
44В11	2,70	2,06	6	0,9

<sup>a</sup> Статистика относительно антитела 1 и основанная на парном t-тесте.

ns: p>0.05; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

Результаты t-теста являются ns, если не указано иное.

Таблица 11

Сводка данных IC<sub>50</sub> для MSA-лизата 04-51

Антитело	IC <sub>50</sub> (нМ) <sup>a</sup>	Std	N	Кратность относительно антитела 1
Антитело 1	0,43	0,24	8	
7A10	0,04**	0,01	6	12,0
21A3	0,05***	0,02	6	9,5
15A5	0,12**	0,11	6	3,6
11Н1-1	0,15*	0,13	6	2,9
36A3	0,17*	0,08	6	2,5
44В11	0,41	0,10	6	1,1

<sup>a</sup> Статистика относительно антитела 1 и основанная на парном t-тесте.

ns: p>0.05; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

Результаты t-теста являются ns, если не указано иное.

Деиммунизированные варианты 7A10 и 21A3 также были протестированы на иммуноистощение экстракта MSA 12-18 для оценки влияния модификаций аминокислот на активность антител. Как показано в табл. 12, 7A10-T93A проявляет аналогичную эффективность в отношении истощения индуцирующей активности от MSA 12-18 (0,66 нМ) по сравнению с родительским антителом 7A10 (0,52 нМ); напротив, другие варианты 7A10 были в 10-100 раз слабее, чем родительское антитело 7A10. Вариант V21L 21A3 проявлял активность, аналогичную активности родительского антитела 21A3 (табл. 12). Взятые вместе данные результаты дают основание предполагать, что модификации в 7A10-T93A и 21A3-V82L не влияют на общую активность антител.

Таблица 12

Сводка данных IC <sub>50</sub> с MSA-лизатом 12-18			
Антитело	IC <sub>50</sub> (нМ) <sup>a</sup>	Std	N
7A10 hIgG1.3f (родительское)	0,52	0,28	3
7A10-Vh-T93A-IgG1.3f	0,66	0,53	3
7A10 Vh-R56S-T93A-hIgG1.3f	9,00	3.15	3
7A10-Vh-K58Y-T93A-IgG1.3f	4,65	2,62	2
7A10-Vh-R56S-K58N-T93A-IgG1.3f	51,05	38,54	2
21A3-hIgG1.3f (родительское)	0,19	0,22	3
21A3-Vh-V82L-IgG1.3f	0,11	0,03	3

<sup>a</sup> Статистика относительно антитела 1 и основанная на парном t-тесте.

ns: p>0.05; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

Результаты t-теста являются ns, если не указано иное

В заключение 7A10, 21A3, 36A3, 15A5, 11H11-1 и 44B11 продемонстрировали сильное и полное истощение индуцирующей агрегаты активности у PFF и 3 различных лизатов MSA. Данные результаты в сочетании с результатами предыдущих примеров показывают, что антитела преимущественно связываются с формой  $\alpha$ Syn, найденной в данных экстрактах головного мозга с заболеванием, которое может нести ответственность за распространение патологии и, таким образом, могут быть эффективными в блокировании передачи  $\alpha$ Syn-патологии *in vivo*.

Пример 11. Блокирование  $\alpha$ Syn патологии анти- $\alpha$ Syn-антителами *in vivo*.

Данный пример описывает способность антител к  $\alpha$ Syn ингибировать распространение и передачу  $\alpha$ Syn-патологии в мышинной модели.

Способы.

а. Мыши.

Мыши, использованные в исследовании, представляли собой 2-3-месячных самцов и самок [PAC-Tg(SNCA<sup>A53T</sup>)<sup>+/-</sup>; Sncs<sup>-/-</sup>] (PAC-A53T) мышей, несущих человеческую мутацию A53T на фоне нокаута Sncs мыши (Kuo et al., Human Molecular Genetics, 2010, 19:1633-50), которых использовали для исследований эффективности *in vivo*. Мышей содержали в группах по четыре особи в клетках с контролируемой температурой, причем пища и вода были доступны *ad-libitum* (по потребности).

б. Обработка антителами и стереотаксическая хирургия.

Приблизительно 40 мкл крови собирали от подгруппы самцов и самок мышей PAC-A53T из ретроорбитального синуса, чтобы установить исходный уровень для уровней антитела и антитела к лекарственному средству (anti-drug-antibody (ADA)). Вся когорта мышей была разделена на две группы: контрольная и лечебная группы. Мышам в контрольной группе вводили внутривенную (ip) инъекцию физиологического раствора перед инъекцией PBS в стриатум и 4 дополнительные еженедельные инъекции физиологического раствора до завершения эксперимента (n=8). Вторую группу мышей разделили на 9 групп дополнительного лечения: физиологический раствор (n=11), антитело 1 (n=12), 7A10 (n=12), 11H11 (n=12), 15A5 (n=11), 21A3 (n=11), 36A3 (n=11), 44B11 (n=12) и антитело 3 (n=5). Всех мышей во второй группе инокулировали рекомбинантными A53T-PFF после первой ip дозы физиологического раствора или выбранного антитела. Как и в контрольной группе, лечебные группы получали 4 дополнительные еженедельные ip инъекции физиологического раствора или выбранного антитела. Доза антитела во всех группах лечения составляла 10 мг/кг. Выбор дозы антитела основывался на результатах исследования I, где антитело 3 эффективно уменьшало патологию pSer129 у мышей PAC-A53T. Еженедельной обработке антителами предшествовал забор крови из ретроорбитального синуса у подгруппы мышей для оценки фармакокинетики (PK) и возможных уровней ADA во всех группах лечения. Мышей умерщвляли через 30 дней после инокуляции A53T-PFF и через 24 ч после последней обработки антителами.

Стереотаксические инъекции.

Для односторонних стриатальных инъекций мышей анестезировали ингаляцией изофлюраном (1-4%) и помещали в стереотаксическую рамку с прикрепленным носовым конусом для поддержания индуцированной изофлюраном анестезии в течение всей процедуры. Хирургическое место было подготовлено с использованием бетадина, за которым следовал 70% изопропиловый спирт, и был сделан разрез кожи на 1-2 см, чтобы обнажить череп и контрольные точки ориентира. Стерильные ватные тампоны использовались, чтобы аккуратно очистить череп. Для сверления отверстия на глубине 0,5-1 мм через поверхность черепа использовали сверло из стерильного карбида. Мышам вводили унилатерально 10 мкг A53T-PFF или PBS (контрольная группа) в боковой стриатум (AP 0.2, ML -2.0, DV -3.6). Материал вводили с помощью шприца Гамильтона со скоростью 0,25 мкл/мин (всего 2,5 мкл на мышью) с иглой, оставав-

шейся в течение  $\geq 10$  мин в мишени. Мышей перевели в их клетку, как только они полностью оправились после операции.

с. Иммуногистохимия (ИНС).

Мышей умерщвляли для оценки патологии через 30 дней после инъекций A53T-PFF. Для гистологических исследований мозг фиксировали в 4% параформальдегиде (PFA) в течение 48 ч, затем в течение 24 ч в 15% сахарозе и затем в течение 48 ч (или до использования) в 30% растворе сахарозы. Корональные толщиной 40 мкм серийные срезы головного мозга готовили на скользящем микротоме (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL) и помещали в криопротектор до анализа ИНС. Процедура ИНС включала следующие стадии: срезы головного мозга помещали в чашки для окрашивания и промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 3 раза (5 мин/полоскание). Затем срезы постфиксировали в течение 10 мин в 3,7% формальдегиде (в PBS). Затем их дважды промывали в PBS (10 мин/полоскание). Затем срезы инкубировали в свежем 3%  $H_2O_2$ , 10% метаноле в PBS в течение 30 мин, чтобы избавиться от активности эндогенной пероксидазы. Срезы промывали 3 раза в PBS (10 мин/полоскание), после чего следовала стадия блокирования в течение одного часа в 10% нормальной сыворотке (с использованием сыворотки от видов вторичного антитела) плюс 0,3% Triton X-100 в PBS при комнатной температуре. Затем срезы промывали 3 раза в PBS (10 мин/полоскание). Срезы головного мозга инкубировали в течение ночи в первичном антителе [Anti-alpha-syn pSer129 (Abcam, Cambridge, UK; ab51253) в разведении 1:100000] при 4°C на шейкере для микротитрования на планшете со скоростью для аккуратного, но равномерного перемешивания срезов. На второй день ИНС срезы головного мозга промывали 4 раза в PBS (10 мин/полоскание) и затем инкубировали в биотинилированном 2-м антителе (1:500 козье анти-кроличье в PBS, Vector BA-1000) в течение 60 мин. Затем срезы промывали в PBS (4 раза, 10 мин/полоскание) и затем инкубировали в комплексе ABC, приготовленном в PBS, в течение 60 мин при RT (набор Elite ABC, Vector laboratories, Burlingame, CA). После промывания в PBS (4 раза, 10 мин/полоскание) срезы инкубировали в течение 10 мин в субстрате пероксидазы (Vector Cat. #SK-4100, Vector laboratories, Burlingame, CA). Наконец, срезы головного мозга промывали в PBS (4 раза, 10 мин/полоскание) и помещали на предметное стекло Superfrost Plus Micro Slides (VWR, Randor, PA). Предметные стекла высушивали на воздухе и затем контрастировали в растворах гематоксилина и подсинивающего реагента (вода Скотта) с последующими сериями полосканий в этаноле. В заключение предметные стекла покрывали покровным стеклом, используя Permount и микро-покрывное стекло (VWR, Randor, PA), и давали высохнуть для сканирования и количественного анализа ИНС.

Количественная оценка ИНС.

Изображения срезов головного мозга, помещенных на стеклянные предметные стекла, были получены с помощью сканеров предметных стекол Aperio AT2. Изображения на всех предметных стеклах в каждом исследовании были получены с использованием одинаковой мощности освещения и экспозиции камеры. Приблизительно 2 предметных стекла от каждого животного были проанализированы, каждое с ~20 установленными корональными срезами головного мозга. После получения изображения срезы головного мозга, содержащие представляющий интерес участок (region of interests (ROI)),

а) первичная кора головного мозга вместе с областью Cingulate Gyrus (поясной извилины) (интераурально 5,48-2,96 мм, брегма 1,69-0,83 мм, от 6 до 10 срезов); и

б) участки мозжечковой миндалины (интераурально 2,72-1,76 мм, брегма 1,07-2,03 мм, от 4 до 6 срезов) были идентифицированы для каждого животного с использованием программного обеспечения для анализа изображений HALO.

ROI был обозначен для общей площади, занятой окрашиванием pS129 на ипсилатеральной стороне (сторона инъекции) и соответствующей противоположной стороне для обоих участков. Среднее окрашивание по всем обозначенным как ROI срезам для каждого животного затем определяли количественно с использованием Algorithm (Indica Labs) - Area Quantification. Все изображения были проанализированы одновременно с использованием идентичных настроек порогов для определения положительно окрашенных участков. Были проанализированы площадь ткани ( $мкм^2$ ), общая площадь окраски ( $мкм^2$ ), площадь слабой окраски и площадь сильной окраски ( $мкм^2$ ), % положительно окрашенной ткани, % слабо окрашенной ткани и % сильно окрашенной ткани. ONE Way ANOVA с последующим пост-тестом Даннетта использовали для определения эффектов лечения.

d. Измерение уровня антител в плазме крови и мозге.

Предназначенные для ELISA планшеты (Costar 3925) покрывали 100 мкл 1 мкг/мл PFF (полученного из  $\alpha$ -синуклеина WT, PROTEOS), разведенного в PBS (GIBCO Cat #14190) в течение 2 ч при комнатной температуре (RT). PFF обрабатывали ультразвуком 15 с с паузой каждую секунду перед нанесением покрытия. Планшеты промывали четыре раза 0,05% Твином в PBS Дульбекко (Life Technologies, #14040-117) и блокировали 150 мкл 3% BSA (бычий сывороточный альбумин, не содержащий протеазы, фракция V, Roch Diagnostic #03117332001) в DPBS в течение 2-3 ч при RT или в течение ночи при 4°C. Стандарты, образцы плазмы крови и головного мозга разводили в 1% BSA/0,05% Tween/DPBS, содержащем ингибитор протеазы Roche (Roche 11836145001, 1 таблетка/25 мл). Образцы (3-4 разведения) по 100 мкл/лунку загрузили в двух экземплярах и инкубировали в течение ~2 ч при RT. После того как планшеты были

промыты четыре раза 0,05% Tween/DPBS, 100 мкл вторичных антител (конъюгат ослиного анти-человеческого IgG с щелочной фосфатазой Affinipure, фирма JacksonImmuno #709-055-149, с 50% глицерина) 1:1000, разведенный в 1% BSA/0,2% Твин/DPBS добавляли и инкубировали в течение 1 ч при RT. После четырех промывок планшеты инкубировали с 100 мкл субстрата щелочной фосфатазы (Tropix CDP Star Ready-to-Use with Sapphire II, T-2214, Life Technologies) в течение 30 мин. Сигналы люминесценции измеряли с помощью прибора Perkin Elmer EnVision (2102 Multilabel Reader). Во время анализа планшеты постоянно встряхивали (шейкер для планшетов Titer, скорость 3).

е. Измерение антител к лекарственным средствам (anti-drug antibodies (ADA)).

Неколичественный анализ иммуногенности был разработан для того, чтобы обнаружить возможное развитие антитела 1, антитела к 7A10, антитела к 11AH11, антитела к 15A5, антитела к 21A3, антитела к 36A3, антитела к 44B11, и Антитела 3 у мышей, получавших антитело 1, 7A10, 11H11, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11 и антитело 3. В данном иммуноферментном анализе антитело 1, 7A10, 11H11, 15A5, 21A3, 36A3, 44B11 и антитело 3 были нанесены на 96-луночный планшет с плоским дном Maxisorp в течение ночи при 4°C. Образцы сыворотки, разведенные в соотношении 1:100, инкубировали в течение ночи при RT для захвата потенциальных антител к лекарственным средствам (ADA). Захваченные антитела выявляли с использованием конъюгированного с ферментом пероксидазой хрена (HRP) козьего антитела против мышинового иммуноглобулина G (IgG) и иммуноглобулина M (IgM). В качестве положительного контроля использовали козье антитело против человеческого иммуноглобулина G (IgG) и иммуноглобулина M (IgM), конъюгированное с ферментом пероксидазы хрена (HRP). В качестве колориметрического субстрата для HRP был добавлен тетраметилбензидин (ТМБ), который производит оптическую плотность (OD<sub>450</sub>) пропорционально к количеству антитела 1, антитела к 7A10, антитела к 11AH11, антитела к 15A5, антитела к 21A3, антитела к 36A3, антитела к 44B11, и антитела 3, присутствующего в образцах сыворотки.

ф. Измерение уровней  $\alpha$ Syn в ткани головного мозга.

Вкратце планшеты для ELISA (Costar 3925) покрывали 100 мкл соответствующих захватывающих антител, разведенных в ВирН карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,4 (Thermo Fisher Scientific # 28382) в течение ночи при 4°C. Захватывающее антитело MJFR1 (Abcam ab138501) использовали в концентрации 0,1 мкг/мл (анализ на суммарный  $\alpha$ -синуклеин) или 0,35 мкг/мл (анализ на pS129), MJFR14-6-4-2 (Abcam ab209538) при 0,1 мкг/мл и 1E8 (BMS 5446.1E8.10) при 0,3 мкг/мл. Планшеты промывали четыре раза PBS Дульбекко (Thermo Fisher Scientific, #14040-117) и блокировали 3% BSA (бычий сывороточный альбумин, не содержащий протеаз, фракция V, Thermo Fisher Scientific) в DPBS в течение 2-3 ч при комнатной температуре (RT) или в течение ночи при 4°C. Стандарты, образцы головного мозга и образцы QC разбавляли 1% BSA/0,05% Tween/DPBS, содержащим ингибитор протеазы Roche (Thermo Fisher Scientific, 1 таблетка/25 мл) и ингибитор фосфатазы 2 и 3 (Sigma Aldrich, P5726 & P0044, 1:100). Стандартами являются  $\alpha$ -синуклеин WT (rPeptide S-1001), pS129 (aa89-140, AATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMP-pS-EEGYQDYEPANNNNNH-CONH<sub>2</sub>; SEQ ID NO: 129) или PFF (полученные из  $\alpha$ -синуклеина WT, PROTEOS). Образцы объемом 50 мкл/лунку загружали в двух экземплярах и инкубировали в течение ночи при 4°C. После уравнивания планшетов до комнатной температуры добавляли 50 мкл детектирующих антител в соотношении 1:4000, разведенных в 1% BSA/0,1% Твин/DPBS, и совместно инкубировали с образцами при RT в течение ~2 ч. Детектирующие антитела (4B12 от BioLegend SIG39730, MBR13 от Abcam ab168381, 2E2 и 23H8) были предварительно конъюгированы с щелочной фосфатазой (набор AP от Novus Biologicals #702-0010). Затем планшеты четыре раза промывали 0,05% Tween/PBS и обрабатывали 100 мкл субстрата щелочной фосфатазы (Tropix CDP Star Ready-to-Use with Sapphire II, T-2214, Thermo Fisher Scientific) в течение 30 мин. Подсчет люминесценции проводили с помощью прибора Perkin Elmer EnVision (2102 Multilabel Reader). Планшеты постоянно встряхивали (шейкер для планшетов Titer, скорость 3) во время анализа.

Результаты.

Мышам, инокулированным PFF, еженедельно вводили внутрибрюшинно (IP)-инъекцию с PBS в течение 4 недель (n=11) или с антителом 1 (n=12), 7A10 (n=12), 11AH11 (n=12), 15A5 (n=11), 21A3 (n=11), 36A3 (n=11), 44B11 (n=12) и антителом 3 (n=5). Мышам, инокулированным PBS, вводили внутрибрюшинно инъекцию PBS (n=8) в качестве отрицательного контроля. Все антитела были дозированы в дозе 10 мг/кг. Еженедельной обработке антителами предшествовали заборы крови из ретроорбитального синуса в подгруппе мышей для оценки фармакокинетики (PK) и возможных уровней ADA. Мышей умерщвляли через 30 дней после инокуляции и через 24 ч после последней обработки антителами. Уровни антител были измерены в ткани головного мозга от подгруппы мышей. Патологию pS129  $\alpha$ Syn измеряли в отдельных участках головного мозга с помощью иммуногистохимии.

Экспозиции антител в плазме суммированы на фиг. 18. Экспозиции в плазме варьировали в ~100 раз у различных антител и варьировали от 1 до 100 мкг/мл. Низкая экспозиция некоторых антител (например, 21A3 и антитела 1), вероятно, была вызвана ADA. Плазменные концентрации контрольного антитела антитела 3 были сходны с уровнями, наблюдаемыми в первом исследовании лечения. Уровни антител в экстрактах тканей головного мозга показаны на фиг. 19. Экспозиции в головном мозге варьи-

ровали в ~10 раз у различных антител и варьировали от ~25 до 250 нг/мл. Подобные уровни антител наблюдались в полушариях головного мозга ипсилатерально и контралатерально к месту инъекции. ADA измеряли в образцах плазмы (табл. 13 и 14). АДА наблюдались у некоторых животных для антитела 3 (n=3), антитела 1 (n=6), 7A10 (n=1), 21A3 (n=7), 15A5 (n=1), 36A3 (n=1) и 44B11 (n=1). ADA не наблюдалось с антителом 11H11-1. Более низкие уровни антител в плазме были связаны с ADA для обработанных антителом 1 и 21A3 (фиг. 20). Напротив, уровни антител в плазме не были неблагоприятно затронуты присутствием ADA для антитела 3, 7A10, 15A5 и 44B11.

Таблица 13

Активность антител к лекарственным средствам в образцах плазмы<sup>a</sup>

7A10 ID # <sup>b</sup>	15A5 ID #	21A3 ID #	36A3 ID #	44B11 ID #
wk4-44	0,230	wk4-57 0,497	wk4-71 0,663	wk2-88 0,429
			wk4-72 0,827	wk2-102 0,487
			wk4-73 4,000	wk3-102 0,764
			wk4-77 0,574	wk4-102 1,410
			wk4-78 3,667	
			wk3-78 0,743	
			wk4-78 3,667	
			wk2-79 0,207	
			wk3-79 3,010	
			wk4-79 4,000	
			wk3-80 0,220	
Отсечка <sup>d</sup>	0,186	0,255	0,187	0,241
				0,257

<sup>a</sup> Показаны только образцы со значительной активностью ADA. ADA не наблюдалась для 11H11-1.

