

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045348**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.17

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(21) Номер заявки
202091183

(22) Дата подачи заявки
2018.12.14

(54) БИСПЕЦИФИЧНОЕ АНТИТЕЛО К α -SYN/IGF1R И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **10-2017-0172205; 62/693,474;
62/734,391; 62/734,388**

(56) KR-A-1020120047274
KR-A-1020150063447
KR-A-1020140125409
US-B2-9534044
US-A1-20110014117

(32) **2017.12.14; 2018.07.03; 2018.09.21;
2018.09.21**

(33) **KR; US; US; US**

(43) **2020.09.24**

(86) **PCT/KR2018/015953**

(87) **WO 2019/117684 2019.06.20**

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

(72) Изобретатель:
**Ан Чжинхён, Ан Сонвон, Ким Донин,
Сон Ынсилъ, Ом Джахён, Ли Сан Хун,
Ю Вонкю, Ким Джухи, Пак Кёнджин,
Чон Хёчжин, Чон Джинвон, Ли Бора,
Сон Бёндже, Ким Ёнчжу, Сон Ён-
гю, Ан Сэвон, Сон Дэхе, Ю Джисон,
Пак Ёндон, Ём Донхун, Ли Ёсоп, Чон
Джехо (KR)**

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

(57) Изобретение относится к биспецифичному антителу, специфично связывающемуся с α -синуклеином и IGF1R, и к применению указанного биспецифичного антитела в предотвращении, лечении и/или диагностике α -синуклеинопатий, представляющих собой заболевания, связанные с α -синуклеином или его агрегатами. В изобретении антитело к α -суп или его антигенсвязывающий фрагмент могут проходить через гематоэнцефалический барьер и оказывать свое действие в головном мозге, а период их полувыведения увеличен, благодаря чему они могут сохранять свою медицинскую эффективность на протяжении длительного периода времени.

B1**045348****045348****B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к биспецифичному антителу против альфа-синуклеина и IGF1R, к фармацевтической композиции для предотвращения и/или лечения синуклеинопатий (α -синуклеинопатий), содержащей указанное биспецифичное антитело, и к способу выявления агрегатов альфа-синуклеина или предоставления информации для диагностики альфа-синуклеинопатий, включающему указанное биспецифичное антитело.

Предшествующий уровень техники

Альфа-синуклеин (α -синуклеин, α -syn) экспрессируется преимущественно в пресинаптических окончаниях нейронов и в нормальных условиях представляет собой естественным образом развернутый мономер. Альфа-синуклеин способствует регуляции высвобождения дофамина, который является нейромедиатором, контролирующим произвольные или непроизвольные движения. В частности, функция альфа-синуклеина важна при повышении синаптической активности и старении и является важным фактором нейродегенерации.

Тем не менее, в патологическом состоянии альфа-синуклеин претерпевает структурные изменения посредством связывания и взаимодействия с каплями, фосфолипидными бислоями или липидными мембранами с образованием свернутой или свернутой α -спиральной вторичной структуры, в результате чего его количество кратно уменьшается. Образуются агрегаты, содержащие молекулы в форме димеров, олигомеров и/или волокон.

Известно, что эти агрегаты альфа-синуклеина оказывают токсическое действие на клетки и являются основным компонентом аномальных белковых агрегатов телец Леви, обнаруженных в нейронах при болезни Паркинсона (БП), деменции при болезни Паркинсона (ДБП), мультисистемной атрофии (МСА), деменции с тельцами Леви (ДТЛ) и различных заболеваниях. Также известно, что посттрансляционные модификации альфа-синуклеина, такие как фосфорилирование или убиквитинирование, также ассоциированы с образованием агрегатов альфа-синуклеина и их нейротоксичностью. Известно, что альфа-синуклеин приводит к гибели дофаминовых нейронов, индуцирует воспалительные реакции в экспериментах на животных и клетках и вызывает двигательные симптомы, сходные с болезнью Паркинсона, у экспериментальных животных. Кроме того, известно, что образование агрегатов альфа-синуклеина связано с этиологией группы нейродегенеративных заболеваний, называемых α -синуклеинопатиями, включая болезнь Паркинсона, деменцию при болезни Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, мультисистемную атрофию и многие другие нейроаксональные заболевания.

В качестве методов иммунотерапии синуклеиновых заболеваний были предложены антитела к альфа-синуклеину или фрагменты альфа-синуклеина для индукции таких антител. Однако проникновение антител в головной мозг может быть ограничено гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ).

Кроме того, дефицит высоко специфичных переносчиков через ГЭБ привел к задержке разработки новых терапевтических и диагностических средств для лечения и диагностики заболеваний, возникающих в головном мозге, включая опухоли головного мозга и нейродегенеративные заболевания. Существует отчетливая потребность в способе доставки терапевтических и диагностических молекул в фармацевтически эффективной дозе в головной мозг без нарушения физиологии и гомеостаза ГЭБ.

Подробное описание изобретения

Техническая проблема.

Согласно одному воплощению настоящего изобретения предложен белковый комплекс, содержащий антигенсвязывающую область против альфа-синуклеина (α -syn) и антигенсвязывающую область против IGF1R, или способ получения указанного белкового комплекса.

Согласно другому воплощению предложен полинуклеотид, кодирующий указанный белковый комплекс, рекомбинантный вектор, содержащий указанный полинуклеотид, и рекомбинантная клетка, содержащая указанный рекомбинантный вектор.

Согласно другому воплощению предложено биспецифичное антитело против α -syn и IGF1R, полученное из указанного белкового комплекса, и способ получения указанного биспецифичного антитела.

Согласно другому воплощению предложена фармацевтическая композиция для предотвращения и/или лечения альфа-синуклеинопатий, содержащая указанное биспецифичное антитело против α -syn и IGF1R и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Предложен способ доставки лекарственных средств, применяемых для диагностики, лечения или предотвращения альфа-синуклеинопатий, в головной мозг с использованием антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению.

Техническое решение

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно.

Одно воплощение настоящего изобретения представляет собой белковый комплекс, содержащий антигенсвязывающую область для альфа-синуклеина (α -syn) и антигенсвязывающую область для IGF1R, и биспецифичное антитело против альфа-синуклеина и IGF1R (далее биспецифичное антитело против α -syn/против IGF1R), полученное из указанного белкового комплекса. Таким образом, биспецифичное антитело по настоящему изобретению может распознавать и связывать, в качестве антигенов, как альфа-синуклеин, так и IGF1R.

Биспецифичное антитело против α -syn/против IGF1R по настоящему изобретению содержит антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент и специфично распознает и связывается с альфа-синуклеином, в особенности с С-концевой областью альфа-синуклеина, благодаря чему его используют для предотвращения, лечения и/или диагностики заболеваний, связанных с альфа-синуклеином или агрегатами альфа-синуклеина, то есть альфа-синуклеинопатий.

Согласно настоящему изобретению, термин "синуклеинопатии" включает все нейродегенеративные расстройства, характеризующиеся патологическими агрегатами синуклеина. В общую группу синуклеинопатий включают болезнь Паркинсона, деменцию при болезни Паркинсона (ДБП), деменцию с тельцами Леви (ДТЛ), болезнь телец Леви, деменцию, сопровождающуюся тельцами Леви, синдром Паркинсона с деменцией, мультисистемную атрофию (МСА), множественную атрофию нервной системы и нейродегенерацию I типа с накоплением железа в головном мозге (NBIA I типа). Кроме того, агрегаты альфа-синуклеина также были вторично обнаружены при болезни Альцгеймера (Kim et al. *Alzheimer's Research & Therapy* 2014, 6:73).

Синуклеинопатии представляют собой разнородную группу нейродегенеративных расстройств со сходными патологическими признаками. В нейропатологическом аспекте, можно обнаружить отчетливые очаги в форме аномальных агрегатов альфа-синуклеина в отдельных группах нейронов и олигодендроцитов. альфа-синуклеин (ранее известный как PARK1 и PARK4) представляет собой белок, содержащий 140 аминокислот, который широко экспрессируется в неокортексе, гиппокампе, зубчатой извилине, задней нейросфере, полосатом теле, таламусе и мозжечке. Экспрессия альфа-синуклеина также высока в кроветворных клетках, включая моноциты, такие как В-клетки, Т-клетки, НК-клетки и тромбоциты. Его точная роль в этих клетках неизвестна, но она связана с дифференцировкой мегакариоцитов (предшественников тромбоцитов).

В настоящем описании "заболевание, ассоциированное с агрегатами альфа-синуклеина", представляет собой группу нейродегенеративных заболеваний, называемых синуклеинопатиями, с агрегатами альфа-синуклеина в патологических очагах, включая нейроны и глию, и такими характеристиками, как дегенерация дофаминовой системы, изменения двигательных функций, расстройство когнитивных функций и образование телец Леви и/или нейритов Леви (Kim et al. *Alzheimer's Research & Therapy* 2014, 6:73; McKeith et al., *Neurology* (1996) 47:1113-24). Эти заболевания включают, без ограничения, болезнь Паркинсона, деменцию при болезни Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви, сочетание болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона, мультисистемную атрофию и многие другие нейроаксональные заболевания. В одном воплощении антитело по настоящему изобретению эффективно используют для лечения болезни Паркинсона.

Кроме того, биспецифичное антитело против α -syn/против IGF1R по настоящему изобретению содержит антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент, благодаря чему антитело против α -syn или его антигенсвязывающий фрагмент могут проникать через гематоэнцефалический барьер для оказания своего действия и имеют больший период полувыведения, сохраняя эффективность на протяжении длительного времени.

Более того, биспецифичное антитело против α -syn/ против IGF1R по настоящему изобретению связывается с IGF1R на поверхности клеток, не влияя на его связывание с лигандом, и не оказывает влияния на сигнальный путь IGF1R. Поскольку оно не ингибирует связывание IGF1R с его лигандом и передачу сигналов через IGF1R, оно может быть использовано в качестве переносчика для проникновения через гематоэнцефалический барьер.

В частности, антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению специфично распознают IGF1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1-го типа) и связываются с IGF1R, в частности с человеческим IGF1R, мышинным IGF1R, крысиным IGF1R и IGF1R обезьяны. Тем не менее, они не препятствуют связыванию лигандов IGF1R, таких как IGF-1, IGF-2 и/или инсулин, с IGF1R, не ингибируют передачу сигналов через IGF1R и могут быть использованы для транзитоза с целью прохождения через ГЭБ. Они не обладают антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC) и, таким образом, не снижают уровни IGF1R в головном мозге даже при их многократном введении животным, благодаря чему они нетоксичны.

В частности, антитело против IGF1R по настоящему изобретению связывается с IGF1R, расположенным на поверхности эндотелиальных клеток головного мозга, образующих ГЭБ, и проходит интернализацию, проникая во внутреннюю часть клетки. Например, интернализацию антитела против IGF1R по настоящему изобретению клетками можно выявить с использованием клеточной линии, экспрессирующей IGF1R (например, MCF-7). Антитела против IGF1R по настоящему изобретению, например, 1564, 48G5, 54H4, 60H6, B11 и аффинные варианты 1564, такие как C04, F06, VH2, VH5, VH7, VH9, VH16, VH32 и VH35, имеют более высокую степень интернализации по сравнению с отрицательным контролем. Полученные результаты показывают, что степень интернализации проанализированных антител против IGF1R специфична относительно IGF1R на поверхности клеток. Кроме того, антитело против IGF1R по настоящему изобретению имеет форму scFv и может быть получено связанным с терапевтическим антителом различными способами. Например, scFv антитела против IGF1R может быть полу-

чен в составе биспецифичного антитела, например, бивалентной формы биспецифичного антитела, где с С-концом терапевтического антитела, например, антитела к α -syn, связаны два scFv, или моновалентной формы биспецифичного антитела, где с С-концом терапевтического антитела связан один scFv. Оба из этих биспецифичных антител могут быть интернализированы клетками, экспрессирующими IGF1R. Антитело к IGF1R имеет высокую аффинность связывания с антигеном на поверхности клеток, что усиливает эффект интернализации и приводит к способности проходить через ГЭБ. Тем не менее, если антитело обладает способностью проходить через ГЭБ и препятствует передаче сигналов через IGF1R, оно может вызывать побочные эффекты. Антитело по настоящему изобретению характеризуется как связывающей способностью, подходящей для прохождения через ГЭБ, так и отсутствием блокировки передачи сигналов через IGF1R.

Антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент обладают отличным свойством простоты их разработки. В этом аспекте, посттрансляционные модификации, такие как дезамидирование, происходящие в области CDR антитела против IGF1R и снижающие стабильность и эффективность антитела, должны быть устранены. Замена аминокислоты, по которой происходит дезамидирование, позволяет повысить стабильность и эффективность антитела по сравнению с исходным антителом без изменения способности к связыванию с ECD антигена IGF1R. Замена Asn сайта дезамидирования на другие остатки, включая Q, N и K, один за другим, получают мутанты и сходство аффинности связывания мутантов с аффинностью исходного антитела подтверждают по результатам ELISA-анализа аффинности связывания мутантов с IGF1R.

Кроме того, при связывании с биологически активным веществом, действующим в головном мозге, антитело против IGF1R по настоящему изобретению может улучшать его способность к проникновению через ГЭБ и эффективность по сравнению с тем же биологически активным веществом самим по себе.

Антитело против IGF1R согласно одному аспекту настоящего изобретения может быть использовано как биспецифичное антитело, содержащее различные вторые терапевтические антитела. В эксперименте проникновения через *in vitro* ГЭБ-систему, имеющую происхождение от человеческих iPSC (фиг. 16а), было показано, что по сравнению с одиночным антителом, состоящим только из терапевтического антитела, оно усиливает проникновение через ГЭБ в 15 раз. Антитело против IGF1R может быть связано со вторым антителом в биспецифичном антителе в моновалентной или бивалентной форме. Например, при анализе количества антитела в крови и СМЖ после однократного введения биспецифичного антитела с антителом против IGF1R в моновалентной форме или бивалентной форме нормальным крысам моновалентная форма и бивалентная форма антител против IGF1R продемонстрировали увеличение количества в крови до 5 раз и увеличение количества в СМЖ до 5 раз по сравнению с исходным антителом против IGF1R (клон 1564). Они продемонстрировали увеличение количества в СМЖ приблизительно в 3 раза и повышение проникновения в головной мозг приблизительно в 4,5 раза по сравнению с исходным антителом против IGF1R (клон 1564) (фиг. 16с). Поэтому ожидается, что биспецифичное антитело, содержащее антитело против IGF1R, усовершенствованное указанным выше способом, демонстрирует увеличение количества антитела в СМЖ приблизительно до 15 раз и повысит его способность к проникновению в головной мозг приблизительно до 23 раз по сравнению с одиночным антителом, состоящим из второго терапевтического антитела самого по себе.

Было установлено, что антитело против IGF1R по настоящему изобретению связывается с IGF1R, в частности с IGF1R млекопитающих, включая людей, обезьян, крыс и мышей, и, таким образом, может быть полезным для скрининга при разработке лекарственных средств, для клинических исследований и тому подобного.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично распознающие IGF1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1-го типа).

Подразумевают, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению "специфично связываются" со своей мишенью, такой как антиген, когда они связываются с ней с константой диссоциации (K_D) 10^{-6} М или менее. Антитело специфично связывается с мишенью с высокой аффинностью, когда K_d составляет 1×10^{-8} М или менее или когда его средняя эффективная концентрация (EC_{50}) составляет 2 нМ или менее. В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с IGF1R или человеческим IGF1R с K_D 1×10^{-8} или менее. Было обнаружено, что антитела, раскрытые здесь, связываются с IGF1R, особенно с человеческим IGF1R, мышиным IGF1R, крысиным IGF1R и IGF1R обезьяны.

При использовании здесь термин "эпитоп" представляет собой антигенную детерминанту, интерпретируемую как означающая часть антигена, распознаваемого антителом. Согласно одному воплощению, сайт связывания антитела против IGF1R по настоящему изобретению может представлять собой внеклеточный домен белка IGF1R, например, человеческого белка IGF1R (SEQ ID NO:99). Конкретнее, сайты связывания антитела против IGF1R по настоящему изобретению, например, клон 1564 антитела к человеческому белку IGF1R, представляют собой сайт связывания 1, содержащий Y775, P776, F778, R650, S791, L798 и Glu779, сайт связывания 2, содержащий L641, H808, E809 и L813, и сайт связывания

3, содержащий V397, D435, W434, Y460 и C488 в белке, состоящем из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:99. Таким образом, эпитоп антитела к IGF1R по настоящему изобретению может представлять собой конформационный эпитоп, содержащий все или часть из этих трех сайтов связывания.

При использовании здесь термин "антитело" относится к веществу, полученному стимуляцией иммунной системы антигеном, и оно может, без ограничения, быть получено *in vivo*, получено рекомбинантным методом или синтезировано искусственно. В настоящем изобретении антитела включают антитела животных, химерные антитела, гуманизированные антитела и человеческие антитела. Кроме того, в настоящем изобретении антитело также включает антигенсвязывающий фрагмент антитела, обладающий антигенсвязывающей способностью.

Антитело также включает моноклональное антитело и поликлональное антитело, и моноклональное антитело может быть человеческим антителом, гуманизированным антителом или химерным антителом, представляющим собой выделенное антитело, специфично связывающееся с IGF1R. Моноклональное антитело представляет собой выделенное антитело типа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, связывающееся с IGF1R.

Антитела по настоящему изобретению включают, без ограничения, биспецифичные антитела, минитела, доменные антитела, миметики антител (или синтетические антитела), слитые антитела (или конъюгаты антител) и их фрагменты. Структура различных антител дополнительно раскрыта ниже.

При использовании здесь термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к части антитела или полипептиду, содержащему указанную часть, обладающим специфичной аффинностью связывания с антигеном. Например, часть антитела содержит аминокислотный остаток, обеспечивающий специфичность и аффинность в отношении антигена посредством взаимодействия с антигеном. Эта антигенсвязывающая область обычно содержит одну или более чем одну "определяющую комплементарность область (CDR)". Специфичная антигенсвязывающая область также содержит одну или более чем одну "каркасную область (FR)". CDR представляют собой аминокислотные последовательности, способствующие специфичности и аффинности связывания с антигеном. Каркасные области способствуют поддержанию подходящей конформации этих CDR, облегчая посредством этого связывание антигенсвязывающей области с антигеном.

В настоящем изобретении "определяющие комплементарность области (CDR)" обозначают области, придающие переменным областям антитела специфичность связывания с антигеном.

Антитело может быть выбрано из всех подтипов иммуноглобулинов (например, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM и так далее). IgG-форма антитела может представлять собой антитело подтипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, например, подтипа IgG1 или IgG2. Антитело типа IgG содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, каждая тяжелая цепь и легкая цепь соединены дисульфидными связями с образованием двух димеров "тяжелая цепь - легкая цепь", и два образованных димера "тяжелая цепь - легкая цепь" соединены дисульфидной связью в Fc-области тяжелой цепи. IgG-форма антитела включает антитело к одной мишени, направленное на один антиген, где обе конструкции "тяжелая цепь - легкая цепь" содержат сайты связывания одного и того же антигена, или биспецифичное антитело, направленное на два антигена, где конструкции "тяжелая цепь - легкая цепь" содержат сайты связывания различных антигенов.

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" цепи (тяжелой цепи или легкой цепи) антитела или иммуноглобулина включает часть антитела, которая не имеет некоторых аминокислот по сравнению с полноразмерной цепью, но может специфично связываться с антигеном. Этот фрагмент можно рассматривать как обладающий биологической активностью, в том аспекте, что он может специфично связываться с антигеном-мишенью или может конкурировать с другими антителами или антигенсвязывающими фрагментами за связывание с определенным эпитопом. Конкретно, антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из фрагментов антител, содержащих одну или более чем одну определяющую комплементарность область, таких как, без ограничения, scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' и F(ab')₂. Такие биологически активные фрагменты могут быть получены технологией рекомбинантных ДНК или могут быть получены ферментативным или химическим расщеплением интактных антител. Иммунологически функциональные фрагменты иммуноглобулинов не ограничены указанными фрагментами.

В настоящем изобретении, например, "вариант" полипептида, такого как антигенсвязывающий фрагмент, белок или антитело, представляет собой полипептид, в котором присутствует вставка, делеция, присоединение и/или замена одного или более чем одного аминокислотного остатка по сравнению с другими полипептидными последовательностями, и включает слитые полипептиды. Например, некоторые антитела содержат консервативные аминокислотные замены одного или более чем одного остатка тяжелой или легкой цепи, переменной области или последовательности CDR.

Термин "производное" полипептида в настоящем изобретении обозначает полипептид, химически модифицированный посредством конъюгации с другими химическими группировками и отличный от вариантов с вставками, делециями, присоединениями или заменами.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению не предотвращают связывание лигандов IGF1R, таких как IGF-1, IGF-2 и/или инсулин, с IGF1R. Конкретно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R обеспечивают преимущество, состоящее в

том, что они не препятствуют связыванию лиганда IGF1R с IGF1R, расположенным на мембране клеток, экспрессирующих IGF1R, а также не ингибируют передачу сигналов через IGF1R и не влияют на экспрессию IGF1R на поверхности клеток. Таким образом, антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению могут быть эффективно использованы для проникновения через гематоэнцефалический барьер посредством трансцитоза.

Человеческий IGF1R может быть активирован инсулиноподобными факторами роста IGF-1 и IGF-2 и инсулином (INS). Передача сигналов через IGF1R стимулирует рост и выживание клеток через адаптерный белок IRS, от которого зависит активация пути PI3-киназы/Akt. IGF1R передает сигналы своим основным субстратам IRS-1, IRS-2, IRS-3 и IRS-4 и белкам Shc, что приводит к активации сигнальных путей Ras /Raf/MAP-киназы и PI3-киназы/Akt. Было показано, что IGF1R имеет относительно высокий уровень экспрессии в головном мозге по сравнению с другими мишенями для трансцитоза, экспрессия которых подтверждена в эндотелиальных клетках головного мозга, используемыми в настоящее время для повышения способности к проникновению через ГЭБ.

Антитело против IGF1R по настоящему изобретению не препятствует связыванию IGF1, IGF2 и/или инсулина с IGF1R и не препятствует передаче сигналов через путь IGF1R, как описано выше. Кроме того, в одном воплощении настоящего изобретения, при сравнении IGF1R с другими мишенями, разрабатываемыми в настоящее время с целью повышения способности терапевтических антител к проникновению через ГЭБ, например, рецептором трансферрина или рецептором инсулина, было показано, что он имеет относительно низкий уровень экспрессии в нормальном головном мозге и периферических тканях, таких как печень, легкие или толстая кишка.