<sup>b</sup> Идентификационный номер указывает на неделю сбора образцов (wk1, wk2, wk3 или wk4) и идентификационный номер животного.

<sup>c</sup> Измерение оптической плотности колориметрического субстрата при 450 нм.

<sup>d</sup> Отсечка основана на 2-кратном среднем OD контрольных образцов с носителем.

Значения OD выше предела отсечки считаются значительными. Показаны предельные значения, рассчитанные для каждого анализируемого планшета.

Таблица 14

Активность антител к лекарственным средствам для контрольных антител антитела 1 и антитела 3

Антитело 3 ID # <sup>b</sup>	OD <sup>c</sup>	Антитело 1 ID #	OD
wk1-105	2,099	wk1-22	0,234
wk2-105	0,435	wk4-22	0,522
wk3-105	2,051	wk1-24	0,298
wk4-105	2,854	wk4-24	2,712
wk4-106	0,524	wk1-25	0,382
wk4-108	0,277	wk4-25	3,658
		wk4-26	3,410
		wk2-31	0,371
		wk3-31	2,715
		wk4-31	3,553
		wk3-32	0,372
		wk4-32	2,298
Отсечка <sup>d</sup>	0,196		0,216

<sup>a</sup> Показаны только образцы со значительной активностью ADA.

<sup>b</sup> Идентификационный номер указывает на неделю сбора образцов (wk1, wk2, wk3 или wk4) и идентификационный номер животного.

<sup>c</sup> Измерение оптической плотности колориметрического субстрата при 450 нм.

<sup>d</sup> Отсечка основана на 2-кратном среднем OD контрольных образцов с носителем.

Значения OD выше предела отсечки считаются значительными. Показаны предельные значения, рассчитанные для каждого анализируемого планшета.

Чтобы оценить влияние пассивной иммунизации на передачу и распространение патологии,  $\alpha$ Syn pS129 измеряли в моторной коре и миндалях иммуногистохимией. Репрезентативные изображения показаны на фиг. 21, и суммарные графические данные показаны на фиг. 22. Мыши PAC, которым инъекцировали A53T-PFF, продемонстрировали значительное увеличение патологии pS129 как в моторной коре (односторонний ANOVA,  $p < 0,05$ ), так и в миндалях (односторонний ANOVA,  $p < 0,001$ ) по сравнению с контролями PBS (фиг. 22). Пассивная иммунизация контрольным антителом антителом 3 привела к значительному уменьшению патологии в ипсилатеральной миндалине (односторонний ANOVA,  $p < 0,001$ ) и тенденции к снижению патологии в ипсилатеральной моторной коре. В дополнение к антителу 3, другими антителами со значительным снижением патологии в миндалях были 7A10 ( $p < 0,01$ ), 11H11-1 ( $p < 0,001$ ), 15A5 ( $p < 0,01$ ), 21A3 ( $p < 0,05$ ), 36A3 ( $p < 0,01$ ) и 44B11 ( $p < 0,05$ ). Только антитело 1 не обнаружило значительного уменьшения патологии в миндалях. В моторной коре только 44B11 показало значительное снижение патологии ( $p < 0,05$ ), в то время как другие антитела показали тенденцию к снижению. Отсутствие значительных эффектов в моторной коре, вероятно, связано с наблюдаемой переменной PFF-индуцированной индукцией.

Затем было определено влияние пассивной иммунизации на растворимые уровни  $\alpha$ Syn в экстрактах головного мозга. Экстракты головного мозга измеряли на уровни  $\alpha$ Syn-олигомеров, pS129  $\alpha$ Syn и общий уровень  $\alpha$ Syn с помощью анализа ELISA и результаты показаны на фиг. 23 и 24. Значительные увеличения  $\alpha$ Syn-олигомеров наблюдались у животных, инокулированных A53T-PFF, по сравнению с контролями PBS (Veh); аналогичные результаты были получены с помощью двух независимых анализов ELISA  $\alpha$ Syn-олигомеров (1E8+2E2 и MJFR14642+23H8, оба из которых описаны в примере 12) (фиг. 23). Тенденция к снижению уровней олигомеров по сравнению с группой A53T-PFF наблюдалась для всех животных, обработанных антителами. В отличие от результатов в отношении олигомеров уровни pS129  $\alpha$ Syn и суммарного  $\alpha$ Syn не были затронуты инокуляцией A53T-PFF или пассивной иммунизацией (фиг. 24). Изменения в сигнале pS129, наблюдаемые ИНС, вряд ли будут обнаружены с помощью анализа ELISA на pS129 из-за относительно высокого уровня фона pS129, присутствующего в экстрактах.

Во втором исследовании продолжительностью 90 дней с использованием способов, описанных в

примере 11, 7A10-Vh-T93A-IgG1.3f вводили путем внутривенной инъекции в дозах 3, 10, и 30 мг/кг один раз в неделю. Для ясности антитело, тестируемое в примере 11, представляло собой 7A10 hIgG1.3f. Во втором исследовании, используя 7A10-Vh-T93A-IgG1.3f, наличие антител к лекарственным средствам было обнаружено у 44% обработанных животных. Результаты данного исследования были весьма изменчивы, и не наблюдалось существенного влияния на патологию.

Таким образом, анти- $\alpha$ Syn-антитела 7A10, 11H11-1, 15A5, 21A3, 36A3 и 44B11 являются эффективными для блокирования передачи  $\alpha$ Syn патологии *in vivo*.

Пример 12. Оценка уровней  $\alpha$ Syn-олигомеров в экстрактах головного мозга и CSF с использованием олигомер-специфических анализов ELISA.

В примере описывается разработка олигомер-специфических анализов ELISA для измерения уровней  $\alpha$ Syn-олигомеров в лизатах головного мозга человека и CSF.

Способы.

а. Эпитопное картирование.

$\alpha$ Syn пептиды для исследований по картированию эпитопов были приобретены у InnoPer (San Diego, CA). Два набора перекрывающихся пептидов последовательности  $\alpha$ Syn человека были получены с N-концевой группой биотина и линкером PEG4 и C-концом. Пептиды были растворены в PBS в концентрации 1 мг/мл. Для исследований по картированию 100 мкл 0,25 мкг/мл  $\alpha$ -синуклеиновых пептидов в PBS добавляли в покрытый NeutrAvidin высокоэффективный 96-луночный планшет (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали при комнатной температуре (RT) в течение 2 ч (или 4°C в течение ночи (O/N)). Планшеты промывали 3 раза ~300 мкл промывочного буфера (0,05% Tween в PBS). Планшеты затем блокировали 150 мкл 3% BSA в PBS при RT в течение ~2 ч (или 4°C для O/N). 100 мкл тестируемых образцов, разведенных в буфере для образцов (0,1 % BSA/0,05% Tween/PBS, 2 таблетки ингибитора протеаз Roche - в 50 мл буфера), инкубировали на планшетах при RT в течение 2 ч. Затем планшеты промывали 3 раза. Добавляли 100 мкл вторичного антитела, разведенного 1:1000 в PBSTB (1% BSA/0,2% Tween/dPBS) и инкубировали при RT в течение 1 ч. Планшеты промывали 3 раза в течение 5-10 мин на каждую промывку. 100 мкл AP-субстрата (Tropix CDP Star Ready-to-Use with Sapphire II, Applied Biosystems; Cat #T-2214) добавляли и проявляли при RT в течение 30 мин. Сигналы люминесценции считывали с помощью прибора Perkin Elmer En Vision (2102 Multilabel Reader). Планшеты выдерживали при постоянном встряхивании (шейкер для планшетов Titer, скорость 3) во время анализа. В качестве вторичных антител использовали конъюгат ослиного античеловеческого IgG с щелочной фосфатазой affinipure (JacksonImmuno #709-055-149), конъюгат ослиного анти-кроличьего IgG с щелочной фосфатазой affinipure (JacksonImmuno #711-055-152), конъюгат ослиного анти-мышинного IgG с щелочной фосфатазой affinipure (JacksonImmuno #715-055-151). Все вторичные антитела разбавляли до 50% конечной концентрации глицерина.

б. Приготовление PFF и анализ фибриллизации.

PFF были приготовлены и проанализированы с использованием способа, описанного в примере 3.

с. Анализ связывания  $\alpha$ Syn.

Антитела были протестированы на связывание с человеческим  $\alpha$ Syn-мономером, человеческим  $\beta$ Syn-мономером, человеческим  $\gamma$ Syn-мономером, PFF, полученными из человеческого  $\alpha$ Syn, PFF, полученными из человеческого A53T  $\alpha$ Syn, и пептидами  $\alpha$ Syn с аминокислотными остатками 111-140, содержащими последовательности человека, крысы и мыши.  $\alpha$ Syn-пептиды с аминокислотными остатками 111-140, содержащие последовательности человека, крысы и мыши, были приобретены у InnoPer (San Diego, CA). Человеческий  $\alpha$ Syn-мономер, человеческий  $\beta$ Syn-мономер и человеческий  $\gamma$ Syn-мономер были приобретены у rPeptide (Bogart, GA).

Для анализа связывания 96-луночные планшеты (Costa #3925, микропланшет с высоким связыванием) покрывали 100 мкл 1 мкг/мл  $\alpha$ Syn WT PFF в PBS при RT в течение 2 ч (или 4°C для O/N). Планшеты промывали 3~300 мкл промывочного буфера (0,05% Tween в dPBS). Планшеты блокировали 150 мкл 3% BSA/PBS при RT в течение 2 ч (или 4°C в течение O/N). 3-кратные серийные разведения PFF (начиная с 2 мкг/мл) и  $\alpha$ Syn WT мономера (начиная с 20 мкг/мл) готовили в буфере для образцов (0,1% BSA/0,05% Tween/PBS, 2 таблетки полного ингибитора протеаз Roche - в 50 мл буфера). Для инкубации антител равные объемы 2-кратной анализируемой концентрации  $\alpha$ Syn-PFF или мономера смешивали с 2-кратной анализируемой концентрацией антител в планшетах с низким связыванием BD falcon и инкубировали при RT в течение ~2 ч. 100 мкл смесей антител и PFF или мономера добавляли в планшеты, покрытые PFF, и инкубировали при RT в течение 10 мин. Планшеты промывали 3 раза. Добавляли 100 мкл ослиного анти-человеческого IgG (Jackson Immuno #709-055-149, с 50% глицерина), разведенного 1:1000 в PBSTB (1% BSA/0,2% Tween/dPBS), и планшеты инкубировали при RT в течение 1 ч. Планшеты промывали 3 раза в течение 5-10 мин на промывку. Добавляли 100 мкл AP-субстрата (Tropix CDP Star Ready-to-Use with Sapphire II, Applied Biosystems) и планшеты проявляли при RT в течение 30 мин. Сигналы люминесценции измеряли с помощью прибора Perkin Elmer EnVision (2102 Multilabel Reader). PFF обрабатывали ультразвуком 15-кратными импульсами по 1 с перед нанесением покрытия или смешиванием с антителами. Планшеты выдерживали при постоянном встряхивании (шейкер для планшетов Titer,

скорость 3) во время анализа.

d. ELISA.

Планшеты для ELISA (Costar) покрывали 100 мкл соответствующих захватывающих антител, разведенных в ВирН карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,4 (Thermo Fisher Scientific) в течение ночи при 4°C. Захватывающее антитело MJFR1 (Abcam) использовали в концентрации 0,1 мкг/мл (анализ на суммарный  $\alpha$ -синуклеин) или 0,35 мкг/мл (pS129 анализ), MJFR14642 (Abcam) при 0,1 мкг/мл и 1E8 при 0,3 мкг/мл. Планшеты 4 раза промывали PBS Dulbecco (Thermo Fisher Scientific) и блокировали 3% BSA (бычий сывороточный альбумин, не содержащий протеазы, фракция V) в PBS в течение 2~3 ч при RT или в течение ночи при 4°C. Стандарты, образцы головного мозга и образцы QC разбавляли 1% BSA/0,05% Tween/PBS, содержащим полный ингибитор протеазы Roche (1 таблетка/25 мл) и ингибитор фосфатазы 2 и 3 (Sigma Aldrich, 1:100). Стандартами являются  $\alpha$ -синуклеин WT (rPeptide), pS129 (aa89-140, AATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMP-pS-EEGYQDYEPANNNNNNNH-CONH<sub>2</sub>; SEQ ID NO: 129) или PFF. Обработка ультразвуком PFF и мономера выполнялась с использованием микроразрушителя KONTES Micro Ultrasonic Cell Disrupter (выход 40, Tune 50). Образцы обрабатывали ультразвуком 15 раз по 1 с/импульс. Образцы 50 мкл/лунку загружали в двух экземплярах и инкубировали для O/Nat при 4°C. После уравнивания планшетов до комнатной температуры добавляли 50 мкл антител для детекции 1:4000, разведенных в 1% BSA/0,1% Твин/DPBS, и совместно инкубировали с образцами при RT в течение ~ 2 ч. Детектирующие антитела (4B12 от Covance, MBR13 от Abcam, 2E2 и 23H8) были предварительно конъюгированы со щелочной фосфатазой (набор AP от Novus Biologicals). Затем планшеты 4 раза промывали 0,05% Tween/PBS и обрабатывали 100 мкл субстрата щелочной фосфатазы (Tropix CDP Star Ready-to-Use with Sapphire II, Thermo Fisher Scientific) в течение 30 мин. Сигналы люминесценции измеряли с помощью прибора Perkin Elmer EnVision (2102 Multilabel Reader). Планшеты постоянно встряхивали (шейкер для планшетов Titer, скорость 3) во время анализа. Данные были проанализированы с использованием программы GraphPad Prism.

e. Приготовление лизатов человеческого головного мозга.

Образцы головного мозга обрабатывали ультразвуком в отфильтрованном PBS (Gibco, № 70011, 1 мл PBS/100 мг сырой массы ткани) с помощью микроразрушителя KONTES Micro Ultrasonic Cell Disrupter (выход 40, Tune 50) в течение 2×10 с/импульс. Образцы помещали в пробирки типа Эппендорф объемом 2 мл и пробирки хранили на влажном льду во время лечения ультразвуком. Лизаты головного мозга центрифугировали при 3000 g, 4°C в течение 5 мин. Аликвоты надосадочной жидкости замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C. Были выполнены анализы QC, включая анализы ELISA на  $\alpha$ Syn (суммарный и pS129) и BSA.

Для выделения осажденных высокоскоростным центрифугированием осадков гомогенаты мозга, предварительно приготовленные в концентрации 100 мг/мл в 1×PBS, разводили в 3 раза до 33,3 мг/мл в охлажденном льдом 1×PBS с последующим центрифугированием при 100000×g в течение 30 мин при 4°C. Надосадочную жидкость удаляли и выбрасывали. Осадок ресуспендировали в ледяном 1×PBS в том же объеме, что и исходный образец.

f. Иммунопреципитация экстрактов головного мозга.

Объединенные экстракты головного мозга человека готовили путем объединения следующих образцов в равных пропорциях: PD (PD1, PD3 и PD5), MSA (12-18, 01-03 и 14-49) и DLB (13-37, 05-31 и 08-26). Объединенные образцы разводили в 100 раз буфером PBSTB (1% BSA+0,05% Tween+PBS). Для иммунопреципитации экстракты головного мозга инкубировали с антителами при 4°C в течение 2 ч с переворачиванием. Затем добавляли агарозные шарики, функционализированные белком A/G (Thermo Fisher Scientific) и образцы инкубировали в течение ночи при 4°C. Для приготовления функционализированных белком A/G шариков 1,2 мл суспензии шариков центрифугировали при 1000 g в течение 2 мин при 4°C. Буфер для хранения удаляли и шарики промывали 1 раз с 0,6 мл PBS, содержащим 0,05% твин-20, центрифугировали, как указано выше, и шарики промывали 3 раза с 0,6 мл PBS. После последнего центрифугирования шарики блокировали добавлением 0,6 мл 1% BSA в PBS и инкубировали при 4°C с инкубацией, сопровождаемой переворачиванием, в течение 2 ч. После блокирования шарики выделяли центрифугированием и ресуспендировали в 0,6 мл PBS до конечного объема 1,2 мл. Суспензию шариков добавляли к каждому экстракту головного мозга в разведении 1:10 (об.:об.). После иммунопреципитации, продолжавшейся в течение ночи, образцы центрифугировали для удаления осадков, и истощенные образцы головного мозга выделяли и оценивали с использованием ELISA. Для иммунопреципитации использовались следующие антитела: 26D6 (мышинное контрольное антитело IgG, специфичное для человеческого Abeta (ак. 1-12), MJFR-14642 (Abcam), LB509 (Covance), Clone 42 (BD), 7A10 и 1E8.

g. Выделение первичной клеточной культуры.

Первичные нейроны гиппокампа крыс получали, как описано в примере 10.

h. Иммунофлуоресцентный анализ.

Иммунофлуоресценцию проводили, как описано в примере 10.

i. Высокоинформативный иммунофлуоресцентный анализ.

Высокоинформативный иммунофлуоресцентный анализ проводили, как описано в примере 10.

## j. Анализ SDS-PAGE/иммуноблоттинг.

Гомогенаты мозга из ткани головного мозга с MSA и PD получали, как описано выше. 200 мкл каждого гомогената головного мозга доводили до суммарного объема 400 мкл добавлением PBS (Thermo Fisher Scientific). Разведенные образцы центрифугировали при 100000×g в течение 30 мин при 4°C, чтобы выделить высокомолекулярные агрегаты. Осадки повторно суспендировали в 200 мкл PBS. 50 мкл 4× загрузочного красителя NuPAGE (Thermo Fisher Scientific) и 20 мкл восстановителя NuPAGE 10X (Thermo Fisher Scientific) добавляли к 130 мкл гомогената осадков. Образцы денатурировали инкубацией при 95°C в течение 5 мин, а затем 10 мкл образца фракционировали на 4-12% бис-трис-гелях NuPAGE с 1× разделяющим буфером MES (Thermo Fisher Scientific). Электрофорез проводили при 200 В в течение 50 мин с последующим переносом на 0,4 мкм нитроцеллюлозу (Thermo Fisher Scientific) при 30 В в течение 1 ч. Затем блоты блокировали в 5%-ном молоке в TBST (TBS с 0,1% Tween-20 (Promega)). Затем блоты инкубировали в течение ночи при 4°C при встряхивании со следующими антителами, разведенными 1:5000 в 1% BSA (BioRad) в TBST: 4B12 (BioLegend), 4D6 (BioLegend), Syn-303 (BioLegend), 81A (BioLegend), EP1536Y (Abcam), LB509 (BioLegend), мышинный IgG (Thermo Fisher Scientific) против актина (Sigma). Все антитела были конъюгированы с HRP с использованием набора для конъюгации BioRad EZ-link. После инкубации в течение ночи блоты промывали TBST. Антитела, меченные HRP, выявляли с использованием реагента обнаружения Supersignal West Femto Maximum (Thermo Fisher Scientific) и изображения получали с помощью CCD-камеры GE AI600.

## Анализ SEC-HPLC.

100 мкл MSA-гомогената головного мозга 11-46 и контрольного гомогената головного мозга 11-49 добавляли к 400 мкл PBS и образцы центрифугировали при 100000×g в течение 30 мин при 4°C. Надосадочные жидкости (sup) были сохранены и оставшиеся осадки ресуспендировали в 120 мкл PBS. Для эксклюзионной хроматографии по размеру 100 мкл либо sup, либо осадка вводили в SEC колонку с BioSec-5 300A (диаметр 7,8×300 мм, Agilent) на Agilent 1100 HPLC. Фракции по 1 мл собирали во время пробега 20 мл. Используемая мобильная фаза представляла собой PBS. Колонка работала со скоростью 1 мл/мин и при 37°C температуре колонки. Для концентрирования SEC-фракций образцы подвергали твердофазной экстракции (solid phase extraction (SPE)) с использованием картриджа Waters Oasis SPE HLB. 1 мл каждой SEC-фракции разбавляли 1000 мкл 4%-ной фосфорной кислоты. SPE-колонки кондиционировали 1 мл метанола и затем уравнивали 1 мл H<sub>2</sub>O. Затем добавляли подкисленные образцы. Загруженные колонки промывали 1 мл 5% метанола и образец элюировали 1 мл 100% метанола. Элюаты сушили в течение ночи в вакууме. Очищенные с помощью SPE SEC-HPLC фракции хранили при -20°C высушенными до анализа SDS-PAGE/иммуноблоттинг.