IGF1R является мишенью при рецептор-опосредованном трансцитозе (RTM), позволяющем доставлять полезные вещества через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в головной мозг. Однако для его использования в качестве мишени при доставке лекарственных средств посредством их проникновения через гематоэнцефалический барьер желателно связывание с IGF1R на поверхности клеток без влияния на его связывание с лигандом и передачу сигналов через путь IGF1R. Поэтому антитело против IGF1R и его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению не ингибируют связывание IGF1R с его лигандом и передачу сигналов через IGF1R, благодаря чему они могут быть использованы в качестве переносчиков для проникновения через гематоэнцефалический барьер.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению способны к трансцитозу и могут проходить через эндотелиальные клетки головного мозга. Кроме того, после его введения в кровеносный сосуд мышцы антитело по настоящему изобретению локализуется в том же месте, что и кровеносные сосуды головного мозга мышцы. Эти результаты показывают, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть эффективно использованы в качестве носителя лекарственного средства, который проходит через гематоэнцефалический барьер.

Таким образом, антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению позволяют биологически активному веществу, действующему в головном мозге, проходить через гематоэнцефалический барьер. В настоящем изобретении биологический барьер относится к клеткам, тканям, мембранам или клетке, мембране или структуре, предотвращающим эффективное прохождение, диффузию или перенос биологической молекулы. Эти биологические барьеры включают нервные клетки/ткани, соединительную ткань, мышцы, мембраны или эпителиальные клетки (например, слизистых оболочек или сосудов). Типичным примером является гематоэнцефалический барьер.

В настоящем изобретении термин "гематоэнцефалический барьер" или ГЭБ представляет собой барьер, образованный плотными контактами в эндотелиальной мембране капилляров головного мозга, который отделяет головной мозг и спинной мозг от окружающей их кровеносной системы. Этот барьер настолько сильный, что он ограничивает прохождение в головной мозг даже тех молекул, молекулярная масса которых мала и составляет приблизительно 60 Да. Гематоэнцефалический барьер головного мозга, сосудистый барьер спинного мозга и сосудистый барьер сетчатки представляют собой непрерывные капиллярные барьеры центральной нервной системы, и их обычно обозначают как ГЭБ.

В настоящем изобретении "переносчик через гематоэнцефалический барьер" может проходить через гематоэнцефалический барьер и обеспечивать доставку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению и, например, включает белок, в том числе пептид и полипептид, нуклеиновую кислоту, антитело или низкомолекулярное соединение.

Получение и отбор антител по настоящему изобретению могут быть проведены в трансгенных мышцах, например, описанных выше, где мышам вводят ген, кодирующий антиген-специфичные человеческие mAb с желаемой специфичностью с применением гибридомной технологии. Такие антитела могут быть клонированы и экспрессированы с использованием подходящих векторов и клеток-хозяев, или антитела могут быть получены из культивированных гибридомных клеток. Кроме того, антитело может иметь происхождение от фаговой дисплейной библиотеки. Технология фагового дисплея представляет собой метод, имитирующий, в некоторой степени, иммунный отбор посредством селекции репертуара антител на поверхности нитчатых бактериофагов и отбора из них тех фагов, которые связываются с желаемым антигеном. Такая методика может относиться к воплощению настоящего изобретения или РСТ-публикации № WO 1999/010494. В одном воплощении отбор гуманизированного антитела к IGF1R по настоящему изобретению проводят методом фагового дисплея.

Настоящее изобретение относится к выделенному антителу или антигенсвязывающему фрагменту, специфично связывающимся с IGF1R, которые могут представлять собой полипептид, белок, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающиеся с IGF1R, содержащие определяющие комплементарность области тяжелой цепи и определяющие комплементарность области легкой цепи.

Далее это описано конкретно для антител, специфично связывающихся с IGF1R.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению специфично распознают IGF1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1-го типа), распознают и связываются с IGF1R, в частности с человеческим IGF1R, мышинным IGF1R, крысиным IGF1R и IGF1R обезьяны, не препятствуют связыванию IGF1R, IGF-1R, IGF-2 и/или инсулина с IGF1R, не ингибируют передачу сигналов через IGF1R и могут быть использованы для трансцитоза с целью прохождения барьера в крови. Они не обладают антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC) и не снижают уровни IGF1R в головном мозге даже при их многократном введении животным.

В частности, антитело против IGF1R по настоящему изобретению связывается с IGF1R, расположенным на поверхности эндотелиальных клеток головного мозга, образующих ГЭБ, и проходит интернализацию, проникая во внутреннюю часть клетки. Например, интернализацию антитела против IGF1R по настоящему изобретению клетками можно выявить с использованием клеточной линии, экспрессирующей IGF1R (например, MCF-7). Антитела против IGF1R по настоящему изобретению, например, 1564, 48G5, 54H4, 60H6, B11 и аффинные варианты 1564, такие как C04, F06, VH2, VH5, VH7, VH9, VH16, VH32 и VH35, имеют более высокую степень интернализации по сравнению с отрицательным контролем. Полученные результаты показывают, что степень интернализации проанализированных антител против IGF1R специфична относительно IGF1R на поверхности клеток. Кроме того, антитело против IGF1R по настоящему изобретению имеет форму scFv и может быть получено связанным с терапевтическим антителом различными способами. Например, scFv антитела против IGF1R может быть получен в составе биспецифичного антитела, например, бивалентной формы биспецифичного антитела, где с С-концом терапевтического антитела, например, антитела к α -syn, связаны два scFv, или моновалентной формы биспецифичного антитела, где с С-концом терапевтического антитела связан один scFv. Биспецифичные антитела могут быть интернализированы клетками, экспрессирующими IGF1R. Антитело к IGF1R имеет высокую способность к связыванию с антигеном на поверхности клеток, что усиливает эффект интернализации и приводит к способности проходить через ГЭБ. Однако, если антитело обладает способностью проходить через ГЭБ и препятствует передаче сигналов через IGF1R, оно может вызывать побочные эффекты. Антитело по настоящему изобретению характеризуется как связывающей способностью, подходящей для прохождения через ГЭБ, так и отсутствием блокировки передачи сигналов через IGF1R.

Настоящее изобретение относится к выделенному антителу или антигенсвязывающему фрагменту, специфично связывающимся с IGF1R, которые могут представлять собой полипептид, белок или антитело, специфично связывающиеся с IGF1R, содержащие определяющие комплементарность области тяжелой цепи и определяющие комплементарность области легкой цепи.

В конкретных примерах антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать:

(i) одну или более чем одну определяющую комплементарность область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, описанные в табл. 1, или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую указанную одну или более чем одну определяющую комплементарность область тяжелой цепи;

(ii) одну или более чем одну определяющую комплементарность область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, описанные в табл. 1, или вариабельную область легкой цепи, содержащую указанную одну или более чем одну определяющую комплементарность область легкой цепи;

комбинацию одной или более чем одной определяющей комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и одной или более чем одной определяющей комплементарность области (CDR) легкой цепи; или комбинацию вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи.

Кроме того, в указанных вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области легкой цепи или комбинации вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи вариабельная область тяжелой цепи может содержать одну или более чем одну каркасную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4, а вариабельная область легкой цепи может содержать одну или более чем одну каркасную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4.

(1) H-CDR1, H-CDR2 или H-CDR3 тяжелой цепи по настоящему изобретению выбраны из аминокислотных последовательностей, перечисленных в табл. 1, или содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, по существу идентичную выбранной аминокислотной последовательности. Кроме того, (ii) L-CDR1, L-CDR2 или L-CDR3 легкой цепи выбраны из аминокислотных последовательностей, перечисленных в табл. 2, или содержат одну или более чем одну аминокислотную последовательность, по существу идентичную выбранной аминокислотной последовательности.

Идентичность последовательности по существу означает, что последовательность содержит изменения, но сохраняет эффекты, раскрытые в настоящем изобретении. Указанная последовательность идентична вариательной области тяжелой цепи, раскрытой в одном из воплощений, приблизительно на 90%, 95% или 99%. Указанная последовательность идентична вариательной области легкой цепи, раскрытой в других воплощениях, приблизительно на 90%, 95% или 99%. Например, в случае варианта, демонстрирующего приблизительно 90%, 95% или 99% идентичность последовательности антитела или антигенсвязывающего фрагмента, раскрытых в настоящем изобретении, любое изменение последовательности происходит в каркасной области вариательной области, но не в CDR.

Таблица 1

Последовательности CDR вариательной области тяжелой цепи в клоне антитела по изобретению

Идентификатор клона	CDR-H1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H3	SEQ ID NO:
996-1	GFTFSSYDMS	1	GIYHDGSSTYYADSVKG	10	VSGTLSEPYAFFFNAMDV	50
996-2	GFTFSSYDMS	1	GIYHDGSSTYYADSVKG	10	VSGTLSEPYAFFFNAMDV	50
1226-1	GFTFSNYDMS	2	SISPDGGSKYYADSVKG	11	DGGTHWLSLFDY	51
1226-2	GFTFSNYDMS	2	SISPDGGSKYYADSVKG	11	DGGTHWLSLFDY	51
1564-1	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
1564-2	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
1564-3P	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
1564-DM	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFYD	52
1564-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFYD	52
48G5-1	GFTFSDYDMS	3	SIYPNGSSKYYADSVKG	14	AGINCTTLRCSSYDAMDV	53
48G5-2	GFTFSDYDMS	3	SIYPNGSSKYYADSVKG	14	AGINCTTLRCSSYDAMDV	53
49G11-1	GFTFSSYDMS	1	GISYSGGSTYYADSVKG	15	VGLACTPHTCSSYDAMDV	54
49G11-2	GFTFSSYDMS	1	GISYSGGSTYYADSVKG	15	VGLACTPHTCSSYDAMDV	54
54H4-1	GFTFSDYDMS	3	AISSDGSSAYYADSVKG	16	ATIYTSDAPWSSYDAMDV	55
54H4-2	GFTFSDYDMS	3	AISSDGSSAYYADSVKG	16	ATIYTSDAPWSSYDAMDV	55
60A11-1	GFTFSNYDMS	2	VISHSSSGTYYADSVKG	17	VGVACGETDCSSYDAMDV	56
60A11-2	GFTFSNYDMS	2	VISHSSSGTYYADSVKG	17	VGVACGETDCSSYDAMDV	56
60H6-1	GFTFSDYDMS	3	MIYSGSSSKYYADSVKG	18	ASIACTLQACSYDNAMDV	57
60H6-2	GFTFSDYDMS	3	MIYSGSSSKYYADSVKG	18	ASIACTLQACSYDNAMDV	57
60H6-3P	GFTFSDYDMS	3	MIYSGSSSKYYADSVKG	18	ASIACTLQACSYDNAMDV	57