## Результаты.

## а. Характеристика антител.

Сводные данные по антителам, использованным в данном исследовании, представлены в табл. 15.

Таблица 15

Сводные данные по антителам				
Антитело	Изотип	Источник	Иммуноген	Эпитоп (aa)
1E8	Человеческий IgG1		PFF	123-128
2E2	Человеческий IgG1		PFF	119-126 <sup>a</sup>
23H8	Человеческий IgG1		PFF	130-138
MJFR14642	Кроличий IgG	Abcam	филамент	130-140
MJFR1	Кроличий IgG	Abcam	полноразмерный пептид	118-123 <sup>b</sup>
4D6	Мышиный IgG1	BioLegend	полноразмерный пептид	124-128 <sup>a</sup>

4B12	Мышиный IgG1	BioLegend	полноразмерный пептид	103-108 <sup>b</sup>
Syn303	Мышиный IgG1	BioLegend	Окисленный полноразмерный	1-5 <sup>c</sup>
LB509	Мышиный IgG1	BioLegend	Тельца Леви	115-121 <sup>d</sup>
MJFR13	Кроличий IgG	Abcam	пептид pS129	PS129 <sup>b</sup>
EP1536Y	Кроличий IgG	Abcam	пептид pS129	PS129 <sup>b</sup>
81A	Мышиный IgG2a	BioLegend	пептид pS129	PS129 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Эпитоп картирован аналогично тому, как описано в примере 2; см. фиг. 1.

<sup>b</sup> Эпитоп, предоставленный продавцом.

<sup>c</sup> J. Duda et al., *Ann. Neurol.*, 2002; H. Tran et al., *Cell Reports*, 2014.

<sup>d</sup> M. Baba et al., *Am. J. Path.*, 1998; R. Jakes et al., *Neurosci. Letts.*, 1999.

<sup>e</sup> Waxman and B Giasson, *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 2008.

Антитела, описанные выше, оценивали на активность связывания с  $\alpha$ Syn-мономерами и  $\alpha$ Syn-PFF. Антитела инкубировали в растворе с увеличением концентраций либо а-мономеров Syn, либо  $\alpha$ Syn-PFF. Несвязанное антитело захватывали на планшетах, покрытых PFF, и уровни антител измеряли односторонним иммуноферментным анализом (ELISA). Как показано на фиг. 25, антитела 1E8, 2E2, 23H8 и MJFR14642 проявляли более сильное связывание с PFF по сравнению с мономером, причем коэффициенты эффективности связывания мономер-PFF составляли 902, 236, 3258 и 7234 соответственно (табл. 16). Напротив, антитела MJFR1, 4B12 и Syn303 были более эффективными в связывании с мономером по сравнению с PFF (фиг. 26) с коэффициентами эффективности связывания мономер-PFF, составляющими 0,27, 0,24 и 0,47 соответственно (табл. 16). Антитела 4D6 и LB509 проявляли умеренную селективность в отношении PFF с коэффициентами эффективности связывания мономер-PFF, составляющими 26 и 34 соответственно.

Взятые вместе данные результаты указывают на то, что антитела 1E8, 2E2, 23H8 и MJFR14642 являются высоко селективными по отношению к PFF/олигомерам.

Таблица 16

Антитело	мономер (нг/мл)	SD	n	PFF (нг/мл)	SD	n	Коэффициент Моно/PFF
1E8	6464	+872	4	7,2	2,0	4	903
2E2	6226	6690	4	26,4	6,5	4	236
23H8	5808	10834	4	1,8	0,3	4	3258
MJFR 14642	3658	1981	5	0,51	0,10	5	7234
MJFR1	8,0	1,28	2	29,2	7,0	2	0,27
4D6	54,2	+17,6	2	2,1	0,2	2	26
4B12	5,6	1,15	2	23,3	3,2	2	0,24
Syn303	51,2	9,1	2	109,3	6,6	2	0,47
LB509	62	24	2	1,6	0,1	2	38

b. Разработка олигомер-специфических анализов ELISA.

На основании данных по связыванию мономера и PFF, описанных выше, были разработаны и оценены различные сочетания пар антител в анализах ELISA типа "сэндвич" для выявления мономеров  $\alpha$ Syn и олигомеров  $\alpha$ Syn-PFF; сводка оптимальных идентифицированных пар согласно ELISA и специфика данных анализов приведены в табл. 17.

Таблица 17

Сводка данных по ELISA					
Захватывающее антитело	Эпитоп (aa)	Детектирующее антитело <sup>a</sup>	Эпитоп (aa)	Мономер LLQ (нг/мл) <sup>b</sup>	PFF LLQ (нг/мл) <sup>b</sup>
1E8.10	123-128	2E2.2	119-126	>10000	33
MJFR14642	130-140	23H8.G3	130-138	>10000	34
MJFR1	118-123	Syn303	1-5	23	45
MJFR1	118-123	4B12	103-108	8	23
MJFR1	118-123	4D6	124-128	27	19
MJFR1	118-123	MJFR13	pS129	>3000	>3000

<sup>a</sup> Детектирующие антитела были конъюгированы с щелочной фосфатазой (alkaline phosphatase (AP)).

<sup>b</sup> LLQ (самый низкий уровень количественного определения) определяется двукратным фоном анализа. LLQ для мономера на основе результатов для обработанного ультразвуком мономера; аналогичные результаты наблюдались с не обработанным ультразвуком мономером. LLQ для PFF на основе результатов для обработанных ультразвуком PFF. LLQ для ELISA pS129 (MJFR1+MJFR13) составляет 2 пг/мл (пептид pS129).

Использованные в ELISA пары 1E8.10+2E2.2 и MJFR14642+23H8.G3 показали чувствительное и специфичное выявление PFF/олигомеров, но не  $\alpha$ Syn-мономеров (табл. 17; фиг. 27). Обработка PFF ультразвуком усиливала суммарный сигнал в обоих анализах, что позволяет предположить, что анализы чувствительны к размеру агрегатов и что обработка ультразвуком может сделать доступными дополнительные сайты связывания антител. Напротив, обработка ультразвуком не оказала никакого влияния на способность антител обнаруживать мономеры. Оба анализа показали одинаковую чувствительность, составляющую приблизительно 30 пг/мл (эквивалент мономера) для обнаружения обработанных ультразвуком PFF. Только фоновый сигнал наблюдался при концентрации мономера до 10 нг/мл, самой высокой из протестированных концентраций. Взятые вместе данные результаты устанавливают, что ELISA с использованием 1E8+2E2 и MJFR14642+23H8 являются PFF/олигомер-специфичными.

Также были разработаны дополнительные сочетания пар ELISA, включающие одно и то же захватывающее антитело (MJFR1) в сочетании с различными антителами для обнаружения, включая антитело, специфичное для N-концевого домена (Syn303), среднего домена (4B12), C-конца (4D6), и pS129 (MJFR13)  $\alpha$ Syn. Использованные в ELISA пары MJFR1+Syn303, MJFR1+4B12 и MJFR1+4D6 показали чувствительную детекцию как  $\alpha$ Syn-мономера, так и  $\alpha$ Syn-PFF (табл. 17; фиг. 28). Во всех трех анализах были выявлены обработанные ультразвуком PFF с чувствительностью, сходной с анализом ELISA для олигомеров (табл. 17). В отличие от анализов олигомеров обработка ультразвуком не повлияла на выявление PFF с помощью MJFR1+Syn303 и MJFR1+4B12, что позволяет предположить, что доступность данных эпитопов меньше зависит от размера агрегатов. Интересно, что обработка ультразвуком улучшала выявление PFF с помощью MJFR1+4D6, что потенциально связано с тем фактом, что 4D6 связывается с C-концевым эпитопом, подобно олигомер-селективным антителам. В отличие от олигомер-специфичных анализов MJFR1+Syn303, MJFR1+4B12 и MJFR1+4D6 показали чувствительную детекцию  $\alpha$ Syn-мономера с LLQ, составляющими 23, 8 и 27 пг/мл соответственно. Детекция мономера не было затронута обработкой ультразвуком. ELISA с MJFR1+MJFR13 показал чувствительную и специфичную детекцию pS129  $\alpha$ Syn-пептида, только подтверждая специфичность данной пары в отношении pS129.

Для дальнейшей оценки специфичности, MJFR1+Syn303, MJFR1+4B12 и MJFR1+4D6 были также испытаны для обнаружения членов семейства  $\alpha$ Syn,  $\beta$ -синуклеина и  $\gamma$ -синуклеина. Как показано на фиг. 29, все три анализа показали незначительную перекрестную реактивность с  $\beta$ -синуклеином или  $\gamma$ -синуклеином, подтверждающую их специфичность в отношении  $\alpha$ Syn. Взятые вместе данные результаты показывают, что MJFR1+Syn303, MJFR1+4B12 и MJFR1+4D6 специфичны для  $\alpha$ Syn и могут выявлять как мономер, так и олигомер, поддерживая их применимость в качестве анализов на "суммарный"  $\alpha$ Syn.

с. Измерение уровней  $\alpha$ Syn в экстрактах головного мозга.

ELISA использовали для измерения уровней олигомеров, pS129 и суммарного  $\alpha$ Syn в экстрактах головного мозга, полученных из контрольной ткани и ткани с заболеванием (AD, PSP, MSA, PD, DLB). Специфичность сигнала ELISA от экстракта головного мозга была подтверждена исследованиями с линейным разбавлением и иммуноистощением. Как показано на фиг. 30, устойчивые уровни  $\alpha$ Syn-олигомера

(1E8+2E2 и MJFR14642+23H8) были обнаружены в экстрактах головного мозга с PD по сравнению с экстрактами от других нейродегенеративных заболеваний (AD, PSP) и контролей. Средние уровни олигомеров в PD-экстрактах составляли 36 нг/мг суммарного белка в ELISA 1E8+2E2 и 40 нг/мг суммарного белка в ELISA с MJFR14642+23H8.G2 (табл. 18). Уровни олигомера были <LLQ для большинства AD-, PSP- и контрольных экстрактов. В отличие от результатов по олигомерам, сходные уровни суммарного  $\alpha$ Syn наблюдались во всех экстрактах, как измерено с использованием анализа с MJFR1+4B12 (фиг. 30, табл. 18). pS129  $\alpha$ Syn был обнаружен во всех экстрактах, но уровни были повышены в PD-экстракте и значительно выше по сравнению с контролями (фиг. 30, табл. 18).

Таблица 18

Сводка уровней $\alpha$ Syn в контрольных, PD-, AD- и PSP-экстрактах головного мозга								
Анализ <sup>a</sup>	Контроль	Контроль	PD	PD	AD	AD	PSP	PSP
	AVE	SD	AVE	SD	AVE	SD	AVE	SD
1E8+2E2 олигомер	NA		35990	69696	NA		NA	
MJFR14642+23H8 олигомер	NA		39890	67158	NA		NA	
MJFR1+ 4B12	1026776	377889	1070430	265630	741702	263191	993685	483847
Всего								
MJFR1+ MJFR13 pS129	184	56	1143	1554	316	387	221	73
Суммарный белок (мг/мл)	3,3	0,3	3,3	0,5	3,0	0,5	3,3	0,9

Данные нормированы относительно суммарного белка и выражены в эквиваленте мономера (пг/мг суммарного белка) или в эквиваленте пептида pS129 (пг/мг суммарного белка). Уровни суммарного белка выражены в мг/мл.

Чтобы определить, присутствуют ли  $\alpha$ Syn-олигомеры в ткани головного мозга от пациентов с другими синуклеинопатиями, также были получены экстракты от MSA и DLB и проанализированы с использованием анализов ELISA на олигомеры. Как показано на фиг. 31, похожие и устойчивые уровни олигомера были обнаружены во всех трех экстрактах головного мозга с синуклеинопатией (MSA, DLB и PD), в то время как уровни в контрольных экстрактах были <LLQ; аналогичные результаты наблюдались в обоих олигомерных анализах. Напротив, уровни суммарного  $\alpha$ Syn, измеренные с использованием MJFR1+4B12, были одинаковыми во всех экстрактах, включая контроли (фиг. 31). Уровни pS129 также были повышены до такой же степени в синуклеинопатийных экстрактах и были значительно выше (MSA, DLB) или имели тенденцию к повышению (PD) по сравнению с контролем (фиг. 31). Уровни суммарного  $\alpha$ Syn также измеряли с помощью ELISA, чувствительных к N-концевому участку (MJFR1+Syn303) и C-концевому участку (MJFR1+4D6). Как показано на фиг. 32, никаких различий в уровнях суммарного  $\alpha$ Syn не наблюдалось. Результаты ELISA суммированы в табл. 19.

Таблица 19

Сводка уровней $\alpha$ Syn в контрольных, MSA-, DLB- и PD-экстрактах								
Анализ <sup>a</sup>	Контроль		MSA		DLB		PD	
	AVE	SD	AVE	SD	AVE	SD	AVE	SD
1E8+2E2 олигомер	NA		19491	1442	36937	10465	14278	6880
MJFR146 42+23H8 олигомер	NA		31237	16953	57456	13458	18501	13487
MJFR1+ 4B12	642881	108670	814335	172628	546145	98753	745521	251293
Всего								
MJFR1+ MJFR13	322	63	1335	393	1713	31	801	246
pS129								
MJFR1+ Syn303 N-конец	456572	81475	371498	232720	314518	104705	530481	121371
MJFR1+ 4D6 C-конец	772985	97069	907132	148462	622223	79754	929488	242206
Суммарный белок (мг/мл)	4,4	1,1	3,7	0,6	4,0	0,8	3,5	0,3

<sup>c</sup> Данные нормированы относительно суммарного белка и выражены в эквиваленте мономера (пг/мг суммарного белка) или в эквиваленте пептида pS129 (пг/мг суммарного белка).

Уровни суммарного белка выражены в мг/мл.

Уровни олигомеров, измеренные в анализах ELISA 1E8+2E2 и MJFR14642+23H8, сильно коррелировали в различных экстрактах головного мозга с синуклеинопатией (MSA, DLB, PD) (фиг. 33, табл. 20). Абсолютные уровни олигомеров были сопоставимы в двух анализах олигомеров. Уровни pS129 (MJFR1+MJFR13) также сильно коррелировали с уровнями олигомеров. Напротив, уровни суммарного  $\alpha$ Syn, измеренные в анализе MJFR1+4B12, не показывали значительной корреляции ни с уровнями олигомеров, ни с уровнями pS129 (фиг. 33, табл. 20). Однако, уровни суммарного  $\alpha$ Syn в анализе MJFR1+4B12 значительно коррелировали с уровнями в анализе MJFR1+4D6 и показали тенденцию к корреляции с уровнями, измеренными в анализе MJFR1+Syn303 (фиг. 34, табл. 21). Данные результаты обеспечивают дополнительное подтверждение специфичности сигнала в различных анализах. Корреляция между олигомер-специфичными анализами ELISA и анализом ELISA на pS129 позволяет предположить, что олигомер может быть фосфорилирован.

Таблица 20

	Корреляция уровней олигомеров <sup>a</sup>		
	MJFR14642+23H8	MJFR1+MJFR13	MJFR1+4B12
1E8+2E2	0,95	0,92	NS
MJFR14642+23H8		0,96	NS
MJFR1+MJFR13			NS

<sup>a</sup> Данные из анализа контрольных, MSA-, DLB- и PD-экстрактов головного мозга. Показаны значения  $r$  Пирсона для значимых корреляций ( $p < 0,001$ ). NS представляет  $p > 0,05$ .

Таблица 21

Корреляция уровней суммарного $\alpha$ Syn <sup>a</sup>			
	MJFR1+MJFR13	MJFR1+Syn303	MJFR1+4D6
MJFR1+4B12	NS	NS	0,97
MJFR1+MJFR13		NS	NS
MJFR1+Syn303			NS

<sup>a</sup> Данные из анализа контрольных, MSA-, DLB- и PD-экстрактов головного мозга. Показаны значения  $r$  Пирсона для значимых корреляций ( $p < 0,001$ ).

NS представляет  $p > 0,05$ .

<sup>d</sup> Биохимическая характеристика олигомеров в экстрактах головного мозга.

Высокоскоростное центрифугирование может быть использовано для очистки  $\alpha$ Syn-PFF и использовалось для выделения высокомолекулярных агрегатов белка тау из экстрактов головного мозга. Аналогичная стратегия использовалась, чтобы помочь выделить и охарактеризовать  $\alpha$ Syn-агрегаты, присутствующие в экстрактах головного мозга с синуклеинопатией. Контрольные, MSA-, DLB- и PD-экстракты головного мозга подвергали высокоскоростному центрифугированию и растворимый (супер) и нерастворимый (осадок) материал выделяли и анализировали способом ELISA на олигомеры. Как показано на фиг. 35, олигомер был обнаружен в осадках экстракта головного мозга, включая экстракты, полученные из контрольных тканей головного мозга. Специфичность данных сигналов ELISA подтверждена линейностью разбавления. Сходные результаты наблюдали с обоими ELISA на олигомеры. Общее извлечение олигомера в осадке по отношению к уровням исходного экстракта составляло от 20 до 80% (фиг. 35). Напротив, олигомер не был обнаружен в надосадочной жидкостях ни от одного из экстрактов головного мозга. Данные результаты показывают, что олигомеры присутствуют в виде агрегатов с высокой молекулярной массой, и указывают на то, что олигомеры присутствуют в контрольных экстрактах мозга, но на более низких уровнях по сравнению с экстрактами болезненных тканей.

Для дополнительной характеристики высокомолекулярных агрегатов в экстрактах головного мозга фракции осадка и надосадочной жидкости, выделенные из контрольного экстракта головного мозга и экстракта головного мозга с MSA, подвергали эксклюзионной хроматографии по размеру и фракции анализировали с помощью SDS-PAGE/иммуноблоттинга. Как показано на фиг. 36, большая часть  $\alpha$ Syn во фракциях SEC надосадочной жидкости как из контрольного экстракта, так и из экстракта с MSA элюируется во фракции 10, что соответствует молекулярной массе ~60 кДа и позволяет предположить, что данный вид является тетрамером. Данный тетрамер разделился на мономер и фрагмент расщепления с более низкой молекулярной массой при анализе SDS-PAGE/ иммуноблоттинг. Напротив, большая часть  $\alpha$ Syn, выделенного во фракциях осадков, элюировалась во время SEC в свободном объеме (фракция 6), что соответствует молекулярной массе >670 кДа. Аналогичные результаты наблюдались как для контрольного образца, так и для MSA-образцов, подтверждая наличие агрегатов в контрольных экстрактах: данные высокомолекулярные агрегаты также разделялись на мономерные и расщепляемые фрагменты при анализе SDS-PAGE/иммуноблоттинг. Кроме того,  $\alpha$ Syn из изолята осадка был обнаружен во фракции 6, что указывает на то, что агрегат с высокой молекулярной массой находится в быстром равновесии с разновидностями тетрамера. Взятые вместе данные результаты подтверждают присутствие высокомолекулярных агрегатов как в MSA- экстрактах, так и в контрольных экстрактах, и показывают, что агрегаты имеют размер >670 кДа и что агрегаты разрушаются в денатурирующих условиях (SDS с кипячением).

Для дополнительного изучения потенциальной разницы в высокомолекулярных агрегатах осадки экстрактов, выделенные из контроля, MSA-, DLB- и PD-экстрактов головного мозга, анализировали с помощью SDS-PAGE/иммуноблоттинга с использованием различных анти- $\alpha$ Syn антител. Результаты показаны для диапазонов молекулярной массы <20 кДа (фиг. 37), от 30 до 40 кДа (фиг. 38) и от 60 до 100 кДа (фиг. 39). Специфичность сигнала  $\alpha$ Syn была подтверждена с помощью контроля антител IgG. Как показано на фиг. 37, сопоставимые уровни  $\alpha$ Syn, мигрирующего в виде мономера (~14 кДа), были обнаружены во всех осадках экстрактов головного мозга (4B12, 4D6). Тем не менее уровень и степень продуктов расщепления оказались выше в MSA- и DLB-осадках по сравнению с PD и контролем (4B12). Результаты с антителом 4D6, которое распознает C-концевой домен  $\alpha$ Syn, указывают на то, что во фрагментах расщепления отсутствует данный C-концевой участок. Сигнал pS129 (EP1536Y) был самым высоким в DLB>MSA>PD>>контроль. Актин присутствовал в изолятах осадков, и уровни были сопоставимы между образцами. Неспецифическая реактивность с контрольным антителом IgG не наблюдалась, что подтверждает  $\alpha$ Syn-специфичность в пределах данного интервала молекулярной массы.