A1_ompseq	GFTFSSYDMS	1	AIYHDGGNTYYADSVK G	19	AASPCNVHDCSYDYAMD V	58
A3_ompseq	GFTFSDYDM S	3	GISYNGGSKYYADSVK G	20	VGIMCSETGCSYDNAMDV	59
A6_ompseq	GFTFSDYYM S	4	GISSDGGSIYYADSVK G	21	YASPTWLHILYYSDAMDV	60
A8_ompseq	GFTFSNYDM S	2	MIYSGSSSKYYADSVK G	18	ALIPCTPEGCSYSDAMDV	61
A10_ompseq	GFTFSGYAM S	5	AISSDGGSTYYADSVK G	22	DPWFSRWTAFDY	62
A12_ompseq	GFTFSDYDM S	3	GIYPDGGNIYYADSVK G	23	GIGQCELRECSSDDGMDV	63
B5_ompseq	GFTFSDYDM S	3	AIYYDSGSIYYADSVK G	24	AVSECNPLNCSYSDAMDV	64
B9_ompseq	GFTFSDYDM S	3	MIYSGSSSKYYADSVK G	18	VILGCSKHSCPSSDAMDV	65
B11_ompseq	GFTFSDYDM S	3	AISYDNGNKYYADSVK G	25	AGVACTEHMCSSYDAMD V	66
C2_ompseq	GFTFSSYDMS	1	LIYPGGNIYYADSVK G	26	GRVPCHPGGCSYAYGMDV	67
C6_ompseq	GFTFSNYAM S	6	WISSGGGSTYYADSVK G	27	LGLFPNATASYAYGMDV	68
C7_ompseq	GFTFSNYDM S	2	SISYDSGSKYYADSVK G	28	AGILCTPTHCSSYDAMDV	69
C11_ompseq	GFTFSDYAM S	7	SIYPDDGNTYYADSVK G	29	DGWTPDGTHFDY	70
D4_ompseq	GFTFSDYDM S	3	WISHSSSGTYYADSVK G	30	VGLSCAETACSSYDAMDV	71
E6_ompseq	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVK G	12	VGLDCDTHKCSSYDAMDV	72
E10_ompseq	GFTFSNYDM S	2	VISHSSSGTYYADSVK G	17	VGACGETDCSSYDAMDV	56
E12_ompseq	GFTFSDYDM S	3	WISHSSSGTYYADSVK G	30	VGLSCAETACSSYDAMDV	71
F6_ompseq	GFTFSDYDM S	3	MIYSGSSSKYYADSVK G	18	AVRPTDLHCSSDDAMDV	73
F11_ompseq	GFTFSDYDM S	3	AISYDSGSKYYADSVK G	31	VGRMCNITHCSSYDAMDV	74

045348

F12_ompseq	GFTFSDYDMS	3	SIYYGSGNIYYADSVKG	32	DLTAPDGSSFDY	75
G9_ompseq	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGSSIYYADSVKG	33	VGLECTVEHCYSYDGMVDV	76
C04-1	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
C04-2	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
C04-3P	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
C04-DM	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNNTYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFYD	52
C04-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNNTYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFYD	52
F06-1	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
F06-2	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
F06-3P	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
F06-DM	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNNTYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFYD	52
F06-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNNTYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFYD	52
B01	GFTFSSYDMS	1	AISWDKAQPYADSVKG	34	GVLTTLMNWFYD	52
A07(AR)	GFTFSSYDMS	1	AISWDQGNNTYYADSVKG	35	GVLTTLMNWFYD	52
E09	GFTFSSYDMS	1	AISWGQKNTYYADSVKG	36	GVLTTLMNWFYD	52
D03	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGQNTYYADSVKG	37	GVLTTLMNWFYD	52
A02	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
B09	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
B10	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
E06	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
H04	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
A06	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
A07(AM)	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
B02	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
VH02-1	GFTFSSYAMS	8	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLANWFYD	77
VH02-2	GFTFSSYAMS	8	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLANWFYD	77
VH02-3P	GFTFSSYAMS	8	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLANWFYD	77
VH02-DM	GFTFSSYAMS	8	AISGSQGNNTYYADSVKG	39	GVLTTLANWFYD	77
VH02-DMP	GFTFSSYAMS	8	AISGSQGNNTYYADSVKG	39	GVLTTLANWFYD	77
VH05-1	GFTFSSYDMS	1	AISGDNGSTYYADSVKG	40	GVLTTLMNWFDS	78
VH05-2	GFTFSSYDMS	1	AISGDNGSTYYADSVKG	40	GVLTTLMNWFDS	78
VH05-3P	GFTFSSYDMS	1	AISGDNGSTYYADSVKG	40	GVLTTLMNWFDS	78

VH05-DM	GFTFSSYDMS	1	AISGDQGSTYYADSVKG	41	GVLTTLMNWFDS	78
VH05-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISGDQGSTYYADSVKG	41	GVLTTLMNWFDS	78
VH06-1	GFTFSSYDMS	1	AISYNGNTYYADSVKG	42	GVLTTLANWFDY	77
VH06-2	GFTFSSYDMS	1	AISYNGNTYYADSVKG	42	GVLTTLANWFDY	77
VH06-3P	GFTFSSYDMS	1	AISYNGNTYYADSVKG	42	GVLTTLANWFDY	77
VH06-DM	GFTFSSYDMS	1	AISYQNGNTYYADSVKG	43	GVLTTLANWFDY	77
VH06-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISYQNGNTYYADSVKG	43	GVLTTLANWFDY	77
VH07-1	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFYD	52
VH07-2	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFYD	52
VH07-3	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFYD	52
VH07-DM	GFTFSSYAMS	8	AISYDQGSTYYADSVKG	45	GVLTTLMNWFYD	52
VH07-DMP	GFTFSSYAMS	8	AISYDQGSTYYADSVKG	45	GVLTTLMNWFYD	52
VH09-1	GFTFSSYDMS	1	AISGDNGNTYYADSVKG	46	GVLTTLMNWFYD	52
VH09-2	GFTFSSYDMS	1	AISGDNGNTYYADSVKG	46	GVLTTLMNWFYD	52
VH09-3P	GFTFSSYDMS	1	AISGDNGNTYYADSVKG	46	GVLTTLMNWFYD	52
VH09-DM	GFTFSSYDMS	1	AISGDQGNTYYADSVKG	47	GVLTTLMNWFYD	52
VH09-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISGDQGNTYYADSVKG	47	GVLTTLMNWFYD	52
VH16-1	GFTFSSYDMS	1	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLMNWFYD	52
VH16-2	GFTFSSYDMS	1	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLMNWFYD	52
VH16-3P	GFTFSSYDMS	1	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLMNWFYD	52
VH16-DM	GFTFSSYDMS	1	AISGSQGNTYYADSVKG	39	GVLTTLMNWFYD	52
VH16-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISGSQGNTYYADSVKG	39	GVLTTLMNWFYD	52
VH27-1	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFDS	78
VH27-2	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFDS	78
VH27-3P	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFDS	78
VH27-DM	GFTFSSYAMS	8	AISYDQGSTYYADSVKG	45	GVLTTLMNWFDS	78
VH27-DMP	GFTFSSYAMS	8	AISYDQGSTYYADSVKG	45	GVLTTLMNWFDS	78
VH32-1	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLANWFDY	77
VH32-2	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLANWFDY	77
VH32-3	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLANWFDY	77
VH32-DM	GFTFSSYAMS	8	AISYDQGNTYYADSVKG	13	GVLTTLANWFDY	77
VH32-DMP	GFTFSSYAMS	8	AISYDQGNTYYADSVKG	13	GVLTTLANWFDY	77
VH35-1	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFDS	78
VH35-2	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFDS	78
VH35-3	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFDS	78
VH35-DM	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGSTYYADSVKG	45	GVLTTLMNWFDS	78
VH35-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGSTYYADSVKG	45	GVLTTLMNWFDS	78

VH48	GFTFSSYAMS	8	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLANWFDS	79
VH55	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLANWFDY	77
VH81	GFTFSSYDMS	1	AISGSNGSTYYADSVKG	48	GVLTTLMNWFDY	52
C12	GFTFICPILS	9	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMCLRHL	80
1564-VL(N51D)	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFDY	52
1564-VL(N95aD)	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFDY	52
1564-VL(N95aH)	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFDY	52
1564-VL(N95aK)	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFDY	52
1564-VL(N95aR)	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFDY	52
1564-VH(N54D)	GFTFSSYDMS	1	AISYDDGNTYYADSVKG	49	GVLTTLMNWFDY	52
1564-VH(N54Q)	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNTYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFDY	52

Таблица 2

Последовательности CDR варибельной области легкой цепи в клоне антитела по изобретению

Идентификатор клона	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
996-1	TGSSSNIGSNAVN	96	SNSHRPS	114	ATWDYSLSGYV	133
996-2	TGSSSNIGSNAVN	96	SNSHRPS	114	ATWDYSLSGYV	133
1226-1	TGSSSNIGNNTVS	97	YDNHRPS	115	GSWDASLNGYV	134
1226-2	TGSSSNIGNNTVS	97	YDNHRPS	115	GSWDASLNGYV	134
1564-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
1564-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
1564-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
1564-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
1564-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
48G5-1	SGSSSNIGNNDVS	99	DNNHRPS	118	AAWDDSLNAYV	137
48G5-2	SGSSSNIGNNDVS	99	DNNHRPS	118	AAWDDSLNAYV	137
49G11-1	TGSSSNIGSNTVY	100	SDSNRPS	119	GTWDDSLNGYV	138
49G11-2	TGSSSNIGSNTVY	100	SDSNRPS	119	GTWDDSLNGYV	138
54H4-1	SGSSSNIGSNTVT	101	ADSKRPS	120	GTWDDSLNAYV	139
54H4-2	SGSSSNIGSNTVT	101	ADSKRPS	120	GTWDDSLNAYV	139
60A11-1	SGSSSNIGSNAVT	102	DDNHRPS	121	GAWDDSLNGYV	135
60A11-2	SGSSSNIGSNAVT	102	DDNHRPS	121	GAWDDSLNGYV	135

045348

60H6-1	TGSSSNIGNNDVS	103	ANSHRPS	122	GSWDDSLNGYV	140
60H6-2	TGSSSNIGNNDVS	103	ANSHRPS	122	GSWDDSLNGYV	140
60H6-3	TGSSSNIGNNDVS	103	ANSHRPS	122	GSWDDSLNGYV	140
A1_ompseq	SGSSSNIGNNAVT	104	DDSQRPS	123	GSWDDSLNGYV	140
A3_ompseq	SGSSSNIGNNDVD	105	YDSQRPS	124	GTWDDSLNAYV	139
A6_ompseq	SGSSSNIGNNAVT	104	DDSHRPS	125	GSWDDSLNGYV	141
A8_ompseq	TGSSSNIGNNDVS	103	DDSKRPS	126	GAWDDSLNGYV	135
A10_ompseq	SGSSSNIGNNAVN	106	SNSKRPS	127	GTWDYSLSGYV	142
A12_ompseq	TGSSSNIGNNDVN	107	SNSHRPS	114	GTWDDSLNGYV	138
B5_ompseq	SGSSSNIGNNDVS	99	DDNQRPS	128	ATWDASLNGYV	143
B9_ompseq	SGSSSNIGNNNVT	108	DDSQRPS	123	GSWDDSLNGYV	140
B11_ompseq	SGSSSNIGNNDVS	99	DDNHRPS	121	GAWDYSLSGYV	144
C2_ompseq	SGSSFNIGSNDVS	109	DNSKRPS	129	GTWDDSLNGYV	138
C6_ompseq	SGSSSNIGSNDVS	110	DNSQRPS	648	GSWDASLNGYV	145
C7_ompseq	SGSSSNIGNNDVN	111	SNSHRPS	114	GTWDDSLNGYV	138
C11_ompseq	SGSSSNIGNNDVS	99	SNSHRPS	114	GSWDASLNGYV	134
D4_ompseq	SGSSSNIGSNDVS	110	DDSNRPS	130	GSWDDSLNGYV	140
E6_ompseq	SGSSSNIGNNDVN	111	SNSHRPS	114	GAWDYSLNGYV	146
E10_ompseq	SGSSSNIGSNAVT	102	DDNHRPS	121	GAWDDSLNGYV	135
E12_ompseq	SGSSSNIGSNDVS	110	DDSNRPS	130	GSWDDSLNGYV	140
F6_ompseq	SGSSSNIGNNDVS	99	DNNHRPS	118	AAWDDSLNAYV	137
F11_ompseq	TGSSSNIGSNYVS	112	DDSHRPS	125	GAWDDSLNGYV	135
F12_ompseq	TGSSSNIGNNDVS	103	SDSQRPS	131	GAWDASLNGYV	147
G9_ompseq	TGSSSNIGSNTVN	113	DNSQRPS	648	ASWDDSLNAYV	148
C04-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWEQWLNNGYV	149
C04-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWEQWLNNGYV	149
C04-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWEQWLNNGYV	149
C04-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWEQWLHNGYV	150
C04-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWEQWLHNGYV	150
F06-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GTWAGSLNGYV	151
F06-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GTWAGSLNGYV	151
F06-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GTWAGSLNGYV	151
F06-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GTWAGSLHNGYV	152
F06-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GTWAGSLHNGYV	152
B01	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
A07(AR)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
E09	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135