Заметные количества разновидности частиц с молекулярной массой от 30 до 40 кДа был обнаружен на сопоставимых уровнях во всех осадках экстрактов и, вероятно, соответствует димеру  $\alpha$ Syn (фиг. 38). Результаты с антителами Syn 303 и 4D6 показывают, что частицы данной разновидности имеют интакт-

ные N- и C-концевые домены соответственно. Интересно, что данный заметный димер не обнаруживался легко с использованием антитела 4B12, хотя в DLB-осадках присутствовал низкий уровень реактивности. Данные результаты показывают, что эпитоп 4B12 маскируется в димерах, и позволяют предположить, что реакционная способность 4B12 может быть чувствительным индикатором конформации димера. Результаты с антителом 81A показывают, что вид димера фосфорилируется на S129 и что самые высокие уровни наблюдаются в осадках DLB.

Были обнаружены несколько разновидностей частиц с молекулярной массой в диапазоне от 60 до 100 кДа (фиг. 39). Были обнаружены потенциальные агрегаты  $\alpha$ Syn в 60 кДа (Syn303, 4B12, 4D6) и от 80 до 100 кДа (4B12, LB509, 4D6). В целом картина иммунореактивности, наблюдаемая с различными антителами к  $\alpha$ Syn, была одинаковой во всех осадках экстрактов головного мозга.

e. Индукция нерастворимых агрегатов pS129  $\alpha$ Syn в клетках.

$\alpha$ Syn-PFF и экстракты, выделенные из ткани головного мозга пациента с синуклеинопатией, индуцировали образование нерастворимых, высокофосфорилированных агрегатов  $\alpha$ Syn при добавлении к первичным нейронам в культуре. Кроме того, индукция зависела от высокомолекулярных видов  $\alpha$ Syn, присутствующих в экстрактах головного мозга. Полученные данные подтверждают идею о том, что  $\alpha$ Syn-патология может быть передана подобным прионам образом и позволяют предположить, что переносимые виды представляют собой агрегат  $\alpha$ Syn. Агрегаты с высокой молекулярной массой, выделенные во фракции осадка из контрольных экстрактов, MSA-, DLB- и PD-экстрактов, оценивали на предмет индукции нерастворимого pS1290  $\alpha$ Syn в первичных нейронах, сверхэкспрессирующих A53T  $\alpha$ Syn человека. Устойчивая индукция нерастворимого pS129 наблюдалась после обработки осадками экстракта головного мозга с MSA в течение 11 дней; в отличие от этого в 10 раз более низкие уровни индукции наблюдались с осадками PD-экстракта и DLB-экстракта, а с контрольными осадками экстракта наблюдался только фоновый сигнал (фиг. 40). Индукция не была связана с уровнями олигомера, присутствующего в изолятах осадков. Данные результаты позволяют предположить, что устойчивая индукция, наблюдаемая с осадками MSA-экстракта, может быть связана с различиями в конформации и/или модификациях высокомолекулярных видов, характерных для MSA, по сравнению с PD, DLB и контролем, и что данные различия, вероятно, влияют на поглощение и/или способность инициировать агрегацию определенного типа в клетке реципиента.

f. Измерение уровней  $\alpha$ Syn в CSF человека.

Анализы ELISA 1E8+2E2 и MJFR14642+23H8 на  $\alpha$ Syn-олигомеры были использованы для оценки CSF от пациентов с MSA-синуклеинопатией и контрольных субъектов; Анализ ELISA MJFR1+4B12 на суммарный  $\alpha$ Syn также был включен для сравнения. Анализ линейности разведения и восстановления пиков использовался для проверки анализов для CSF человека и определения оптимального разведения. Как показано на фиг. 41, уровни олигомеров были <LLQ для всех образцов CSF в группе 1, включая MSA, прогрессирующий надъядерный паралич (PSP) и контроли. Аналогичные результаты наблюдались в обоих анализах ELISA 1E8+2E2 и MJFR14642+23H 8. Напротив, уровни суммарного  $\alpha$ Syn ~1000 пг/мл наблюдались в анализе MJFR1+4B12 и уровни были одинаковыми у MSA, PSP и контролей. Была проанализирована вторая когорта CSF-образцов от MSA и контролей (фиг. 42). Как наблюдалось для когорты 1, уровни олигомеров в большинстве образцов были <LLQ; однако количественно определяемые уровни олигомеров были обнаружены для 7 образцов CSF (6 MSA и 1 контроль) в анализе ELISA 1E8+2E2. Уровни суммарного  $\alpha$ Syn, измеренные с помощью MJFR1+4B12, были одинаковыми у MSA-образцов CSF и контрольных образцов CSF и составляли ~1000 пг/мл, что согласуется с результатами из когорты 1.

## Сводный перечень последовательностей

SEQ ID	Описание	Последовательность
1	Человеческий $\alpha$ -синуклеин	MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHG VATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDLGK NEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA
2	7A10 VH CDR1	SGRYYS
3	7A10 VH CDR2	YIYYSGRTKYNPSLKS
4	7A10 VH CDR3	ERGYLDY
5	7A10 VL CDR1	RASQSVSSSYLA
6	7A10 VL CDR2	GASSRAT
7	7A10 VL CDR3	QQYGSSPLT
8	7A10 VH	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSVSSGRYYWSWIRQPPGKLEWIG YIYYSGRTKYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTRERG YLDYWGQGTLLTVSS
9	7A10 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG TKVEIK
10	7A10 HC	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSVSSGRYYWSWIRQPPGKLEWIG YIYYSGRTKYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTRERG YLDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
11	7A10 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
12	7A10-T93A VH CDR1	SGRYYS
13	7A10-T93A VH CDR2	YIYYSGRTKYNPSLKS
14	7A10-T93A VH CDR3	ERGYLDY
15	7A10-T93A VL CDR1	RASQSVSSSYLA
16	7A10-T93A VL CDR2	GASSRAT
17	7A10-T93A VL CDR3	QQYGSSPLT
18	7A10-T93A VH	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSVSSGRYYWSWIRQPPGKLEWIG YIYYSGRTKYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARERG YLDYWGQGTLLTVSS
19	7A10-T93A VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG TKVEIK
20	7A10-T93A HC	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSVSSGRYYWSWIRQPPGKLEWIG YIYYSGRTKYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARERG YLDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP

		VTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
21	7A10-T93A LC	EIVLTQSPGTLSSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
22	11H11 VH CDR1	SYAMH
23	11H11 VH CDR2	AIGTGGGTYADSVKG
24	11H11 VH CDR3	GNWEFDY
25	11H11 VL1 CDR1	RASQSVSSSYLA
26	11H11 VL1 CDR2	GASSRAT
27	11H11 VL1 CDR3	QQYGSSPFT
28	11H11 VL2 CDR1	RASQGISSALA
29	11H11 VL2 CDR2	DASSLES
30	11H11 VL2 CDR3	QQFNSTYP
31	11H11 VH	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAI GTGGGTYADSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNLSRAEDMAVYYCARGNWEF DYWGQGLTVTVSS
32	11H11 VL1	EIVLTQSPGTLSSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPG TKVDIK
33	11H11 VL2	AIQLTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKVPFIYDA SSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDLATYYCQQFNSTYPFGGGTKV EIK
34	11H11 HC	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAI GTGGGTYADSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNLSRAEDMAVYYCARGNWEF DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK SNTKVKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
35	11H11 LC1 (SEQ ID NO: 33+34=11H11-1)	EIVLTQSPGTLSSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPG TKVDIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
36	11H11 LC2 (SEQ ID NO: 33+35=11H11-2)	AIQLTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKVPFIYDA SSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDLATYYCQQFNSTYPFGGGTKV EIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
37	15A5 VH CDR1	SGSYWC
38	15A5 VH CDR2	YIYSGRTKYNPSLKS
39	15A5 VH CDR3	ERGRFDY
40	15A5 VL CDR1	RASQSVSSSYLA
41	15A5 VL CDR2	GASSRAT
42	15A5 VL CDR3	QQYGSSPLT

43	15A5 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWCWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGRTKYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARERGR RFDYWGQGTLLVTVSS
44	15A5 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG TKVEIK
45	15A5 HC	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWCWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGRTKYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARERGR RFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
46	15A5 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
47	21A3 VH CDR1	NRNYYS
48	21A3 VH CDR2	YIYYSGRTKYNPSLKS
49	21A3 VH CDR3	ERGRFDY
50	21A3 VL CDR1	RASQSVSSSYLA
51	21A3 VL CDR2	GASSRAT
52	21A3 VL CDR3	QQYGSSPLT
53	21A3 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSNRNYYSWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGRTKYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARERGR RFDYWGQGTLLVTVSS
54	21A3 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG TKVEIK
55	21A3 HC	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSNRNYYSWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGRTKYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARERGR RFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
56	21A3 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
57	36A3 VH CDR1	SGSYYYS
58	36A3 VH CDR2	YIYYSGRTKYNPSLKS
59	36A3 VH CDR3	ERGWLDP
60	36A3 VL CDR1	RASQSVSSSYLA
61	36A3 VL CDR2	GASSRAT
62	36A3 VL CDR3	QQYGSSPLT
63	36A3 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYYSWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGRTKYNPSLKSRTISVDTSRNFSLKLSVTAADTAVYYCARERGR WLDPWGQGTLLVTVSS

64	36A3 VL	EIVLTQSPGTL <sup>S</sup> SPGERATL <sup>S</sup> SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGQG TRLEIK
65	36A3 HC	QVQLQESGGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGRTKYNPSLKSRTISVDTSRNQFSLKLSVTAADTAVYICARER WLDPWGQGT <sup>L</sup> TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTS <sup>G</sup> VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLH <sup>Q</sup> DWLN <sup>G</sup> KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKG <sup>F</sup> YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT <sup>P</sup> PVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNV <sup>F</sup> SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
66	36A3 LC	EIVLTQSPGTL <sup>S</sup> SPGERATL <sup>S</sup> SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGQG TRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS <sup>T</sup> LTL <sup>S</sup> SKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
67	44B11 VH CDR1	SKYMS
68	44B11 VH CDR2	VMYSGGRRYYADSVKG
69	44B11 VH CDR3	GDRGDY
70	44B11 VL CDR1	RASQSVSSSYLA
71	44B11 VL CDR2	DASNRAT
72	44B11 VL CDR3	QQRSNWPIT
73	44B11 VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSSKYMSWVRQAPGKGLEWVSV YSGGRRYYADSVKGRFTISRDN <sup>S</sup> KNTLYLQMN <sup>S</sup> LR <sup>A</sup> EDTAVYYCARGDRGD YWGQGT <sup>L</sup> TVSS
74	44B11 VL	EIVLTQSPATL <sup>S</sup> SPGERATL <sup>S</sup> SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPIT <sup>F</sup> CGQT RLEIK
75	44B11 HC	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSSKYMSWVRQAPGKGLEWVSV YSGGRRYYADSVKGRFTISRDN <sup>S</sup> KNTLYLQMN <sup>S</sup> LR <sup>A</sup> EDTAVYYCARGDRGD YWGQGT <sup>L</sup> TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS <sup>G</sup> VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLN <sup>G</sup> KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NOVSLTCLVKG <sup>F</sup> YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT <sup>P</sup> PVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNV <sup>F</sup> SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
76	44B11 LC	EIVLTQSPATL <sup>S</sup> SPGERATL <sup>S</sup> SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPIT <sup>F</sup> CGQT RLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS <sup>T</sup> LTL <sup>S</sup> SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
77	2E2 VH CDR1	SYAMH
78	2E2 VH CDR2	VISYDGSNKYYADSVKG
79	2E2 VH CDR3	RGSGSYNFDY
80	2E2 VL CDR1	RASQSVSSSYLA
81	2E2 VL CDR2	GASSRAT
82	2E2 VL CDR3	QQYGSSTP
83	2E2 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVI SYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN <sup>S</sup> KNTLYLQMN <sup>S</sup> LR <sup>A</sup> EDTAVYYCARRGSG SYNFDYWGQGT <sup>L</sup> TVSS
84	2E2 VL	EIVLTQSPGTL <sup>S</sup> SPGERATL <sup>S</sup> SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPT <sup>F</sup> GQGT RLEIK

85	2E2 HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVI SYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSG SYYNFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
86	2E2 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPTFGQGT RLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
87	23H8 VH CDR1	SYGMN
88	23H8 VH CDR2	YISSSSSTIYYADSVKG
89	23H8 VH CDR3	WGSY
90	23H8 VL1 CDR1	RASQSVRSYLA
91	23H8 VL1 CDR2	GASSRAT
92	23H8 VL1 CDR3	QQYGSSPLT
93	23H8 VL2 CDR1	RASQGVSSYLA
94	23H8 VL2 CDR2	DASNRAT
95	23H8 VL2 CDR3	QQRSNWHT
96	23H8 VL3 CDR1	RASQSVSSSYLA
97	23H8 VL3 CDR2	GASSRAT
98	23H8 VL3 CDR3	QQYGSSPT
99	23H8 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMNWVRQAPGKGLEWVSYI SSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCANWGSY WGQGLVTVSS
100	23H8 VL1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKLGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG TKVEIK
101	23H8 VL2	EIVLTQSPATLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA SNRATGIPARFSGSGPGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWHTFGGGTK VEIK
102	23H8 VL3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPTFGGGT KVEIK
103	23H8 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMNWVRQAPGKGLEWVSYI SSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCANWGSY WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
104	23H8 LC1 (SEQ ID NO: 102+103=23H8-1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKLGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
105	23H8 LC2 (SEQ ID NO: 102+104=23H8-2)	EIVLTQSPATLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA SNRATGIPARFSGSGPGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWHTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL

		QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
106	23H8 LC3 (SEQ ID NO: 102+105=23H8-3)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYQCQQYGSSPTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
107	IE8 VH CDR1	SGSYYS
108	IE8VH CDR2	YIYYSGRTKYNPSLKS
109	IE8VH CDR3	ERGWFD
110	IE8VL CDR1	RASQSVSSSYLA
111	IE8VL CDR2	GASSRAT
112	IE8VL CDR3	QQYGSSPLT
113	IE8VH	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGRTKYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYCVRRER WFDPWGQGLTVTVSS
114	IE8VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYQCQQYGSSPLTFGGG TKVEIK
115	IE8HC	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGRTKYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYCVRRER WFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
116	IE8LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYQCQQYGSSPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
117	Человеческий IgG1f константный домен	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKS CDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
118	Человеческий IgG1za (аллотипический вариант)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKS CDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
119	Человеческий IgG1.3f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKS CDKTHTCPPCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG

120	Человеческий IgG1 константный домен легкой цепи каппа	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
121	$\alpha$ Syn эпитоп (123 до 128)	EAYEMP
122	$\alpha$ Syn эпитоп (125 до 128)	YEMP
123	$\alpha$ Syn эпитоп (130-138)	EEGYQDYEP
124	$\alpha$ Syn эпитоп (130-139)	EEGYQDYEP
125	$\alpha$ Syn эпитоп (119-126)	DPDNEAYE
126	$\alpha$ Syn эпитоп (130-138)	EEGYQDYEP
127	С-концевая последовательность	LSPG
128	Пептидный линкер	PVGVV
129	pS219 пептид	AATGFVKKDKLQKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMP-ps-EEGYQDYEP
130	$\alpha$ Syn 105-115	EGAPQEGILED
131	$\alpha$ Syn 106-116	GAPQEGILED
132	$\alpha$ Syn 107-117	APQEGILEDMP
133	$\alpha$ Syn 108-118	PQEGILEDMPV
134	$\alpha$ Syn 109-119	QEGILEDMPVD
135	$\alpha$ Syn 110-120	EGILEDMPVDP
136	$\alpha$ Syn 111-121	GILEDMPVDPD
137	$\alpha$ Syn 112-122	ILEDMPVDPDN
138	$\alpha$ Syn 113-123	LEDMPVDPDNE
139	$\alpha$ Syn 114-124	EDMPVDPDNEA
140	$\alpha$ Syn 115-125	DMPVDPDNEAY
141	$\alpha$ Syn 116-126	MPVDPDNEAYE
142	$\alpha$ Syn 117-127	PVDPDNEAYEM
143	$\alpha$ Syn 118-128	VDPDNEAYEMP
144	$\alpha$ Syn 119-129	DPDNEAYEMP
145	$\alpha$ Syn 120-130	PDNEAYEMPSE
146	$\alpha$ Syn 121-131	DNEAYEMPSEE
147	$\alpha$ Syn 122-132	NEAYEMPSEEG
148	$\alpha$ Syn 123-133	EAYEMPSEEGY
149	$\alpha$ Syn 124-134	AYEMPSEEGYQ
150	$\alpha$ Syn 125-135	YEMPSEEGYQD
151	$\alpha$ Syn 126-136	EMPSEEGYQDY
152	$\alpha$ Syn 127-137	MPSEEGYQDYE
153	$\alpha$ Syn 128-138	PSEEGYQDYEP
154	$\alpha$ Syn 129-139	SEEGYQDYEP
155	$\alpha$ Syn 130-140	EEGYQDYEP
156	мышинный $\alpha$ Syn 111-140 пептид в таблице 4	
157	крысиный $\alpha$ Syn 111-140 пептид в таблице 4	RRRGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP
158	человеческий $\alpha$ Syn 111-140	RRRGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP

	пептид в таблице 4	
159	7A10-T93A-IgG1.3 НС ДНК	ATGAGGGCTTGGATCTTCTTTCTGCTCTGCCTGGCCGGGAGAGCGCTCGCA CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCACGTCTCTGGTGGCTCCGTGAGAGTGGTCTGTTAC TACTGGAGCTGGATTCCGGCAGCCCCAGGGAGGGACTGGAGTGGATTGGG TATATCTATTACAGTGGGAGAACCAAGTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCCA GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCCTCCCTGAAGCTGAGC TCTGTGACCCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAGGGG TACCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCCGTCTCCTCAGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTC CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAAC GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGAC AAAATCACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAAGCCGAAGGGGCCCCG TCAGTCTTCCCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTCAAGCGTCTC ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTC TCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCC AGGCACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC AAGACCAGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTATAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCCCCGGGTGA
160	7A10-LC ДНК (для обих 7A10 и 7A10-T93A); та же последователь- ность LC, общая с 21A3 и 15A5	ATGAGGGCTTGGATCTTCTTTCTGCTCTGCCTGGCCGGGCGCGCCTTGGCC GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTATTAGCAGCAGCTACTTA GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCA GTGTATTACTGTGAGCAGTATGGTAGCTCACCCTCACTTTCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTC CCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAAC GCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC GAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTACCCCATCAGGGCCTGAGCTCG CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG
161	7A10 VH ДНК	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCACGTCTCTGGTGGCTCCGTGAGAGTGGTCTGTTAC TACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAGGGACTGGAGTGGATTGGG TATATCTATTACAGTGGGAGAACCAAGTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCCA GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCCTCCCTGAAGCTGAGC TCTGTGACCCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTACGAGAGAGAGGGG TACCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCCGTCTCCTCA
162	7A10 VL ДНК (для обих 7A10 и 7A10-T93A); та же последователь- ность LC, общая с 21A3 и 15A5	GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTATTAGCAGCAGCTACTTA GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCA

		GTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
163	7A10-T93A VH ДНК	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCACGTCTCTGGTGGCTCCGTACAGCAGTGGTTCGTTAC TACTGGAGCTGGATTTCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG TATATCTATTACAGTGGGAGAACCAGTACAACCCCTCCCTCAAGAGTTCGA GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC TCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAGGGGG TACCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
164	21A3 VH ДНК	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCACGTCTCTGGTGGCTCCGTACAGCAATCGTAATTAC TACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG TATATCTATTACAGTGGGAGGACCAAGTACAACCCCTCCCTCAAGAGTTCGA GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGGTGAGC TCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAGGGGG CGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
165	21A3 VL ДНК	GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTA GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA GTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
165	1E8 VH ДНК	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCACGTCTCTGGTGGCTCCGTACAGCAGTGGTAGTTAC TACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG TATATCTATTACAGTGGGAGAACCAGTACAACCCCTCCCTCAAGAGTTCGA GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGG TCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGGG TGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
166	1E8 VL ДНК	GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTA GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA GTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCTCACTTTCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
167	2E2 VH ДНК	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATG CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATA TCATATGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT ACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAGGGGTTTCGGGG AGTTATTATAACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA
168	2E2 VL ДНК	GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTA GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA GTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCACCTTCGGCCAGGGGACA CGACTGGAGATTA
169	23H8 VH ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATG AACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATT AGTAGTAGTAGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATT

		ACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCTAACTGGGGATCCTAC TGGGGCCAGGGAAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
170	23H8 VL1 ДНК	GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAAGCTACTTA GCCTGGTACCAGCAGAAACTTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCA GTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCTACTTTTCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
171	23H8 VL2 ДНК	GAAATGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGGGTGTTAGCAGCTACTTAGCC TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCA TCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGCCTGGG ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGCA GTGTATTACTGTCAGCAGCTAGCAACTGGCATACTTTTCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAGATCAAA
172	23H8 VL3 ДНК	GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTA GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCA GTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCACTTTTCGGCGGAGGGACC AAGGTGGAGATCAAA
173	11H11VH ДНК	GAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACATCCTGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGCAGGCTCTGGATTACCTTTCAGTAGCTATGCTATG CACTGGGTTTCGGCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAGTGGGTATCAGTATTT GGTACTGGTGGTGGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACC ATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACATGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGGGAACCTGGGAATTT GACTACTGGGGCCAGGGAAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
174	11H11VL1 ДНК	GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTA GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCA GTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCATTCACTTTTCGGCCCTGGG ACCAAGTGGATATCAAA
175	11H11VL2 ДНК	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC AGAGTCACCATCACTTGGCCGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCCTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGGTCCCAGTCTATGATGCC TCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATCTTGCAACT TATTACTGTCAACAGTTTAAATAGTTACCCTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTG GAGATCAAA
176	15A5VH ДНК	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCGTGAGCAGTGGTAGTTAC TACTGGTGTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATCGGG TATATCTATTACAGTGGGCGCACCAAGTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGA GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTCTCCTCTGAAGCTGAGC TCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAGGGGG CGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
177	15A5VL ДНК	GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTA GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT

		GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCA GTGTATTACTGTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
178	36A3VH ДНК	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGGTGGCTCCGTCAGCAGTGGTAGTTAC TACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGACTGGAGTGGATTGGG TATATCTATTACAGTGGGAGAACCAAGTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGA GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAGGAACCAAGTCTCCCTGAAGCTGAGC TCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAGGGGC TGGCTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCTCTCA
179	36A3VL ДНК	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCC TGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCA TCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTT TATTACTGTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGTCACCTTCGGCCAGGGACACGAC TGGAGATTAAA
180	44B11VH ДНК	GAGGTGCAGTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGTTCACCGTCAGTAGCAAATACATG AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATG TATAGCGGTGGTAGAAGATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACC ATCTCCAGAGACAATTCAGAAGACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGATCGGGGTGAC TACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCTCTCA
181	44B11VL ДНК	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCC TGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCA TCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTT TATTACTGTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAGGGACA CGACTGGAGATTAAA

Эквиваленты.

Специалисты в настоящей области техники распознают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе. Такие эквиваленты включены в следующую формулу изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Выделенное антитело, содержащее  
вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий следующие CDR:  
i) CDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;  
ii) CDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и  
iii) CDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и  
вариабельный участок легкой цепи, содержащий следующие CDR:  
i) CDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;  
ii) CDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; и  
iii) CDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17;  
причем упомянутое антитело связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином (SEQ ID NO: 1).
- Выделенное антитело по п.1, где антитело связывается по меньшей мере с одним или несколькими аминокислотными остатками 123-128 в SEQ ID NO: 1.
- Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело содержит последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно.
- Выделенное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, причем упомянутое антитело связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином (SEQ ID NO: 1).
- Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело содержит домен Fc, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 119.
- Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело содержит последовательности тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 20 и 21 соответственно.
- Выделенное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, причем упомянутое антитело связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином (SEQ ID NO: 1).
- Выделенное антитело, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи, причем каждая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и каждая легкая

цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, причем упомянутое антитело связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином (SEQ ID NO: 1).

9. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело представляет собой химерное, гуманизированное или человеческое антитело.

10. Биспецифичное антитело, содержащее выделенное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий следующие CDR:

i) CDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

ii) CDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и

iii) CDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и переменный участок легкой цепи, содержащий следующие CDR:

i) CDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

ii) CDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; и

iii) CDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17;

причем упомянутое антитело связывается с человеческим  $\alpha$ -синуклеином (SEQ ID NO: 1).

11. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая переменный участок тяжелой цепи выделенного антитела по любому из пп.1-8.

12. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая переменный участок легкой цепи выделенного антитела по любому из пп.1-8.

13. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая переменный участок тяжелой и легкой цепей выделенного антитела по любому из пп.1-8.

14. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.11-13.

15. Клетка, содержащая вектор экспрессии по п.14.

16. Иммуноконъюгат, содержащий выделенное антитело по любому из пп.1-9, связанный с фрагментом, где фрагмент представляет собой связывающий фрагмент, маркирующий фрагмент, биологически активный фрагмент или терапевтическое средство.

17. Композиция для лечения субъекта человека, имеющего заболевание, характеризующееся наличием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в нейронах и/или глии, причем композиция содержит выделенное антитело по любому из пп.1-9 или иммуноконъюгат по п.16 и фармацевтически приемлемый носитель.

18. Способ получения антитела к  $\alpha$ -синуклеину, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих переменный участок тяжелой и легкой цепей выделенного антитела по любому из пп.3-9, причем нуклеиновые кислоты находятся на одном или разных векторах экспрессии, и где антитело экспрессируется; и выделение антитела из клетки.

19. Способ ингибирования образования нерастворимых агрегатов фосфорилированного по серину-129  $\alpha$ -синуклеина в клетке, включающий приведение клетки в контакт с эффективным количеством выделенного антитела по любому из пп.1-9, иммуноконъюгата по п.16 или композиции по п.17.

20. Применение выделенного по любому из пп.1-9 антитела, иммуноконъюгата по п.16 или композиции по п.17 для лечения заболевания или уменьшения тяжести заболевания, характеризующегося присутствием телец Леви или патологических агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге.

21. Применение по п.20, где заболевание представляет собой болезнь Паркинсона, деменцию при болезни Паркинсона, деменцию, ассоциированную с тельцами Леви, болезнь с тельцами Леви, мультисистемную атрофию или истинную вегетативную недостаточность.

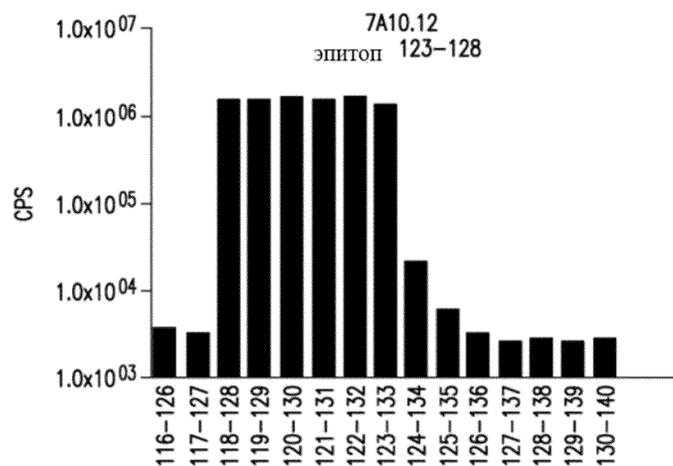
22. Применение по п.20 или 21, предусматривающее введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств.

23. Способ выявления  $\alpha$ -синуклеина в биологическом образце человека, включающий приведение образца в контакт с выделенным антителом по любому из пп.1-9 или иммуноконъюгатом по п.16 в условиях, которые допускают образование комплекса между антителом или иммуноконъюгатом и  $\alpha$ -синуклеином и выявление образования комплекса, где биологический образец представляет собой спинномозговую жидкость, экстракт тканей головного мозга, мочу или кровь.

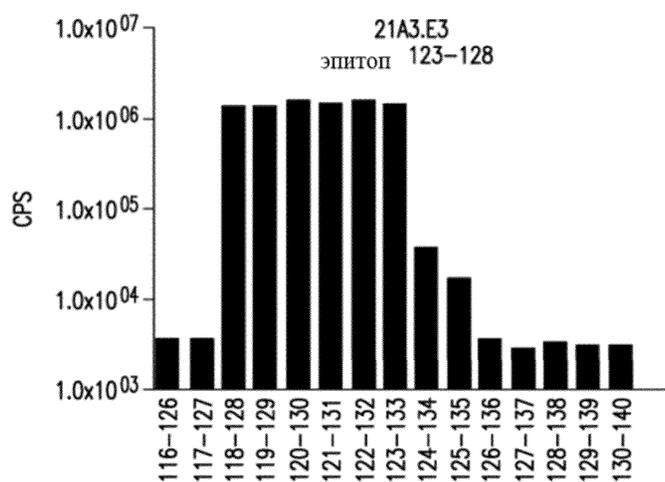
24. Композиция для ингибирования образования нерастворимых или растворимых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в клетке, включающая эффективное количество выделенного антитела по любому из пп.1-9, где клетка контактирует с выделенным антителом.

25. Фармацевтическая композиция для лечения синуклеинопатии или уменьшения тяжести синуклеинопатии у субъекта с синуклеинопатией, включающая эффективное количество выделенного антитела по любому из пп.1-9, где фармацевтическую композицию вводят субъекту.

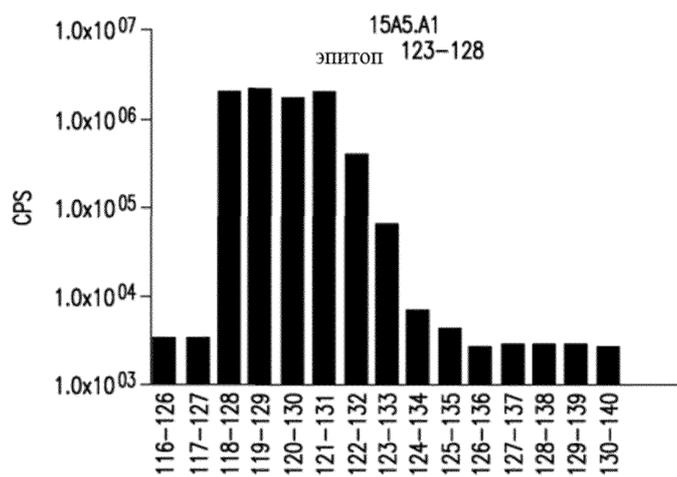
26. Набор для лечения или диагностики заболевания, связанного с присутствием телец Леви или агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге, содержащий выделенное антитело по пп.1-9, или биспецифичное антитело по п.10, или иммуноконъюгат по п.16, и инструкцию по применению.