045348

D03	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
A02	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDTTLNGYV	153
B09	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDEESLNGYV	154
B10	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GSWDVSLNGYV	155
E06	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDHSLNGYV	156
H04	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDQSLNGYV	157
A06	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GASWDEWLNGYV	158
A07(AM)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDETLNGYV	159
B02	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GTWDDSLNGYV	138
VH02-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH02-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH02-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH02-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH02-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH05-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH05-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH05-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH05-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH05-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH06-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH06-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH06-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH06-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH06-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH07-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH07-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH07-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH07-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH07-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH09-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH09-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH09-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH09-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH09-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH16-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH16-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH16-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135

VH16-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH16-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH27-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH27-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH27-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH27-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH27-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH32-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH32-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH32-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH32-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH32-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH35-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH35-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH35-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH35-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH35-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH48	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH55	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH81	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
C12	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
I564-VL(N51D)	TGSSSNIGSNDVS	98	ADSNRPS	132	GAWDDSLNGYV	135
I564-VL(N95aD)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLDGYV	160
I564-VL(N95aH)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLHGYV	136
I564-VL(N95aK)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLKGYV	161
I564-VL(N95aR)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLKGYV	161
I564-VH(N54D)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
I564-VH(N54Q)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135

Каркасная область тяжелой цепи, выбранная из группы, состоящей из H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4, по настоящему изобретению может быть выбрана из аминокислотных последовательностей табл. 3. Каркасная область легкой цепи, выбранная из группы, состоящей из L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4, по настоящему изобретению может быть выбрана из аминокислотных последовательностей табл. 4.

Конкретно, варибельная область тяжелой цепи антитела против IGF1R по настоящему изобретению содержит H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, описанные в табл. 1, или дополнительно H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4, показанные в табл. 3.

Варибельная область легкой цепи антитела против IGF1R по настоящему изобретению содержит L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, показанные в табл. 3, или дополнительно L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4, показанные в табл. 4. В одном воплощении настоящего изобретения антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 каждого клона, выбранные из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, показанных в табл. 1, и варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 каждого клона, выбранные из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, показанных в табл. 2.

В одном воплощении настоящего изобретения аминокислотная модификация, например, устранение дезамидирования аминокислоты в Fc-области антитела против IGF1R, может улучшать ФК (фармакокинетику) антитела благодаря снижению его клиренса в крови без изменения способности к связыванию с ECD антигена IGF1R и приводить к увеличению периода полувыведения. В одном примере аминокислотное положение в антителе против IGF1R, в котором устраняют дезамидирование, может представлять собой N51D в L-CDR2 легкой цепи, или N95aK, N95aH, N95aR или N95aD в L-CDR3 легкой цепи, или N54D или N54Q в H-CDR2 тяжелой цепи клона I564.

Последовательности каркасных областей переменной
области тяжелой цепи в клоне антитела по изобретению

Идентифи- катор клона	H-FR1	SEQ ID NO:	H-FR2	SEQ ID NO:	H-FR3	SEQ ID NO:	H-FR4	SEQ ID NO:
996-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	87	WGQGTL VTVSS	92
996-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	87	WGQGTL VTVSS	92
1226-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1226-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
48G5-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
48G5-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
49G11-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
49G11-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
54H4-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
54H4-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL ATVSS	93

60A11-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
60A11-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
60H6-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
60H6-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
60H6-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
A1_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
A3_ompseq	EVQLLESGGGLV QTGGSLRLSCAA S	82	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
A6_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
A8_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAR	89	WGQGTL VTVSS	92
A10_ompseq	EVQLLESGGGLA QPGGSLRLSCAA S	83	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAR	89	WGQGTL VTVSS	92
A12_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAR	89	WGQGTL VTVSS	92
B5_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

B9_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
B11_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C2_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAR	89	WGQGTL VTVSS	92
C6_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C7_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C11_ompseq	EVQLLESGGGLV QTGGSLRLSCAA S	82	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
D4_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDAA VYYCAK	90	WGQGTL VTVSS	92
E6_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAR	89	WGQGTL VTVSS	92
E10_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNPKNLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	91	WGQGTL VTVSS	92
E12_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDAA VYYCAK	90	WGQGTL VTVSS	92
F6_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
F11_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

F12_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTQ VTVSS	94
G9_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C04-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C04-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK cLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C04-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK cLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C04-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C04-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
F06-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
F06-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
F06-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
F06-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
F06-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

B01	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGT L VTVSS	92
A07(AR)	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGT L VTVSS	92
E09	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGT L VTVSS	92
D03	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGT L VTVSS	92
A02	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGT L VTVSS	92
B09	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGT L VTVSS	92
B10	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGT L VTVSS	92
E06	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGT L VTVSS	92
H04	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGT L VTVSS	92
A06	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGT L VTVSS	92
A07(AM)	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGT L VTVSS	92
B02	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGT L VTVSS	92

VH02-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH02-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH02-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH02-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH02-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH05-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH05-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH05-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH05-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH05-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH06-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH06-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

VH06-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH06-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH06-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH07-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH07-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH07-3	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH07-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH07-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH09-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH09-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH09-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH09-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

VH09-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH16-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH16-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH16-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH16-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH16-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH27-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH27-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH27-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH27-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH27-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH32-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

VH32-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH32-3	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH32-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH32-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH35-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH35-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH35-3	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH35-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH35-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH48	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH55	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH81	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

C12	EVQLLESGGGLV QPGGSLRRSCAA S	84	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGS L VTVSS	95
1564- VL(N51D)	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL L VTVSS	92
1564- VL(N95aD)	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL L VTVSS	92
1564- VL(N95aH)	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL L VTVSS	92
1564- VL(N95aK)	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL L VTVSS	92
1564- VL(N95aR)	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL L VTVSS	92
1564- VH(N54D)	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL L VTVSS	92
1564- VH(N54Q)	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL L VTVSS	92

Таблица 4

Последовательности каркасных областей варибельной
области легкой цепи в клоне антитела по изобретению

Идентифи- катор клона	L-FR1	SEQ ID NO:	L-FR2	SEQ ID NO:	L-FR3	SEQ ID NO:	L-FR4	SEQ ID NO:
996-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
996-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
1226-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
1226-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170

1564-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
1564-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
1564-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
1564-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
1564-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
48G5-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
48G5-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
49G11-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
49G11-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
54H4-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
54H4-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
60A11-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
60A11-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
60H6-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
60H6-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
60H6-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
A1_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRATISC	163	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
A3_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169

A6_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
A8_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
A10_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
A12_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDGADYYC	168	FGGGT KLTVL	169
B5_ompseq	QSVLTQPPSAS GPPGQRVTISC	164	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
B9_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
B11_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
C2_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
C6_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
C7_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDGADYYC	168	FGGGT KLTVL	169
C11_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
D4_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
E6_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
E10_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTFL	171
E12_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
F6_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
F11_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
F12_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169

G9_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
C04-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
C04-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
C04-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
C04-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
C04-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
F06-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
F06-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
F06-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
F06-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
F06-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
B01	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
A07(AR)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
E09	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
D03	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
A02	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
B09	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
B10	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169

E06	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
H04	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
A06	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
A07(AM)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
B02	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
VH02-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH02-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH02-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH02-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH02-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH05-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH05-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH05-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH05-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH05-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH06-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH06-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH06-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170

VH06-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH06-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH07-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH07-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH07-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH07-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH07-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH09-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH09-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH09-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH09-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH09-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH16-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH16-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH16-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH16-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH16-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH27-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRVTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169

VH27-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH27-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH27-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH27-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH32-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH32-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH32-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH32-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH32-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH35-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH35-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH35-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH35-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH35-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH48	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH55	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH81	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
C12	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
1564- VL(N51D)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
1564- VL(N95aD)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
1564- VL(N95aH)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
1564- VL(N95aK)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
1564- VL(N95aR)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
1564- VH(N54D)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
1564- VH(N54Q)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169

Антитело против IGF1R по настоящему изобретению может представлять собой антитело, содержащее переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, и различные переменные области тяжелой и легкой цепи, раскрытые в настоящем описании, показаны в табл. 5 и 6, CDR1-CDR3 и каркасные области 1-4 каждого клона описаны как SEQ ID NO.

Переменные области тяжелой цепи и переменные области легкой цепи, описанные в табл. 5 и 6, можно свободно комбинировать для получения различных типов антител. Примеры комбинаций переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи показаны в табл. 5 и 6.

Таблица 5

Переменная область тяжелой цепи антитела по изобретению

SEQ ID NO	Тяжелая цепь (VH)	CDR- H1	CDR- H2	CDR- H3	H- FR1	H- FR2	H- FR3	H- FR4
172	996-1	1	10	50	81	85	87	92
173	996-2	1	10	50	81	86	87	92
174	1226-1	2	11	51	81	85	88	92
175	1226-2	2	11	51	81	86	88	92
176	1564-1	1	12	52	81	85	88	92
177	1564-2	1	12	52	81	86	88	92
178	1564-3	1	12	52	81	86	88	92

179	1564-DM	1	13	52	81	86	88	92
180	1564-DMP	1	13	52	81	86	88	92
181	48G5-1	3	14	53	81	85	88	92
182	48G5-2	3	14	53	81	86	88	92
183	49G11-1	1	15	54	81	85	88	92
184	49G11-2	1	15	54	81	86	88	92
185	54H4-1	3	16	55	81	85	88	92
186	54H4-2	3	16	55	81	86	88	93
187	60A11-1	2	17	56	81	85	88	92
188	60A11-2	2	17	56	81	86	88	92
189	60H6-1	3	18	57	81	85	88	92
190	60H6-2	3	18	57	81	86	88	92
191	60H6-3	3	18	57	81	86	88	92
192	A1_OMPSEQ	1	19	58	81	85	88	92
193	A3_OMPSEQ	3	20	59	82	85	88	92
194	A6_OMPSEQ	4	21	60	81	85	88	92
195	A8_OMPSEQ	2	18	61	81	85	89	92
196	A10_OMPSEQ	5	22	62	83	85	89	92
197	A12_OMPSEQ	3	23	63	81	85	89	92
198	B5_OMPSEQ	3	24	64	81	85	88	92
199	B9_OMPSEQ	3	18	65	81	85	88	92
200	B11_OMPSEQ	3	25	66	81	85	88	92
201	C2_OMPSEQ	1	26	67	81	85	89	92
202	C6_OMPSEQ	6	27	68	81	85	88	92
203	C7_OMPSEQ	2	28	69	81	85	88	92
204	C11_OMPSEQ	7	29	70	82	85	88	92
205	D4_OMPSEQ	3	30	71	81	85	90	92
206	E06_OMPSEQ	1	12	72	81	85	89	92
207	E10_OMPSEQ	2	17	56	81	85	91	92
208	E12_OMPSEQ	3	30	71	81	85	90	92
209	F06_OMPSEQ	3	18	73	81	85	88	92