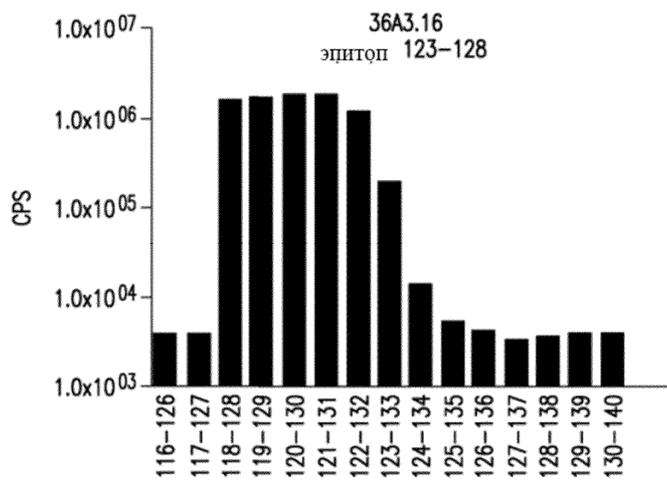
Фиг. 1А



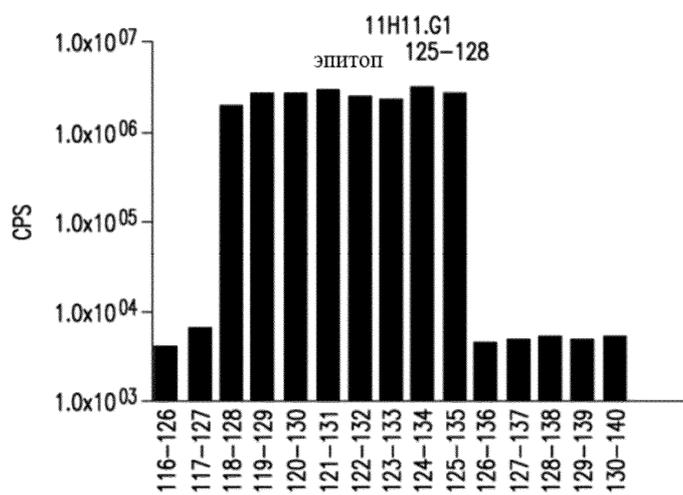
Фиг. 1В



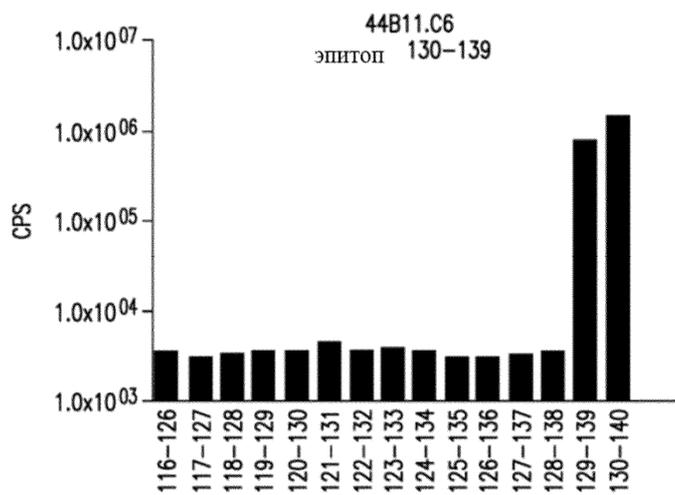
Фиг. 1С



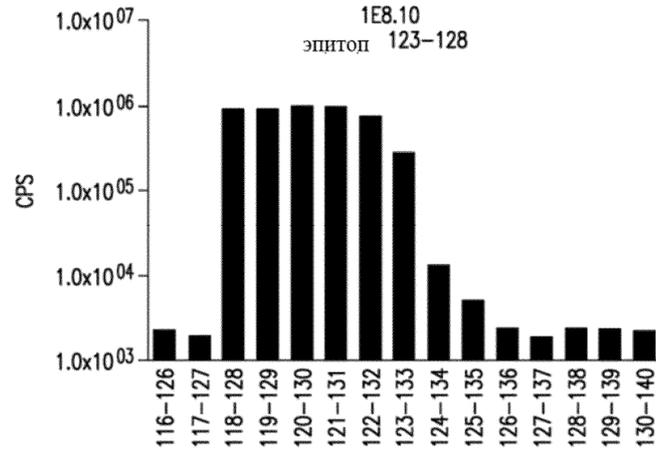
Фиг. 1D



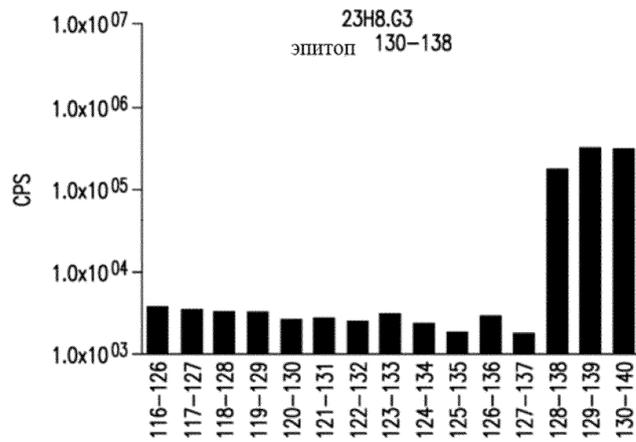
Фиг. 1E



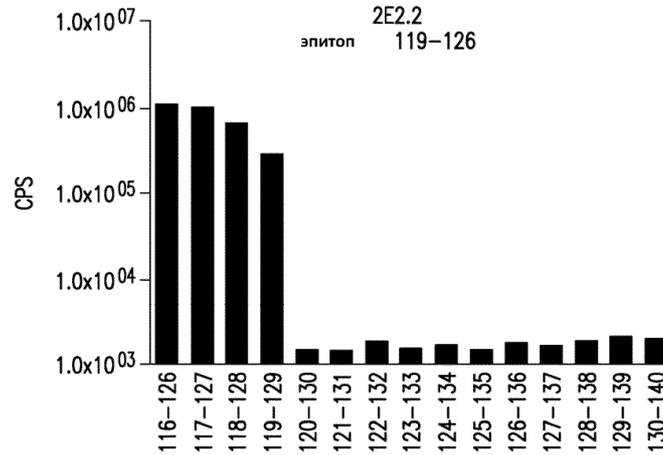
Фиг. 1F



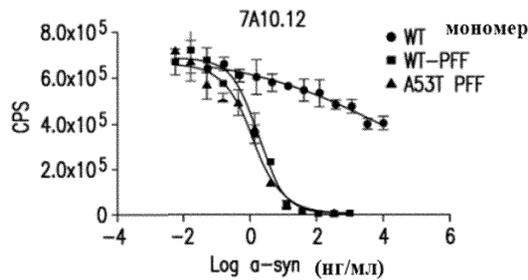
Фиг. 1G



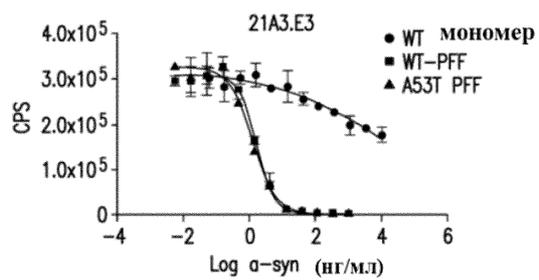
Фиг. 1H



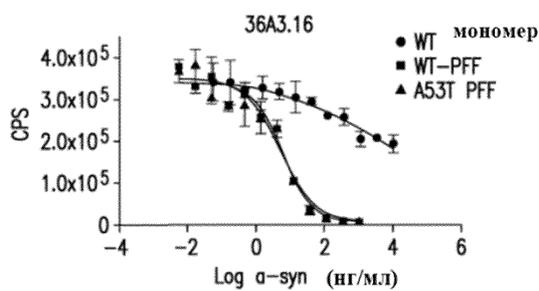
Фиг. 1I



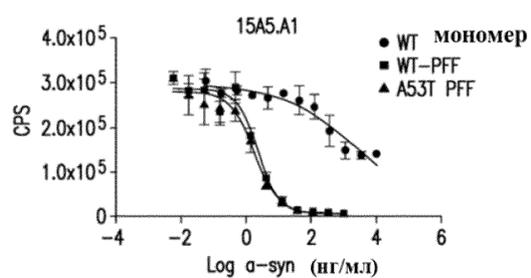
Фиг. 2A



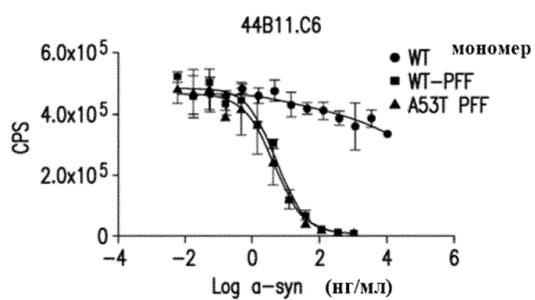
Фиг. 2B



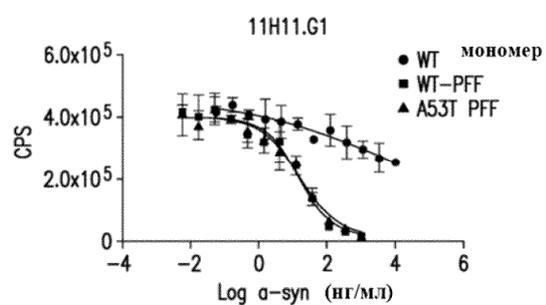
Фиг. 2C



Фиг. 2D

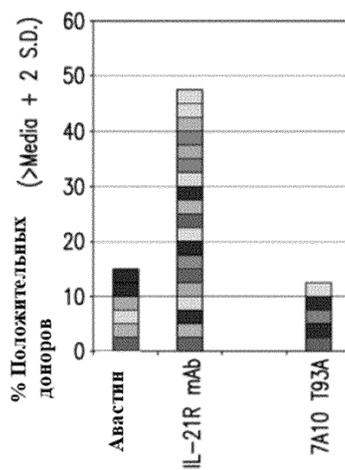


Фиг. 2E

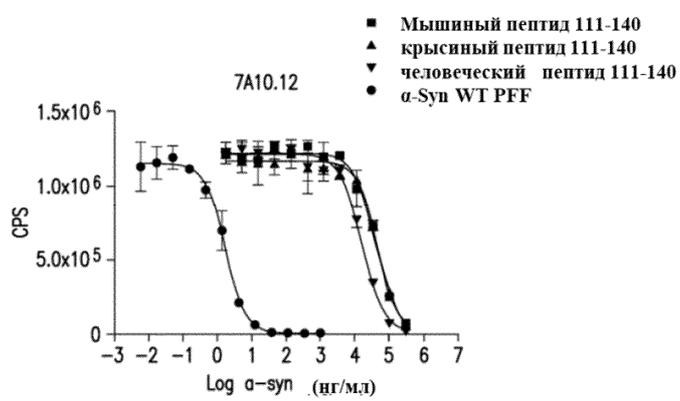


Фиг. 2F

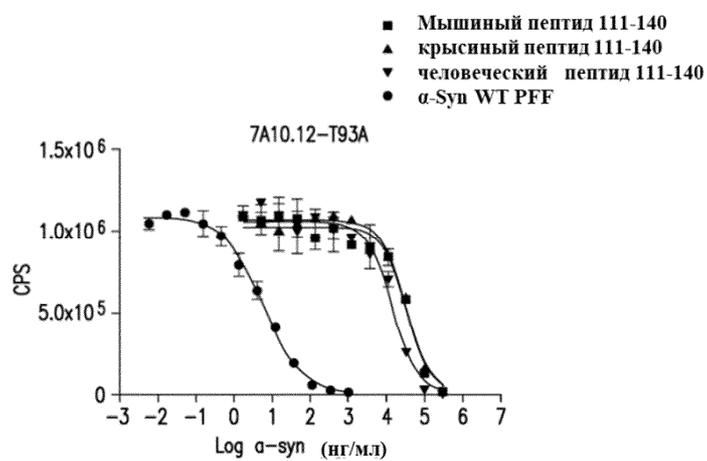




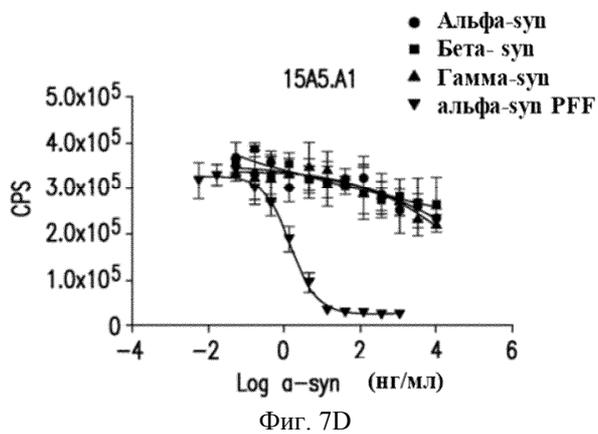
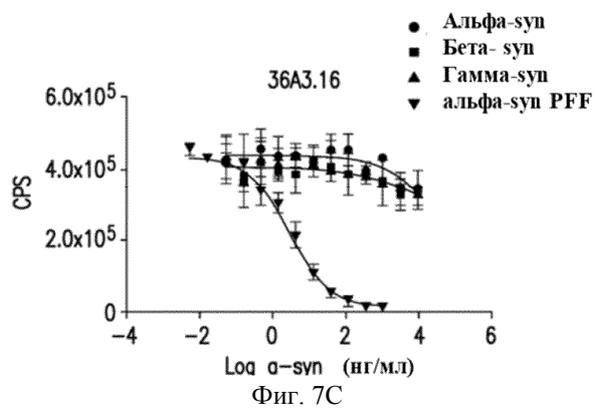
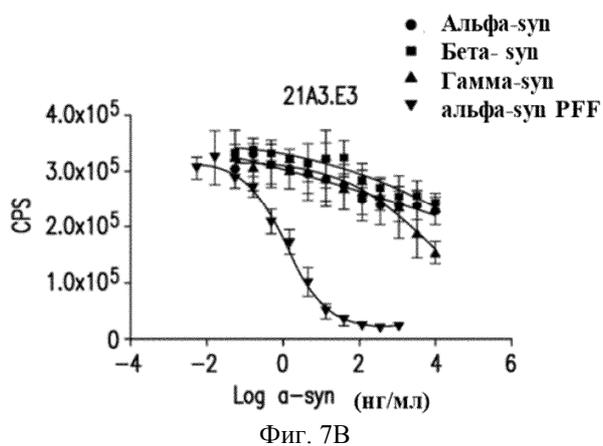
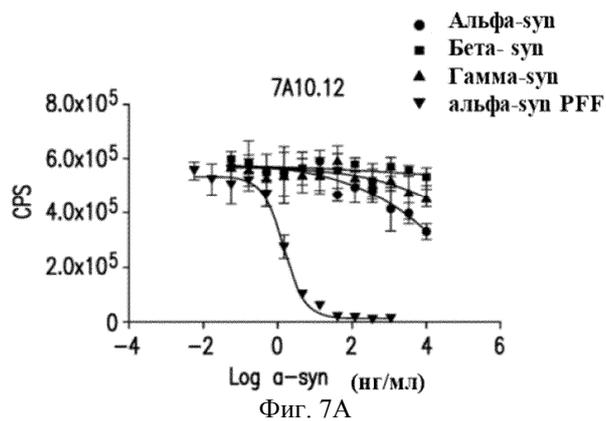
Фиг. 5B

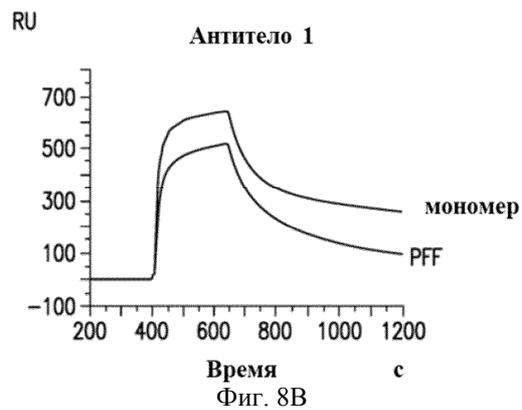
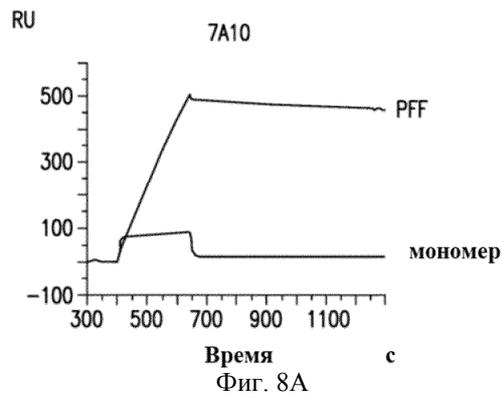
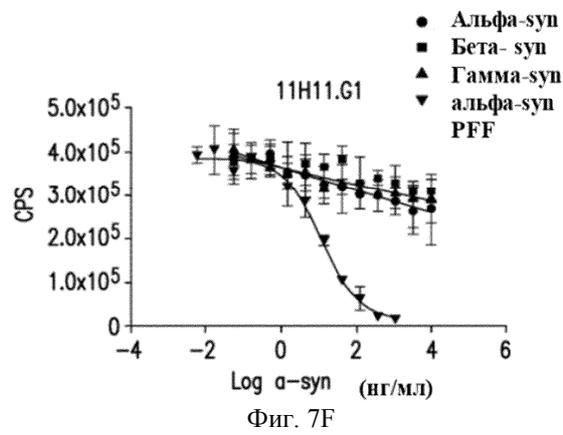
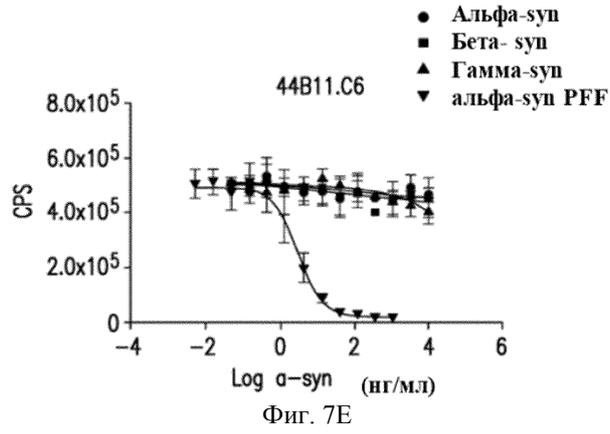