210	F11_OMPSEQ	3	31	74	81	85	88	92
211	F12_OMPSEQ	3	32	75	81	85	88	94
212	G9_OMPSEQ	1	33	76	81	85	88	92
213	C04-1	1	12	52	81	85	88	92
214	C04-2	1	12	52	81	86	88	92
215	C04-3	1	12	52	81	86	88	92
216	C04-DM	1	13	52	81	86	88	92
217	C04-DMP	1	13	52	81	86	88	92
218	F06-1	1	12	52	81	85	88	92
219	F06-2	1	12	52	81	86	88	92
220	F06-3	1	12	52	81	86	88	92
221	F06-DM	1	13	52	81	86	88	92
222	F06-DMP	1	13	52	81	86	88	92
223	B01	1	34	52	81	85	88	92
224	A07(AR)	1	35	52	81	85	88	92
225	E09	1	36	52	81	85	88	92
226	D03	1	37	52	81	85	88	92
227	A02	1	12	52	81	85	88	92
228	B09	1	12	52	81	85	88	92
229	B10	1	12	52	81	85	88	92
230	E06	1	12	52	81	85	88	92
231	H04	1	12	52	81	85	88	92
232	A06	1	12	52	81	85	88	92
233	A07(AM)	1	12	52	81	85	88	92
234	B02	1	12	52	81	85	88	92
235	VH2-1	8	38	77	81	85	88	92
236	VH2-2	8	38	77	81	86	88	92
237	VH2-3	8	38	77	81	86	88	92
238	VH2-DM	8	39	77	81	86	88	92
239	VH2-DMP	8	39	77	81	86	88	92
240	VH5-1	1	40	78	81	85	88	92

241	VH5-2	1	40	78	81	86	88	92
242	VH5-3	1	40	78	81	86	88	92
243	VH5-DM	1	41	78	81	86	88	92
244	VH5-DMP	1	41	78	81	86	88	92
245	VH6-1	1	42	77	81	85	88	92
246	VH6-2	1	42	77	81	86	88	92
247	VH6-3	1	42	77	81	86	88	92
248	VH6-DM	1	43	77	81	86	88	92
249	VH6-DMP	1	43	77	81	86	88	92
250	VH7-1	8	44	52	81	85	88	92
251	VH7-2	8	44	52	81	86	88	92
252	VH7-3	8	44	52	81	86	88	92
253	VH7-DM	8	45	52	81	86	88	92
254	VH7-DMP	8	45	52	81	86	88	92
255	VH9-1	1	46	52	81	85	88	92
256	VH9-2	1	46	52	81	86	88	92
257	VH9-3	1	46	52	81	86	88	92
258	VH9-DM	1	47	52	81	86	88	92
259	VH9-DMP	1	47	52	81	86	88	92
260	VH16-1	1	38	52	81	85	88	92
261	VH16-2	1	38	52	81	86	88	92
262	VH16-3	1	38	52	81	86	88	92
263	VH16-DM	1	39	52	81	86	88	92
264	VH16-DMP	1	39	52	81	86	88	92
265	VH27-1	8	44	78	81	85	88	92
266	VH27-2	8	44	78	81	86	88	92
267	VH27-3	8	44	78	81	86	88	92
268	VH27-DM	8	45	78	81	86	88	92
269	VH27-DMP	8	45	78	81	86	88	92
270	VH32-1	8	12	77	81	85	88	92
271	VH32-2	8	12	77	81	86	88	92

272	VH32-3	8	12	77	81	86	88	92
273	VH32-DM	8	13	77	81	86	88	92
274	VH32-DM	8	13	77	81	86	88	92
275	VH35-1	1	44	78	81	85	88	92
276	VH35-2	1	44	78	81	86	88	92
277	VH35-3	1	44	78	81	86	88	92
278	VH35-DM	1	45	78	81	86	88	92
279	VH35-DMP	1	45	78	81	86	88	92
280	VH48	8	38	79	81	85	88	92
281	VH55	1	12	77	81	85	88	92
282	VH81	1	48	52	81	85	88	92
283	C12	9	12	80	84	85	88	95
284	1564-VL(N51D)	1	12	52	81	85	88	92
285	1564-VL(N95aD)	1	12	52	81	85	88	92
286	1564-VL(N95aH)	1	12	52	81	85	88	92
287	1564-VL(N95aK)	1	12	52	81	85	88	92
288	1564-VL(N95aR)	1	12	52	81	85	88	92
289	1564-VH(N54D)	1	49	52	81	85	88	92
290	1564-VH(N54Q)	1	13	52	81	85	88	92

Таблица 6

Вариабельная область легкой цепи антитела по изобретению

SEQ ID NO	Легкая цепь (VH)	CDR- L1	CDR- L2	CDR- L3	L- FR1	L- FR2	L- FR3	L- FR4
291	996-1	96	114	133	162	165	166	169
292	996-2	96	114	133	162	165	166	170
293	1226-1	97	115	134	162	165	166	169
294	1226-2	97	115	134	162	165	166	170
295	1564-1	98	116	135	162	165	166	169
296	1564-2	98	116	135	162	165	167	170
297	1564-3	98	116	135	162	165	166	170
298	1564-DM	98	117	136	162	165	167	170

299	1564-DMP	98	117	136	162	165	166	170
300	48G5-1	99	118	137	162	165	166	169
301	48G5-2	99	118	137	162	165	166	170
302	49G11-1	100	119	138	162	165	166	169
303	49G11-2	100	119	138	162	165	166	170
304	54H4-1	101	120	139	162	165	166	169
305	54H4-2	101	120	139	162	165	166	170
306	60A11-1	102	121	135	162	165	166	169
307	60A11-2	102	121	135	162	165	166	170
308	60H6-1	103	122	140	162	165	166	169
309	60H6-2	103	122	140	162	165	167	170
310	60H6-3	103	122	140	162	165	166	170
311	A1_OMPSEQ	104	123	140	163	165	166	169
312	A3_OMPSEQ	105	124	139	162	165	166	169
313	A6_OMPSEQ	104	125	141	162	165	166	169
314	A8_OMPSEQ	103	126	135	162	165	166	169
315	A10_OMPSEQ	106	127	142	162	165	166	169
316	A12_OMPSEQ	107	114	138	162	165	168	169
317	B5_OMPSEQ	99	128	143	164	165	166	169
318	B9_OMPSEQ	108	123	140	162	165	166	169
319	B11_OMPSEQ	99	121	144	162	165	166	169
320	C2_OMPSEQ	109	129	138	162	165	166	169
321	C6_OMPSEQ	110	648	145	162	165	166	169
322	C7_OMPSEQ	111	114	138	162	165	166	169
323	C11_OMPSEQ	99	114	134	162	165	166	169
324	D4_OMPSEQ	110	130	140	162	165	166	169
325	E06_OMPSEQ	111	114	146	162	165	166	169
326	E10_OMPSEQ	102	121	135	162	165	166	171
327	E12_OMPSEQ	110	130	140	162	165	166	169
328	F06_OMPSEQ	99	118	137	162	165	166	169

329	F11_OMPSEQ	112	125	135	162	165	167	169
330	F12_OMPSEQ	103	131	147	162	165	166	169
331	G9_OMPSEQ	113	648	148	162	165	166	169
332	C04-1	98	116	149	162	165	166	169
333	C04-2	98	116	149	162	165	167	170
334	C04-3	98	116	149	162	165	166	170
335	C04-DM	98	117	150	162	165	167	170
336	C04-DMP	98	117	150	162	165	166	170
337	F06-1	98	116	151	162	165	166	169
338	F06-2	98	116	151	162	165	167	170
339	F06-3	98	116	151	162	165	166	170
340	F06-DM	98	117	152	162	165	167	170
341	F06-DMP	98	117	152	162	165	166	170
342	B01	98	116	135	162	165	167	169
343	A07(AR)	98	116	135	162	165	167	169
344	E09	98	116	135	162	165	167	169
345	D03	98	116	135	162	165	167	169
346	A02	98	116	153	162	165	167	169
347	B09	98	116	154	162	165	167	169
348	B10	98	116	155	162	165	167	169
349	E06	98	116	156	162	165	167	169
350	H04	98	116	157	162	165	167	169
351	A06	98	116	158	162	165	167	169
352	A07(AM)	98	116	159	162	165	167	169
353	B02	98	116	138	162	165	167	169
354	VH2-1	98	116	135	162	165	166	169
355	VH2-2	98	116	135	162	165	167	170
356	VH2-3	98	116	135	162	165	166	170
357	VH2-DM	98	117	136	162	165	167	170
358	VH2-DMP	98	117	136	162	165	166	170

359	VH5-1	98	116	135	162	165	166	169
360	VH5-2	98	116	135	162	165	167	170
361	VH5-3	98	116	135	162	165	166	170
362	VH5-DM	98	117	136	162	165	167	170
363	VH5-DMP	98	117	136	162	165	166	170
364	VH6-1	98	116	135	162	165	166	169
365	VH6-2	98	116	135	162	165	167	170
366	VH6-3	98	116	135	162	165	166	170
367	VH6-DM	98	117	136	162	165	167	170
368	VH6-DMP	98	117	136	162	165	166	170
369	VH7-1	98	116	135	162	165	166	169
370	VH7-2	98	116	135	162	165	167	170
371	VH7-3	98	116	135	162	165	166	170
372	VH7-DM	98	117	136	162	165	167	170
373	VH7-DMP	98	117	136	162	165	166	170
374	VH9-1	98	116	135	162	165	166	169
375	VH9-2	98	116	135	162	165	167	170
376	VH9-3	98	116	135	162	165	166	170
377	VH9-DM	98	117	136	162	165	167	170
378	VH9-DMP	98	117	136	162	165	166	170
379	VH16-1	98	116	135	162	165	166	169
380	VH16-2	98	116	135	162	165	167	170
381	VH16-3	98	116	135	162	165	166	170
382	VH16-DM	98	117	136	162	165	167	170
383	VH16-DMP	98	117	136	162	165	166	170
384	VH27-1	98	116	135	162	165	166	169
385	VH27-2	98	116	135	162	165	167	170
386	VH27-3	98	116	135	162	165	166	170
387	VH27-DM	98	117	136	162	165	167	170
388	VH27-DMP	98	117	136	162	165	166	170

389	VH32-1	98	116	135	162	165	166	169
390	VH32-2	98	116	135	162	165	167	170
391	VH32-3	98	116	135	162	165	166	170
392	VH32-DM	98	117	136	162	165	167	170
393	VH32-DM	98	117	136	162	165	166	170
394	VH35-1	98	116	135	162	165	166	169
395	VH35-2	98	116	135	162	165	167	170
396	VH35-3	98	116	135	162	165	166	170
397	VH35-DM	98	117	136	162	165	167	170
398	VH35-DMP	98	117	136	162	165	166	170
399	VH48	98	116	135	162	165	166	169
400	VH55	98	116	135	162	165	166	169
401	VH81	98	116	135	162	165	166	169
402	C12	98	116	135	162	165	166	169
403	1564-VL(N51D)	98	132	135	162	165	167	169
404	1564-VL(N95aD)	98	116	160	162	165	167	169
405	1564-VL(N95aH)	98	116	136	162	165	167	169
406	1564-VL(N95aK)	98	116	161	162	165	167	169
407	1564-VL(N95aR)	98	116	161	162	165	167	169
408	1564-VH(N54D)	98	116	135	162	165	166	169
409	1564-VH(N54Q)	98	116	135	162	165	166	169

Различные вариабельные области тяжелой и легкой цепи, раскрытые здесь, представлены в табл. 5 и 6. Каждая вариабельная область может быть связана с константными областями тяжелой и легкой цепи с образованием соответствующих тяжелых и легких цепей интактного антитела. Примером комбинации вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, составляющих антитело против IGF1R по настоящему изобретению, может быть комбинация вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи с одинаковым названием клона, как описано в табл. 5 и табл. 6.

В одном конкретном примере настоящего изобретения антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент содержат по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из:

CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1-9,

CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:10-49,

CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:50-80;

CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:96-113,

CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:114-132, и

CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:133-161.

Конкретно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1-9, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:10-49, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:50-80, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:96-113, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:114-132, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:133-161.

Антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично распознают и связываются по меньшей мере с одной аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из Y775, P776, F778,

R650, S791, L798, Glu779, L641, H808, E809, L813, V397, D435, W434, Y460 и C488 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:410. Конкретно, антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут связываться по меньшей мере с одним, выбранным из сайтов связывания 1-3 белка, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:410. Сайт связывания 1 содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Y775, P776, F778, R650, S791, L798 и Glu779, сайт связывания 2 содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из L641, H808, E809 и L813, и сайт связывания 3 содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V397, D435, W434, Y460 и C488.

Вариабельная область тяжелой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может содержать

каркасную область 1 тяжелой цепи (H-FR1), расположенную на N-конце H-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:81-84,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), расположенную между H-CDR1 и H-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:85-86,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), расположенную между H-CDR2 и H-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:87-91, и

каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), расположенную на C-конце H-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:92-95.

Вариабельная область легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может содержать каркасную область 1 легкой цепи (L-FR1), расположенную на N-конце L-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:162-164,

каркасную область легкой цепи (L-FR2), расположенную между L-CDR1 и L-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:165,

каркасную область легкой цепи (L-FR3), расположенную между L-CDR2 и L-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:166-168, и

каркасную область легкой цепи (L-FR4), расположенную на C-конце L-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:169-171.

Каждая из вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи, раскрытых в табл. 5 и 6, могут быть использованы как отдельные доменные антитела, могут быть свободно скомбинированы друг с другом с образованием различных антител и связаны в одноцепочечной форме с получением одноцепочечных антител, таких как scFv.

В настоящем описании "доменное антитело" представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи. В одном воплощении две или более VH-области связаны ковалентной связью посредством пептидного линкера с образованием доменного антитела. Две VH-области этого бивалентного доменного антитела могут быть направлены на один и тот же антиген или на разные антигены.

Антигенсвязывающие фрагменты антител против IGF1R по настоящему изобретению могут представлять собой фрагмент антитела, выбранный из scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab', F(ab')₂, минитела и дитела, включая фрагменты антител, содержащие один или более чем один гипервариабельный участок.

Среди антигенсвязывающих фрагментов, Fab содержит вариабельную область легкой цепи, вариабельную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи и первую константную область (CH1) тяжелой цепи и имеет один сайт связывания антигена. Fab' имеет шарнирную область в составе Fab, содержащую один или более чем один цистеиновый остаток, на C-конце домена CH1 тяжелой цепи. F(ab')₂-антитело получают связыванием двух Fab' с образованием дисульфидной связи между цистеиновыми остатками шарнирных областей Fab'.

Fv представляет собой минимальный фрагмент антитела, имеющий только вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, и включает одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv) и двуцепочечные вариабельные фрагменты (Fv). В двуцепочечном Fv вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи могут быть связаны нековалентными связями. В одноцепочечном Fv вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи связаны ковалентно, напрямую или через пептидный линкер, или связаны напрямую на C-конце с образованием структуры, подобной димеру scFv (di-scFv), такой как двуцепочечный Fv. В настоящем изобретении одноцепочечный Fv представляет собой единую полипептидную цепь антигенсвязывающей области, где вариабельные области тяжелой и легкой цепи связаны напрямую или через линкер, и может представлять собой по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из scFv, имеющего одну цепь, связанную с вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи, формы структуры, подобной димеру scFv (di-scFv), scFv-Fc, где вариабельная область тяжелой цепи, вариабельная область легкой цепи и Fc связаны в форме единой цепи, и тому подобного.

Пептидный линкер может быть таким, как описано выше, и может иметь длину, например, от 1 до 100 аминокислот, такую как от 2 до 50 или от 5 до 25 аминокислот, и пептидный линкер может иметь различную длину в пределах интервала, не влияющего на функцию антитела. Типы аминокислот, входящих в пептидный линкер, могут включать одну или более чем одну аминокислоту, выбранную из груп-

пы, состоящей, например, из Gly, Ser и Leu, и конкретные примеры включают остатки Gly и Ser или остатки Leu и Ser. В одном конкретном примере пептидный линкер может представлять собой (G4S)_n, где n представляет собой число повторений (G4S), представленное целым числом от 1 до 10, таким как от 2 до 5, особенно 3 или 4. Примером пептидного линкера может быть пептид, состоящий из аминокислот SEQ ID NO:411 или 412.

SEQ ID NO:411: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS.

SEQ ID NO:412: GGGGSGGGGSGGGGS.

Одноцепочечный Fv (scFv) может быть получен слиянием ДНК, кодирующей пептидный линкер, между ДНК, кодирующими полипептиды двух переменных доменов (VL и VH). Полученный полипептид может образовывать антигенсвязывающие мономеры или мультимеры (например, димеры, тримеры или тетрамеры), в зависимости от длины гибкого линкера между двумя переменными доменами, с формированием их пространственной структуры. При комбинировании полипептидов, содержащих разные VL и VH, могут быть получены мультимерные scFv, связывающиеся с разными эпитопами.

Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием протеолитических ферментов (например, рестрикционное расщепление полноразмерного антитела папаином с получением Fab и расщепление пепсином с получением F(ab')₂-фрагмента) или с применением генетической рекомбинантной технологии.

Одноцепочечные антитела, раскрытые в настоящем описании, включают, без ограничения, scFv, содержащие комбинации доменов переменных областей тяжелой и легкой цепи или комбинации переменных доменов легкой и тяжелой цепи, содержащие CDR.

Кроме того, антитело против IGF1R и его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи, и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи. Конкретно, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи могут быть связаны с константной областью тяжелой цепи и константной областью легкой цепи, и последовательности тяжелой цепи и легкой цепи можно также комбинировать с получением структуры интактного антитела.

Последовательности константных областей, которые можно комбинировать с переменными областями по настоящему изобретению, приведены в качестве примера и могут быть надлежащим образом выбраны из константных областей тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов (например, человеческих иммуноглобулинов). Например, без ограничения, константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область тяжелой цепи IgG1, константную область тяжелой цепи IgG3 или константную область тяжелой цепи IgG4, а константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или константную область легкой цепи лямбда.

В качестве примера, переменная область по настоящему изобретению может быть связана с константной областью с образованием последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи, описанных ниже. в табл. 7 показаны примеры комбинаций тяжелых и легких цепей. Кроме того, примеры полноразмерных антител приведены в табл. 16. Константная область может быть надлежащим образом выбрана из константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи иммуноглобулина (например, человеческого иммуноглобулина).

Примеры антител

	HC SEQ ID	LC SEQ ID
1564 IgG	413	420
1226 IgG	414	421
996 IgG	415	422
48G5 IgG	416	423
54H4 IgG	417	424
60H6 IgG	418	425
B11 IgG	419	426
1564 scFv	427	
1226 scFv	428	
996 scFv	429	
48G5 scFv	430	
54H4 scFv	431	
60H6 scFv	432	
B11 scFv	433	

Антитела, описанные в настоящем изобретении, также включают биспецифичные антитела и бифункциональные антитела, содержащие один или более чем один CDR или одну или более чем одну варибельную область, как описано выше. Биспецифичные или бифункциональные антитела представляют собой искусственные гибридные антитела, распознающие две разные родственные или неродственные мишени. Биспецифичные антитела могут быть получены с применением множества методов, таких как слияние гибридом или лигирование Fab'-фрагментов.

В настоящем описании "мультиспецифичный антигенсвязывающий белок" или "мультиспецифичное антитело" направлены на два или более чем два антигена или эпитопа. В настоящем описании "биспецифичные" антигенсвязывающий белок или антитело или антигенсвязывающий белок или антитело "с двойной специфичностью" представляют собой гибридный антигенсвязывающий белок или гибридное антитело, имеющие два (2) разных сайта связывания антигена. Это биспецифичное антитело является одной из разновидностей мультиспецифичного антигенсвязывающего белка или мультиспецифичного антитела, и оно может быть получено различными известными методами, например, такими методами, как слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов.

Мультиспецифичное антитело, например, антитело против IGF1R и его антигенсвязывающий фрагмент, из которых можно получить биспецифичное антитело, может содержать как антитело против IGF1R, так и его антигенсвязывающий фрагмент, например, полноразмерное антитело. Антигенсвязывающий фрагмент может быть выбран из группы, состоящей из доменных антител, scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' и F(ab')₂.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела против IGF1R может быть связан с линкером, таким как пептидный линкер, или без него. Кроме того, тяжело- и легкоцепочечные части антигенсвязывающего фрагмента, такие как варибельная область тяжелой цепи и варибельная область легкой цепи scFv-фрагмента, могут также быть связаны с пептидным линкером или без него. Пептидный линкер может быть таким, как описано выше.

В биспецифичном антителе антитело против IGF1R и его антигенсвязывающие фрагменты могут выполнять функцию доставки второго связанного с ними антитела или антигенсвязывающего фрагмента, направленных на другие антигены или эпитопы, через гематоэнцефалический барьер в головной мозг. Второе антитело может представлять собой, без ограничения, антитело, действующее в головном мозге.

Антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут иметь определенную общую область или последовательность с отличным от них вторым антителом. Например, антитело против IGF1R может иметь общую константную область или Fc-область с антителом или антигенсвязывающим фрагментом второго антитела.

Кроме того, структура биспецифичного антитела в настоящем изобретении включает бивалентную форму биспецифичного антитела, где scFv антитела против IGF1R связан с каждой Fc двух тяжелых цепей полноразмерного иммуноглобулина, например, на концах тяжелых цепей, напрямую или через линкер, и моновалентную форму биспецифичного антитела, где scFv антитела против IGF1R связан только с одним концом двух тяжелых цепей полноразмерного иммуноглобулина, напрямую или через линкер, однако моновалентное двойное антитело является предпочтительным.