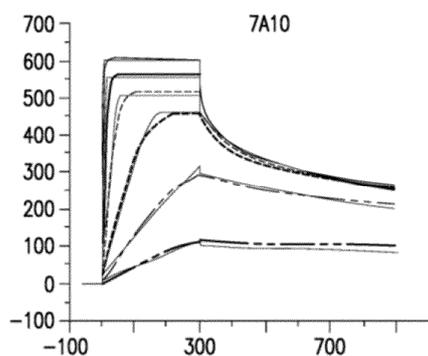
Фиг. 6A



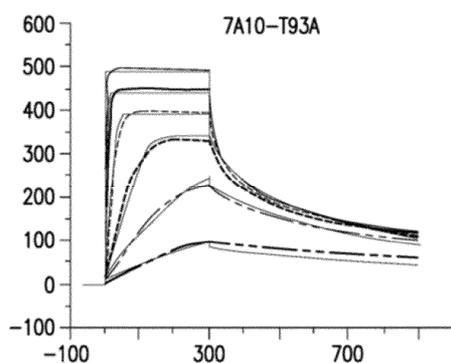
Фиг. 6B



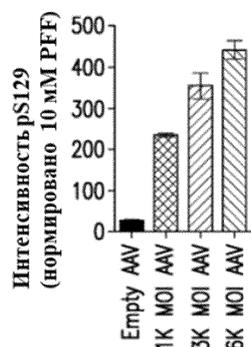




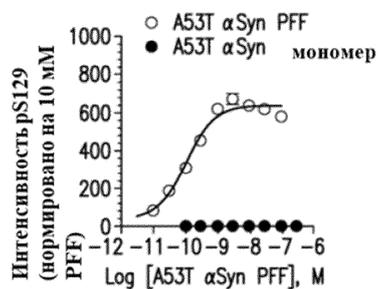
Фиг. 9А



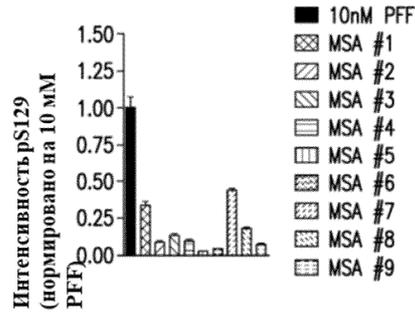
Фиг. 9В



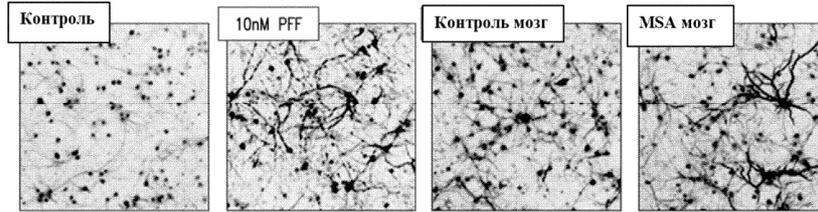
Фиг. 10А



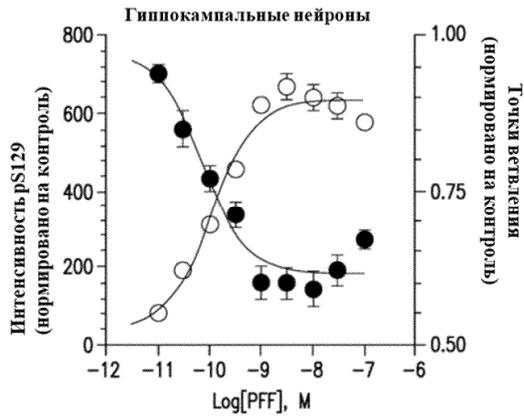
Фиг. 10В



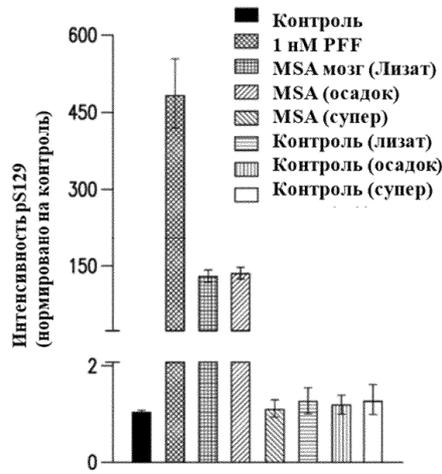
Фиг. 10С



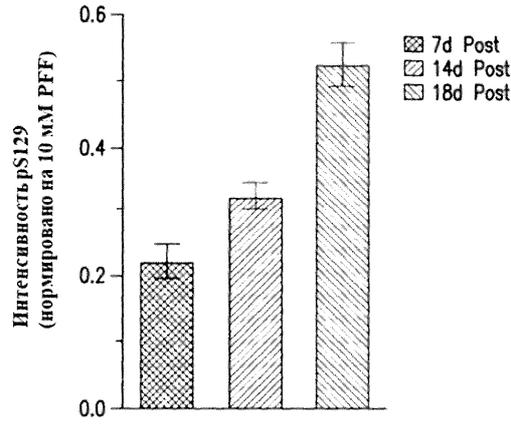
Фиг. 10D



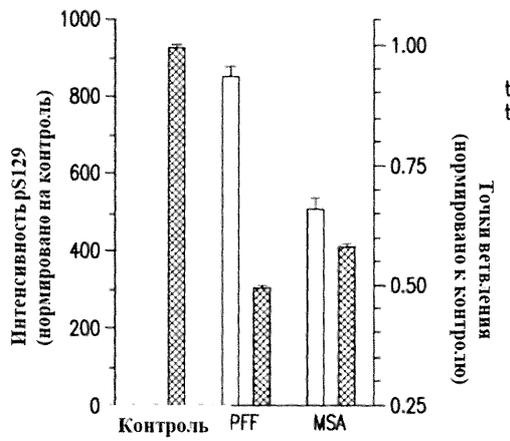
Фиг. 10E



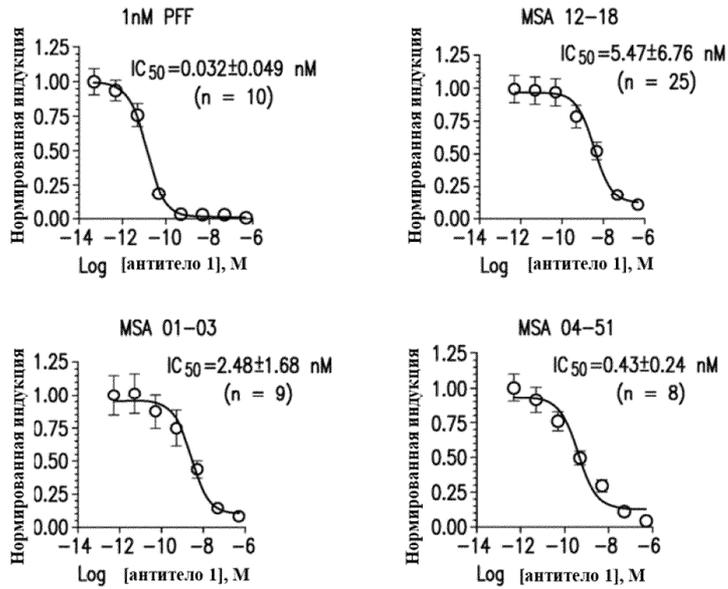
Фиг. 10F



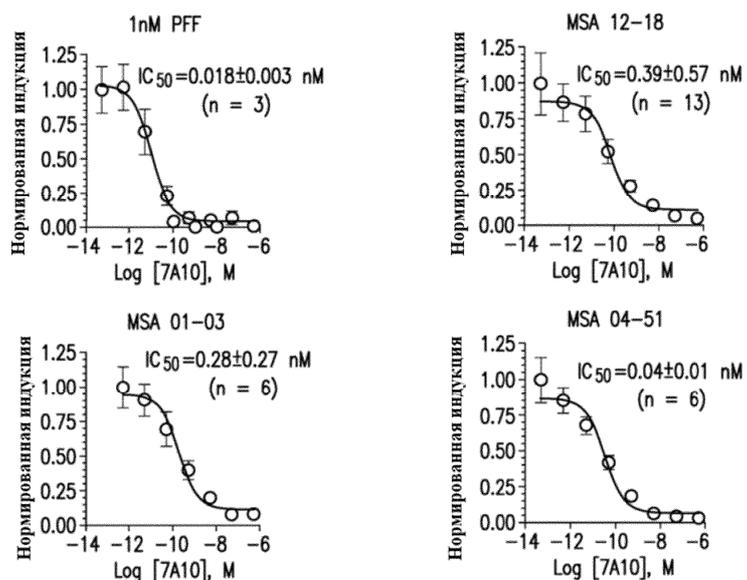
Фиг. 10G



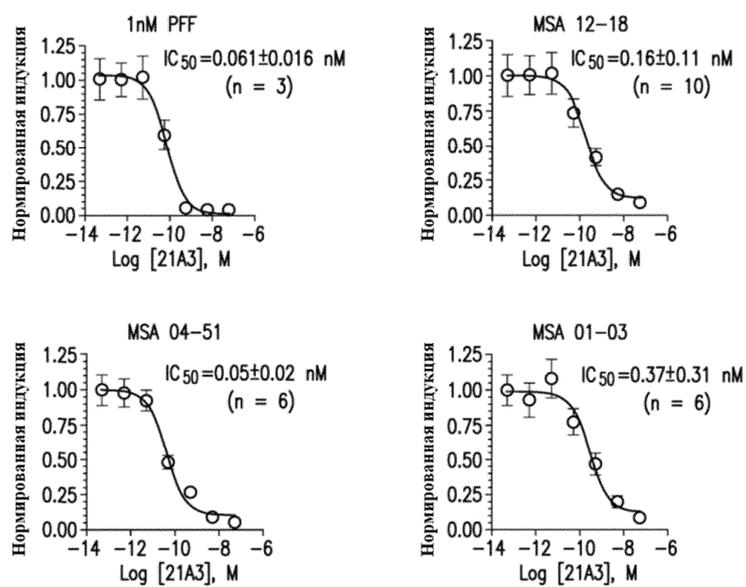
Фиг. 10H



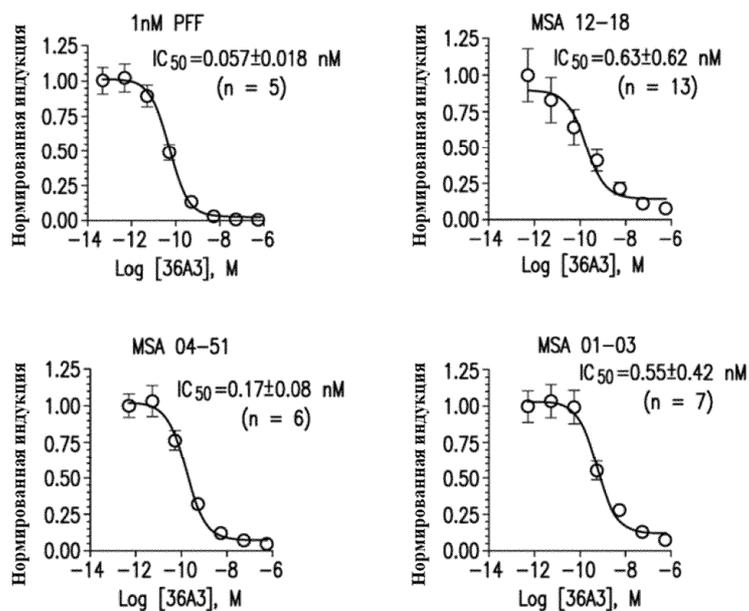
Фиг. 11



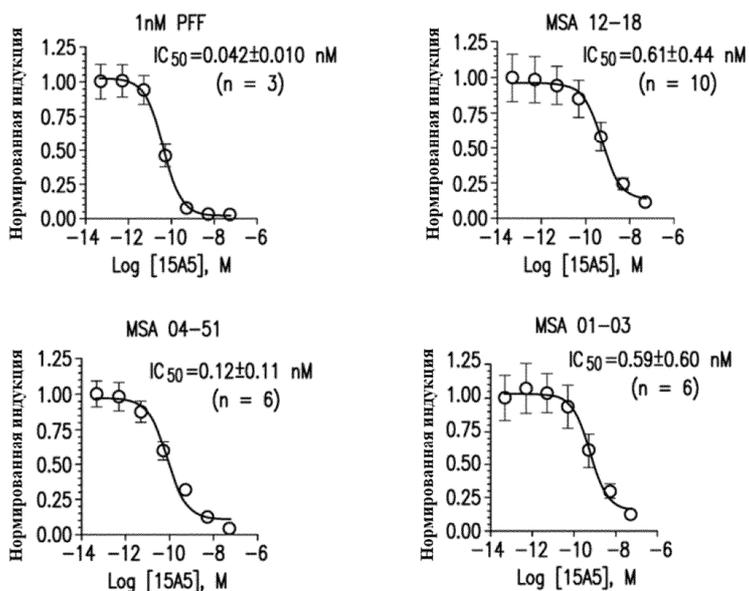
Фиг. 12



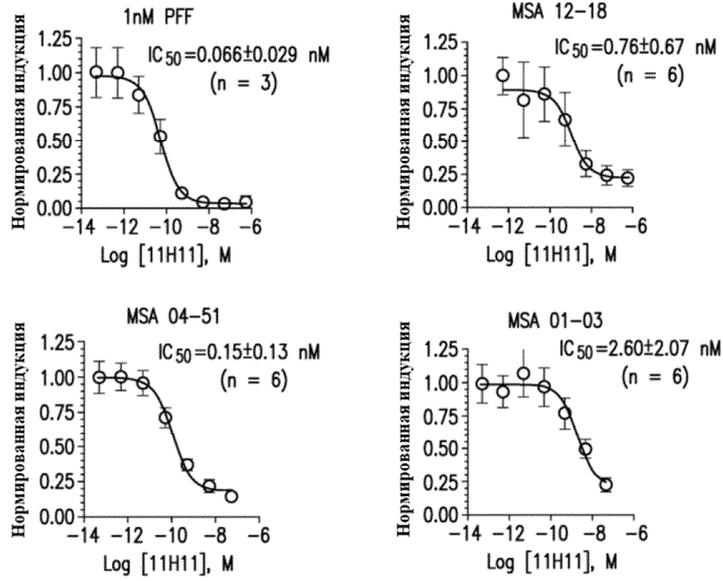
Фиг. 13



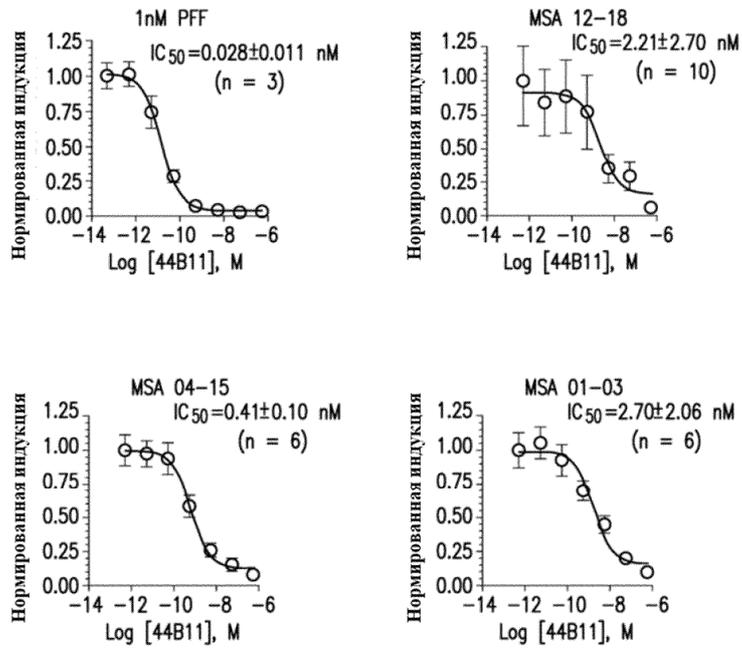
Фиг. 14



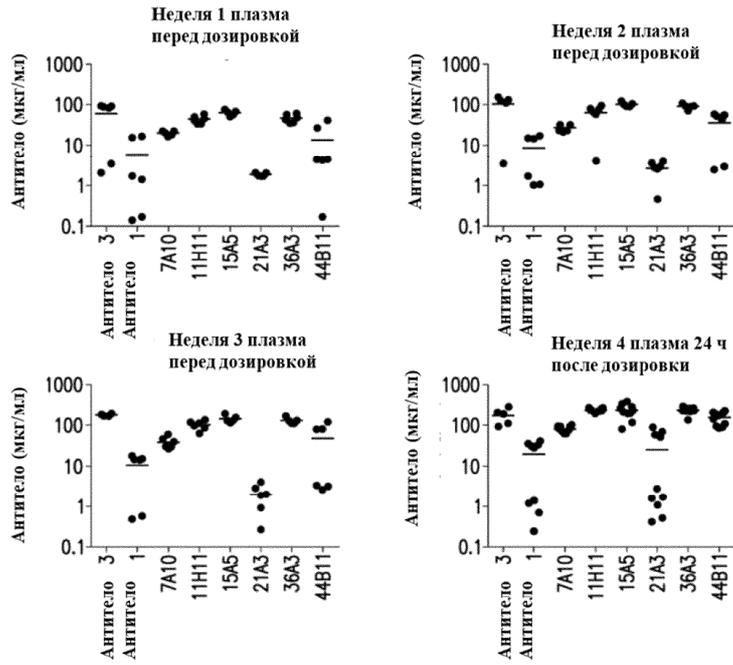
Фиг. 15



Фиг. 16



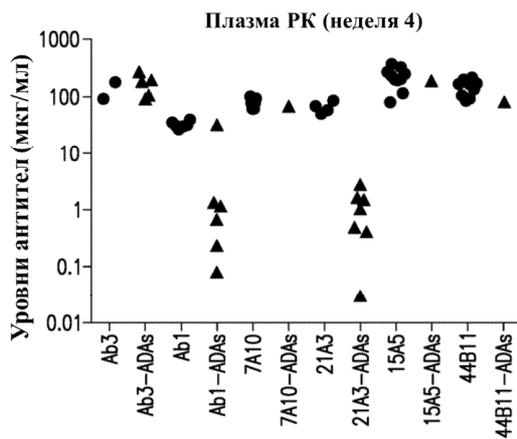
Фиг. 17



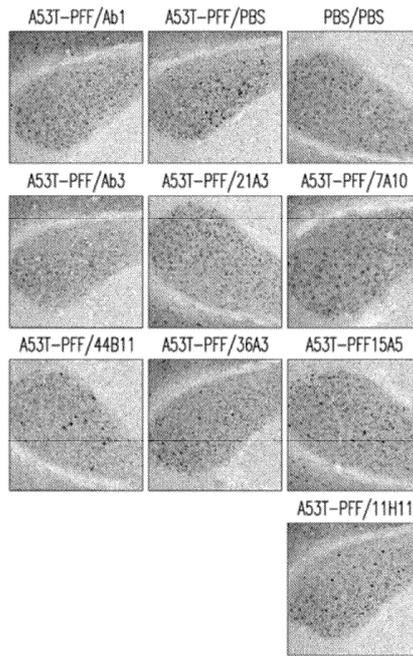
Фиг. 18



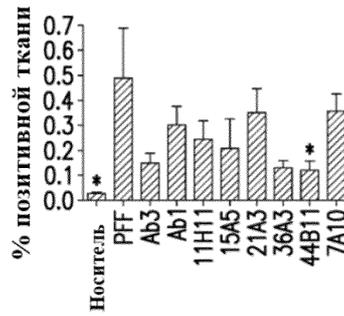
Фиг. 19



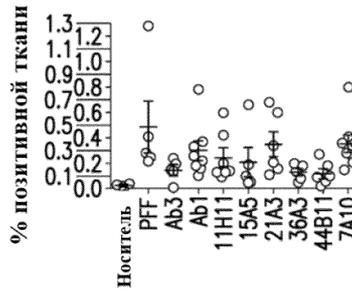
Фиг. 20



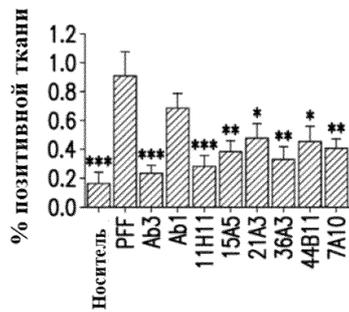
Фиг. 21



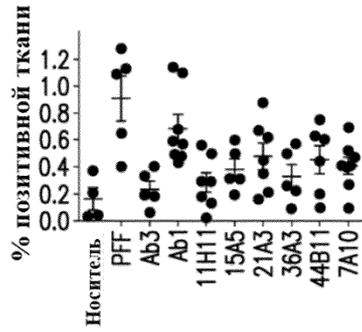
Фиг. 22А



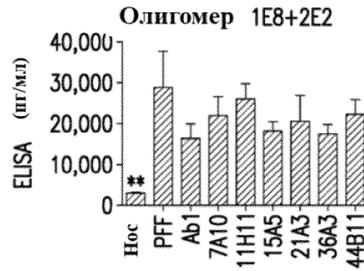
Фиг. 22В



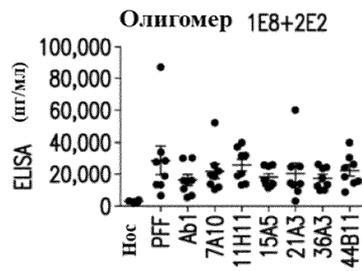
Фиг. 22С



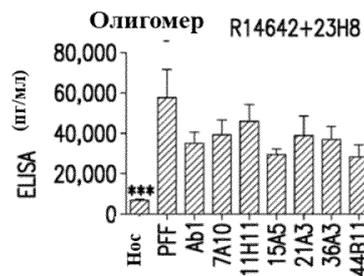
Фиг. 22D



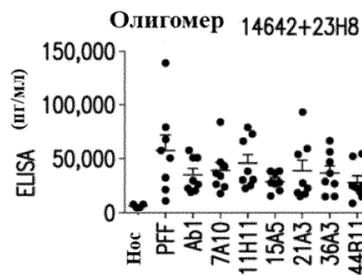
Фиг. 23А



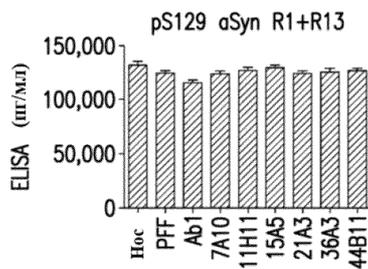
Фиг. 23В



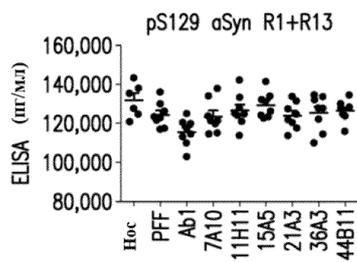
Фиг. 23С



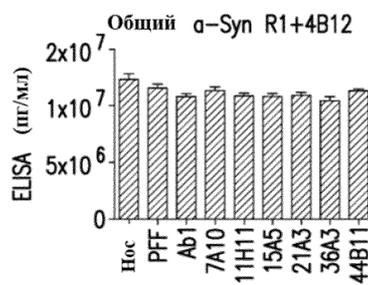
Фиг. 23D



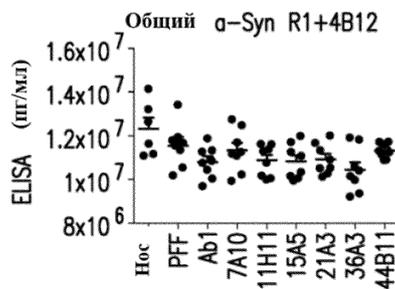
Фиг. 24А



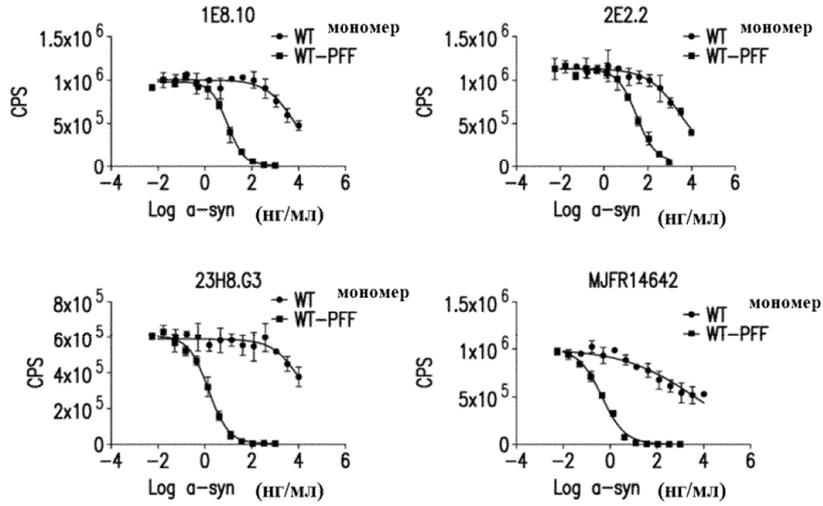
Фиг. 24В



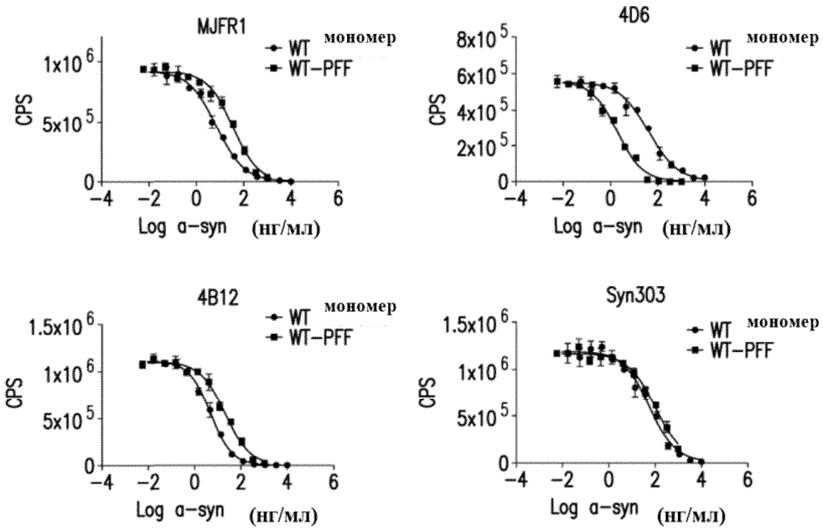
Фиг. 24С



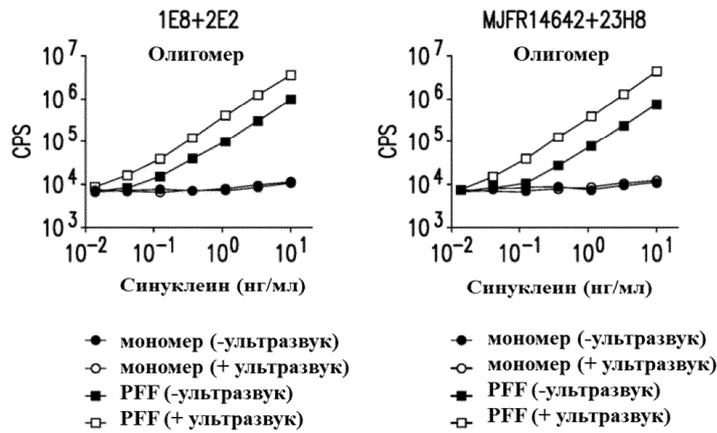
Фиг. 24D



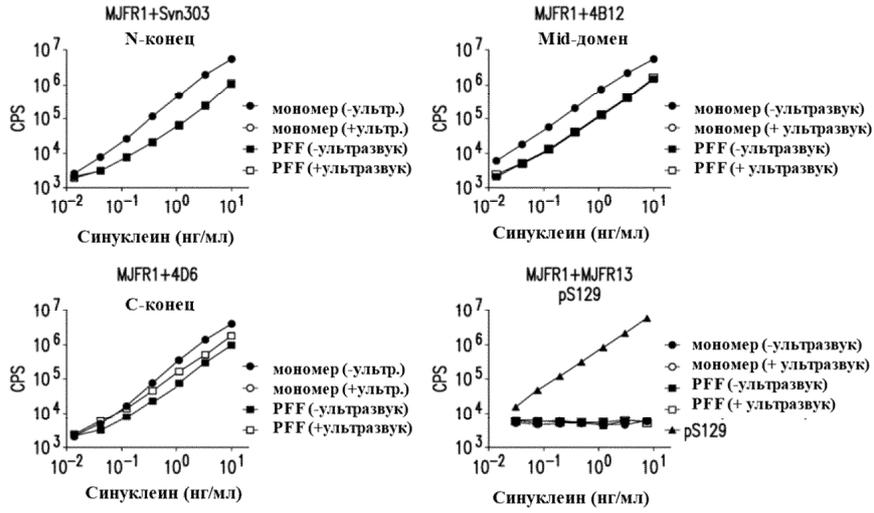
Фиг. 25



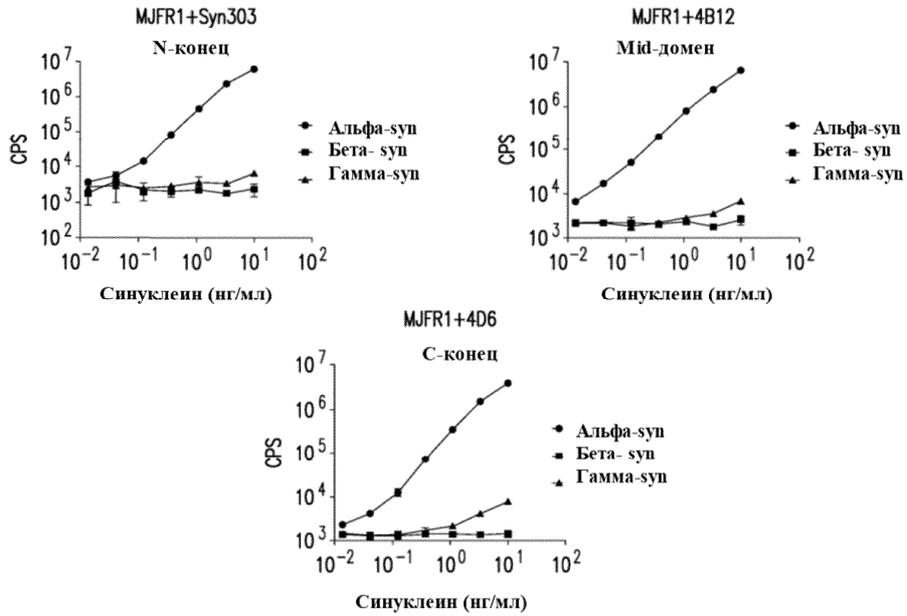
Фиг. 26



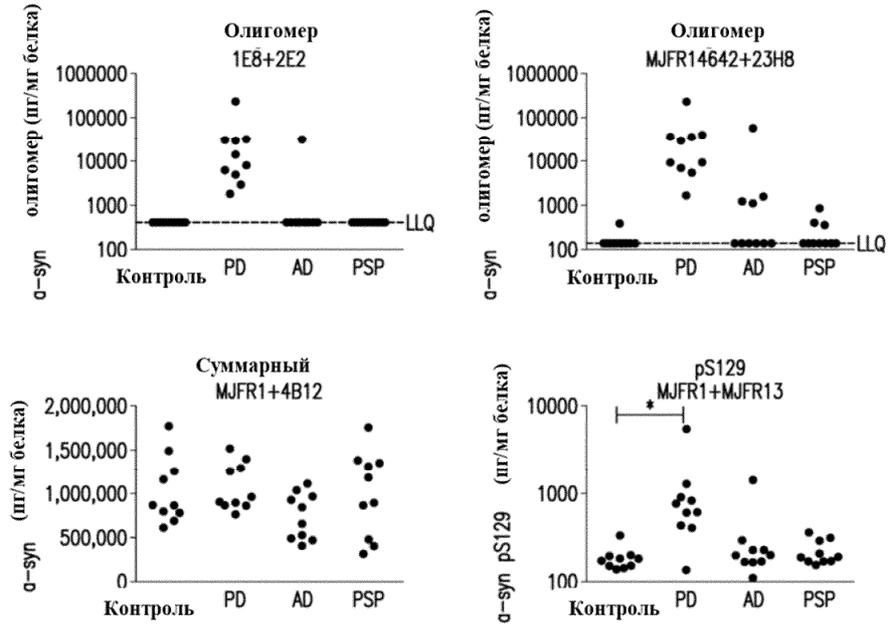
Фиг. 27



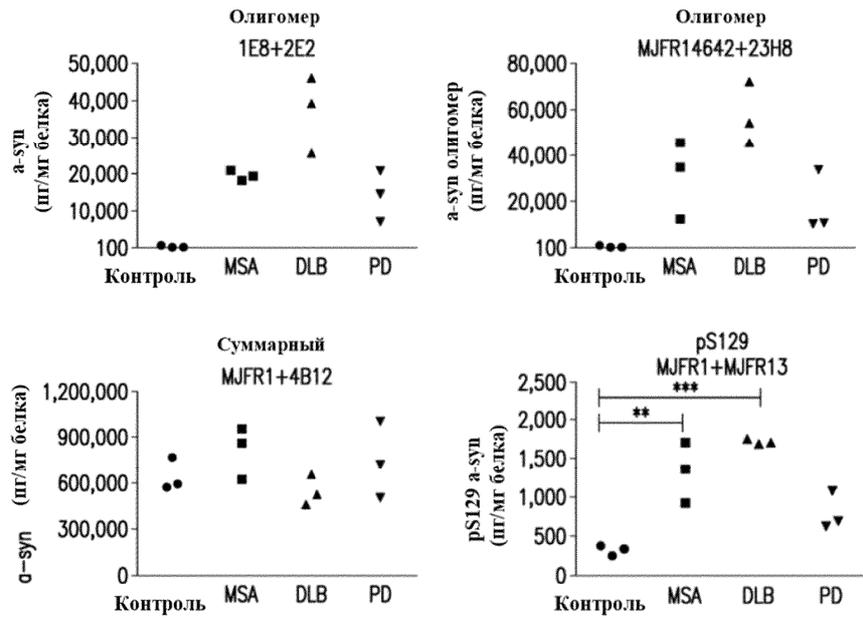
Фиг. 28



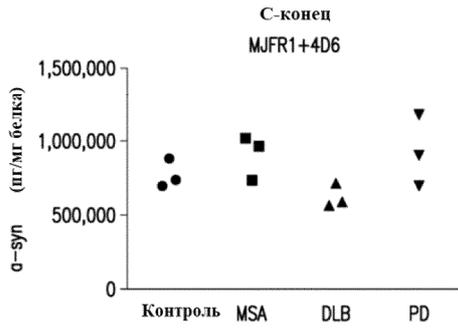
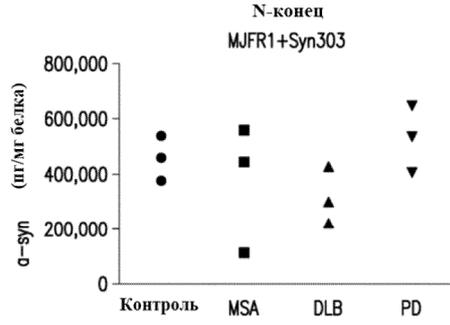
Фиг. 29



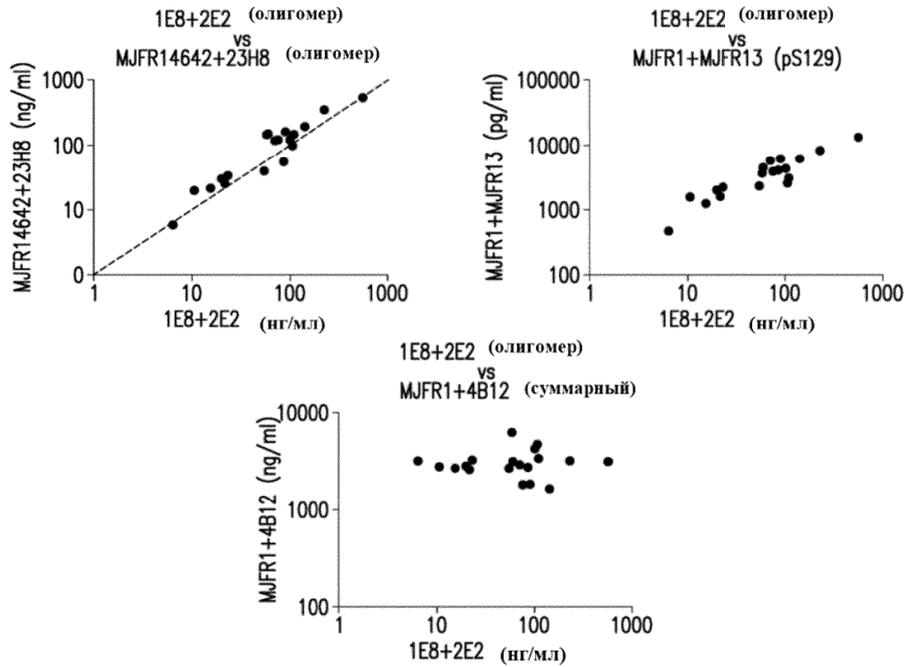
Фиг. 30



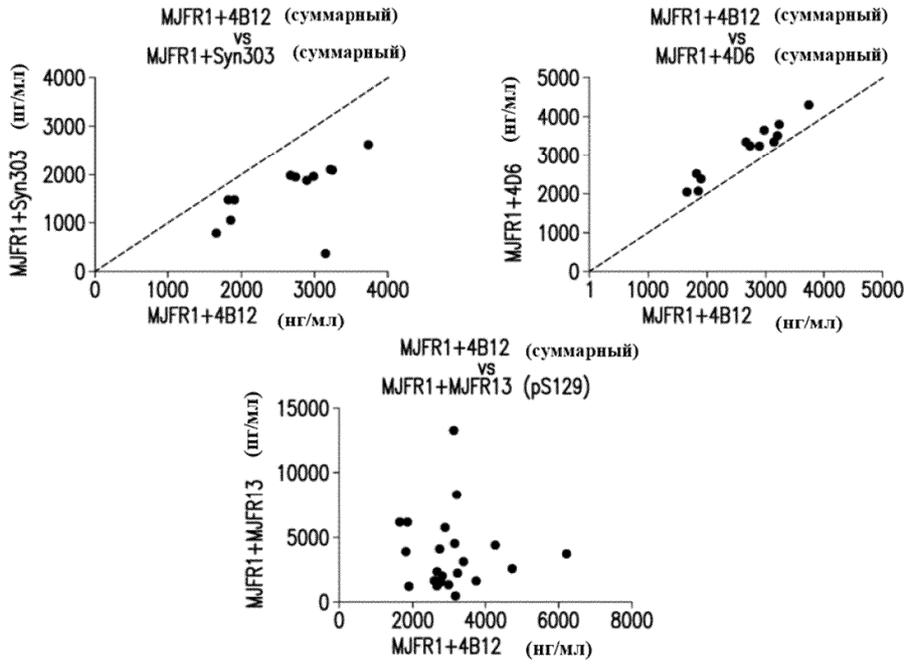
Фиг. 31



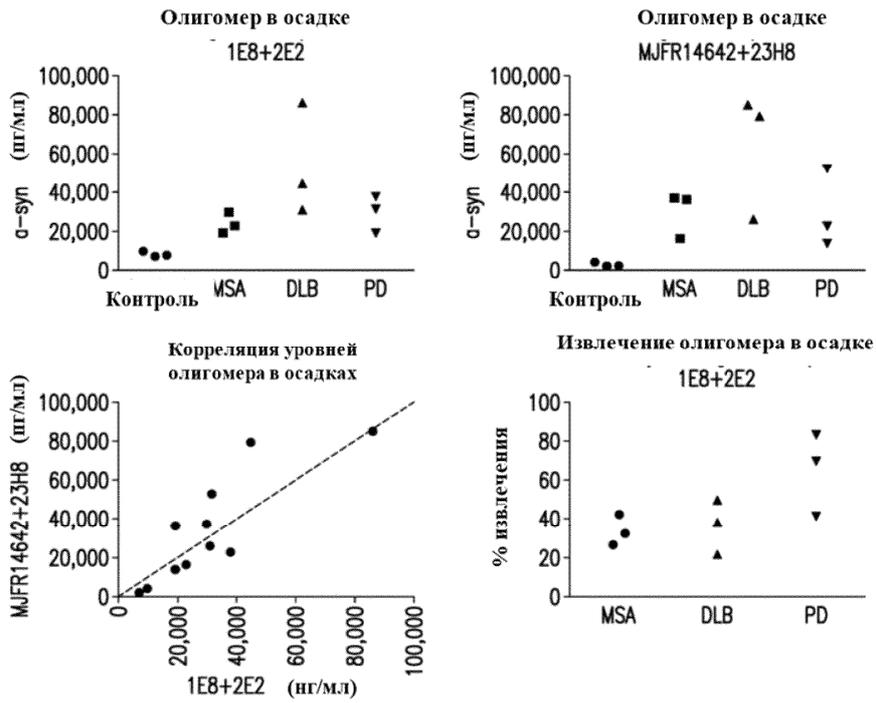
Фиг. 32



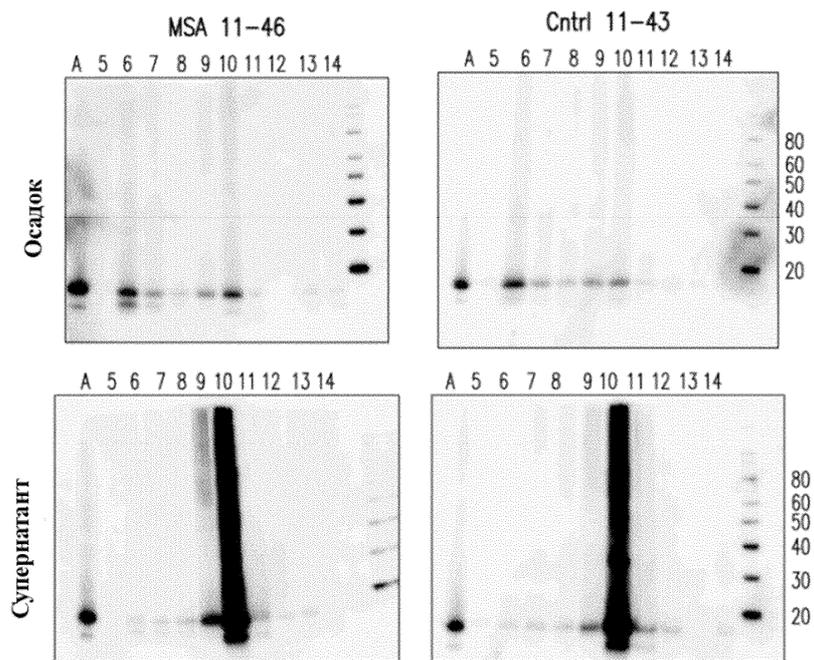
Фиг. 33



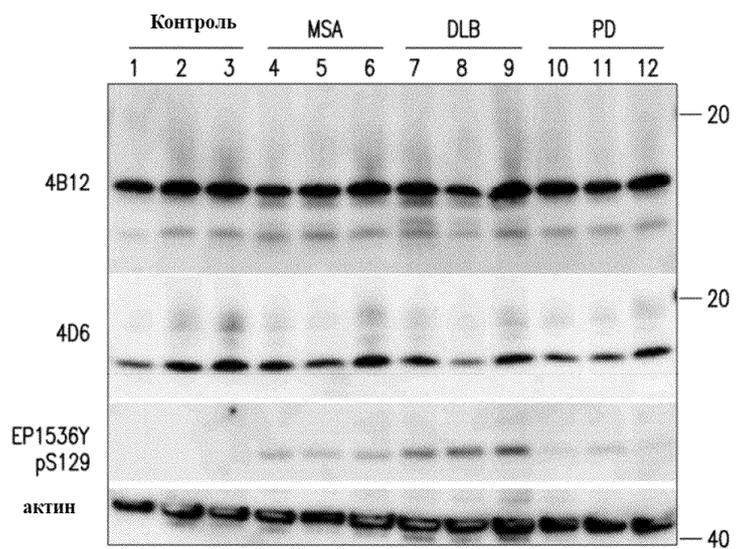
Фиг. 34



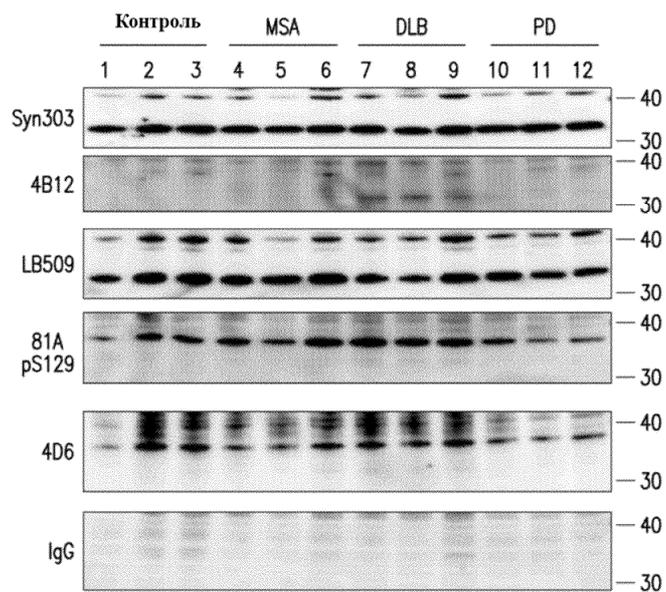
Фиг. 35



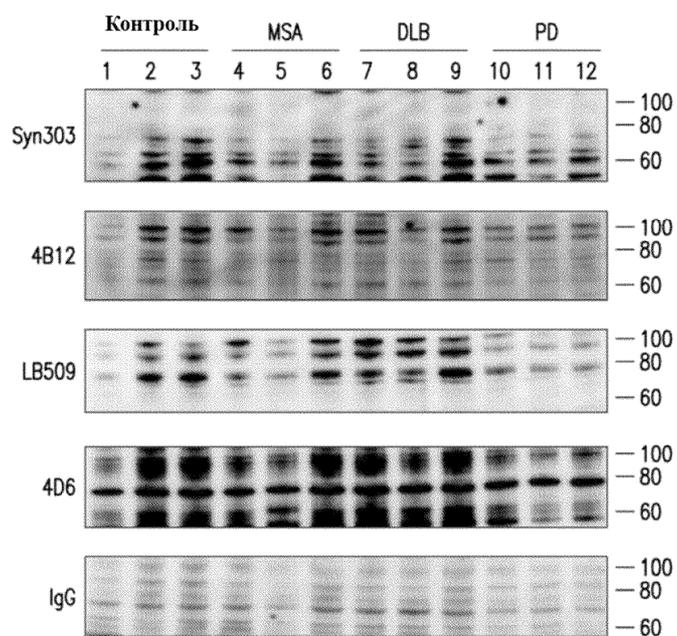
Фиг. 36



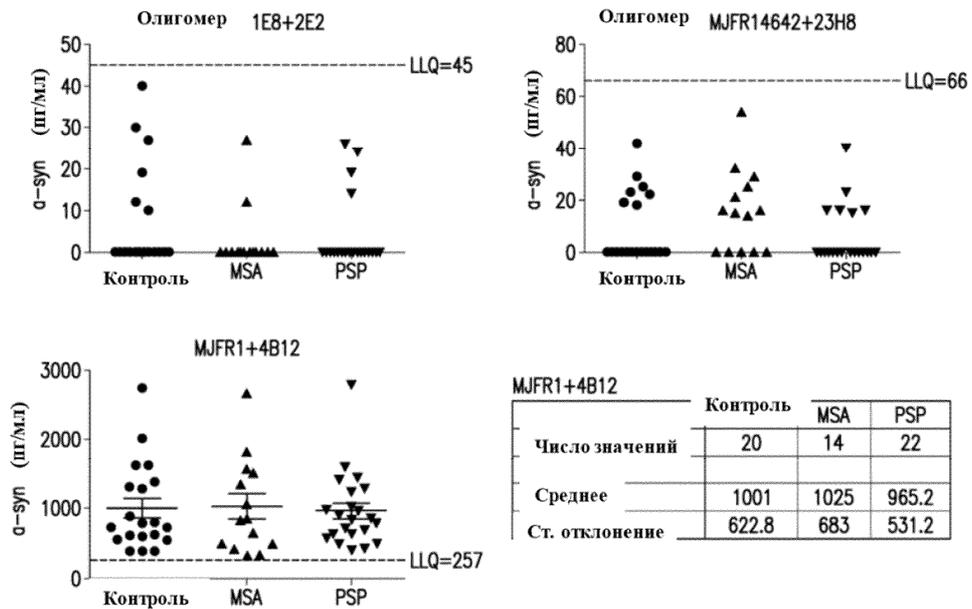
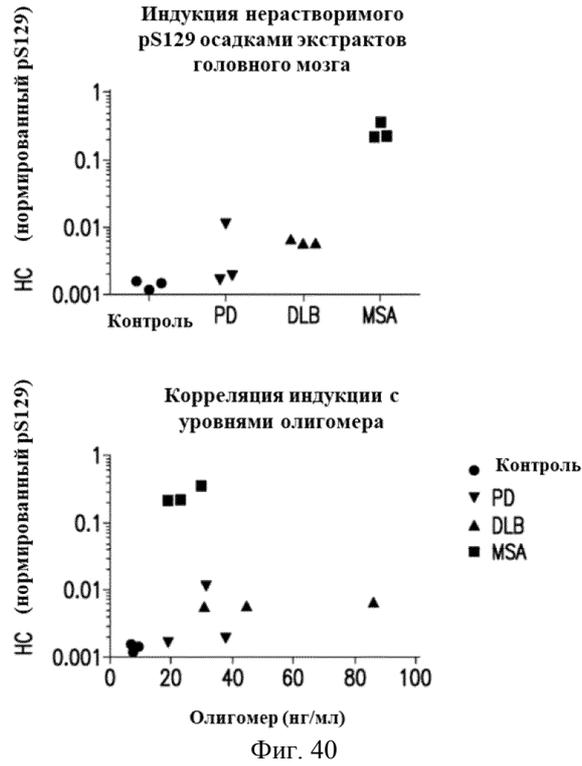
Фиг. 37

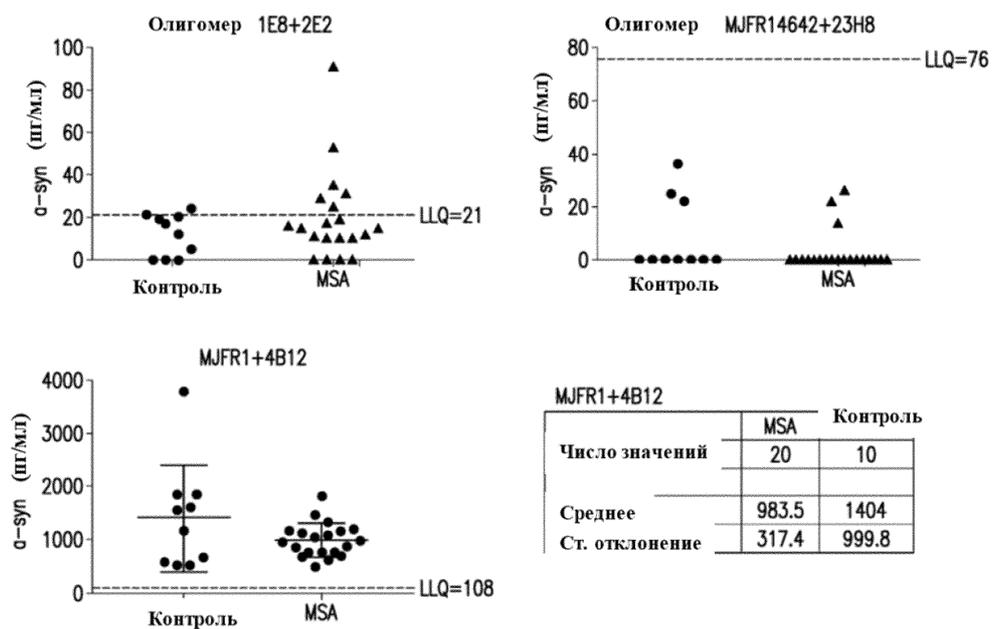


Фиг. 38



Фиг. 39





Фиг. 42