Конкретно, в одном воплощении настоящего изобретения есть случай, когда период полувыведения клона моновалентной формы лучше, чем у клона бивалентной формы, а структура клона моновалентной формы представляет собой форму, где доменное антитело (scFv) против IGF1R связано только с концом одной тяжелой цепи интактного иммуноглобулина через линкер. Конкретно, антитело представляет собой гетеродимер, полученный методом "выступ во впадину" (Knob-In-Hole), содержащий две разные тяжелые цепи интактного иммуноглобулина, где одна тяжелая цепь имеет доменное антитело (scFv) против IGF1R, связанное с ее C-концом, а другая тяжелая цепь не имеет доменного антитела на ее C-конце.

В биспецифичном антителе второе антитело, связанное с антителом против IGF1R или его антигенсвязывающим фрагментом, может представлять собой человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело или выделенное антитело, специфично связывающееся с IGF1R. Второе антитело включает, без ограничения, полноразмерные антитела, биспецифичные антитела, минитела, доменные антитела, миметики антител (или синтетические антитела), слитые антитела (или конъюгаты антител) и их фрагменты.

Далее настоящее изобретение относится к антителу против α и его антигенсвязывающему фрагменту.

Альфа-синуклеин, который может быть распознан антителом, предложенным в настоящем описании, может быть выбран из альфа-синуклеинов млекопитающих, человеческого альфа-синуклеина, альфа-синуклеина обезьяны (например, альфа-синуклеина резуса), мышинного альфа-синуклеина, крысиного альфа-синуклеина и тому подобного. Например, человеческий альфа-синуклеин может представлять собой, без ограничения, альфа-синуклеин (NCBI ID: NP_000336). Если в настоящем описании не указано иное, альфа-синуклеин может относиться к человеческому альфа-синуклеину, и антитела или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем описании, имеют свойство специфично связываться не только с человеческим альфа-синуклеином, но также с альфа-синуклеином обезьяны (например, резуса), крысиным альфа-синуклеином и/или мышинным альфа-синуклеином.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с C-концевой областью альфа-синуклеина, конкретно, с C-концевой областью, содержащей пептид, содержащий по меньшей мере 11 или 12 расположенных друг за другом аминокислот, включая остатки 110-120 или остатки 111-122 в SEQ ID NO:559 человеческого альфа-синуклеина. Было подтверждено, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут распознавать область распознавания антигена и связываться с агрегатами альфа-синуклеина с высокой аффинностью.

В настоящем описании "аффинность" или "степень аффинности" представляют собой силу взаимодействия между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и антигеном и могут определяться свойствами антигена, такими как размер, форма и/или заряд антигена, и последовательностями CDR и/или физико-химическими свойствами (гидрофильными/гидрофобными свойствами, электростатическими свойствами и так далее) антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Методы определения аффинности известны в области техники, и обычно, без ограничения, ее указывают как константу диссоциации (K_D).

В настоящем описании "специфичное связывание с альфа-синуклеином или агрегатами альфа-синуклеина" означает, что аффинность связывания с белком альфа-синуклеина или агрегатами альфа-синуклеина относительно высока по сравнению с другими антигенами и, например, константа диссоциации (K_D) может составлять от $0,1 \times 10^{-10}$ М до 2×10^{-10} М или от $0,05 \times 10^{-10}$ М до $0,3 \times 10^{-9}$ М в отношении агрегатов альфа-синуклеина, конкретно, фибрилл, протофибрилл и олигомеров амилоида, в особенности фибрилл амилоида, как измерено, без ограничения, анализом Octet или анализом SPR.

Гуманизированные антитела к альфа-синуклеину, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь по одному воплощению настоящего изобретения, например, Hu11F11 (ver.1), Hu11F11 (ver.2) и Hu11F11_ABL2-4, демонстрируют высокую активность в отношении стимуляции фагоцитарного захвата по сравнению с химерными антителами к альфа-синуклеину. В сравнении с химерным антителом к альфа-синуклеину, Hu11F11 (ver.1), Hu11F11 (ver.2), Hu11F11 (ver.3), Hu11F11 (ver.4) и ABL2-4 демонстрируют высокую активность в отношении ингибирования связывания фибрилл с мембраной нервных клеток. Hu11F11 (ver.2), Hu11F11 (ver.4) и ABL2-4 имеют высокую активность в отношении ингибирования распространения альфа-синуклеина, секретированного из клеток, сверхэкспрессирующих альфа-синуклеин, на другие нервные клетки по сравнению с химерным антителом к альфа-синуклеину и демонстрируют аффинность связывания с агрегатами альфа-синуклеина, например, сходную или превышающую активность химерного антитела к альфа-синуклеину, в клеточном анализе.

Антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению может ингибировать перенос агрегатов альфа-синуклеина, секретированных из нервной клетки в нервную систему субъекта, в другие нормаль-

ные клетки во внеклеточном пространстве и инфицирование нервных клеток (ингибировать передачу агрегатов от клетки к клетке) и обладает способностью стимулировать фагоцитарное действие микроглии на агрегаты альфа-синуклеина во внеклеточном пространстве. Агрегаты альфа-синуклеина распространяются от одной клетки к другой клетке подобно прионам, и альфа-синуклеин, в особенности агрегаты альфа-синуклеина, распространяется по головному мозгу, приводя к синуклеинопатиям в нормальных клетках. Поэтому агрегаты альфа-синуклеина токсичны для нейронов головного мозга, и хорошо известно, что они приводят к гибели нейронов головного мозга (нейродегенерации) и нейровоспалению. Соответственно, по мере распространения агрегатов альфа-синуклеина в различные части головного мозга гибель клеток головного мозга и нейровоспалительные реакции становятся более выраженными, приводя к гибели клеток головного мозга, расстройствам поведения и когнитивным расстройствам, которые отмечают при прогрессировании синуклеинопатий, таких как болезнь Паркинсона.

Соответственно, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению может предотвращать явление распространения агрегатов альфа-синуклеина в различные области головного мозга, ингибируя передачу альфа-синуклеина или агрегатов альфа-синуклеина между нервными клетками, и снижать уровень агрегатов альфа-синуклеина, являющихся важной причиной синуклеинопатий, уменьшая количество или устраняя сами агрегаты альфа-синуклеина во внеклеточной области нервных клеток нервной системы субъекта и стимулируя фагоцитарную активность микроглии, что приводит к снижению интенсивности гибели нервных клеток головного мозга и нейровоспалительных реакций, и, кроме того, ожидается, что оно будет улучшать, облегчать или предотвращать симптомы и прогрессирование синуклеинопатий, таких как болезнь Паркинсона.

Более того, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению имеет отличную активность по выполнению обеих из двух функций (1) ингибирования передачи альфа-синуклеина или агрегатов альфа-синуклеина между нервными клетками (см. результаты клеточного анализа, раскрытые в настоящем описании) и (2) снижения уровня агрегатов альфа-синуклеина в нервной системе головного мозга посредством стимуляции фагоцитарной активности клеток микроглии. В частности, поскольку антитела к альфа-синуклеину, проходящие в данный момент клинические исследования или опубликованные в научной литературе, обладают одной из двух активностей (1) и (2), есть основания предполагать, что антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению обладает преимуществом в отношении более эффективного предотвращения или лечения синуклеинопатий по сравнению с известными антителами к альфа-синуклеину. Таким образом, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению имеет более высокую эффективность в отношении уменьшения количества и устранения агрегатов альфа-синуклеина и ингибирования действия агрегатов альфа-синуклеина как этиологического фактора и поэтому оно более эффективно при синуклеинопатиях или связанных с ними симптоматических заболеваниях (например, когнитивных расстройствах).

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, имеющие высокую аффинность в отношении агрегатов альфа-синуклеина, могут уменьшать образование агрегатов альфа-синуклеина, снижая посредством этого концентрацию агрегатов в головном мозге. Кроме того, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению с высокой аффинностью в отношении агрегатов альфа-синуклеина могут уменьшать образование агрегатов альфа-синуклеина вне центральной нервной системы и, в конечном счете, изменять состояние равновесия между формами альфа-синуклеина, разграниченными ГЭБ, приводя посредством этого к снижению концентрации агрегатов альфа-синуклеина в центральной нервной системе.

Это является большим преимуществом в клинической практике, поскольку позволяет получить достаточную эффективность даже при введении более удобным способом, например, без ограничения, подкожной инъекцией. Кроме того, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут, без ограничения данной теорией, ингибировать образование агрегатов, удаляя мономеры, или устранять как мономеры, так и агрегаты.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, специфично связывающиеся с белками альфа-синуклеина или агрегатами альфа-синуклеина, могут не являться продуктами, встречающимися в природе (они могут быть продуктами, не встречающимися в природе, например, продуктами химического синтеза или рекомбинантного метода). Методики рекомбинации хорошо известны в области техники

В настоящем описании "антитело" обозначает полноразмерный иммуноглобулин любого изотипа или антигенсвязывающий фрагмент, который может конкурировать с полноразмерным антителом за связывание с антигеном-мишенью. Например, оно включает химерные, гуманизированные, полноразмерные человеческие антитела, антитела с двойной специфичностью или их антигенсвязывающие фрагменты. Само по себе антитело является одной из разновидностей антигенсвязывающих белков. Обычно полноразмерное антитело содержит по меньшей мере 2 полноразмерные тяжелые цепи и 2 полноразмерные легкие цепи, но в некоторых случаях антитело может содержать только тяжелые цепи.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь происхождение только от одного источника или представлять собой химерное антитело. Химерное антитело содержит часть, имеющую происхождение от двух типов разных антител, и описано более подробно ниже. Антитело или его антиген-

связывающий фрагмент могут быть получены с использованием гибридомы, методикой рекомбинантных ДНК или ферментативным или химическим разделением интактного антитела. Если в настоящем описании не указано иное, термин "антитело" включает антитела, содержащие 2 полноразмерные тяжелые цепи и 2 полноразмерные легкие цепи, и их производные, варианты, фрагменты и мутанты, и их примеры описаны ниже.

В одном воплощении антитело включает, без ограничения, моноклональное антитело, биспецифичное антитело, минитело, доменное антитело, миметик антитела (или синтетическое антитело), химерное антитело, гуманизованное антитело, человеческое антитело, слитое антитело (или конъюгат антитела), их фрагменты и различные типы антител, раскрытые здесь. В одном воплощении фрагменты антител, раскрытые здесь, могут представлять собой Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты,

F(ab')₂-фрагменты, Fv-фрагменты, одноцепочечные фрагменты (scFv), диатело или молекулу одноцепочечного антитела из одной цепи, полученной соединением варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи через спейсер.

В настоящем описании "легкая цепь" включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность варибельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания с антигеном или эпитопом. Полноразмерная легкая цепь содержит домен варибельной области VL и домен константной области CL. Домен варибельной области легкой цепи присутствует на N-конце полипептида легкой цепи. Типы легкой цепи включают цепи каппа и лямбда.

В настоящем описании "тяжелая цепь" включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность варибельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания с антигеном или эпитопом. Полноразмерная тяжелая цепь содержит домен варибельной области VH и три (3) домена константных областей CH1, CH2 и CH3. Домен VH присутствует на N-конце полипептида тяжелой цепи, а домены CH присутствуют на C-конце, при этом CH3 расположен ближе всех к C-концу. Тяжелая цепь включает IgG (включая подтипы IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2) и изотипы IgM и IgE.

В настоящем описании "антигенсвязывающий фрагмент" обозначает часть антитела, обладающую специфичной аффинностью связывания с антигеном, и/или полипептид, содержащий такую часть. Например, антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой часть антитела, содержащую аминокислотный остаток, придающий антителу специфичность и/или аффинность в отношении антигена посредством его взаимодействия с антигеном (например, эпитопом), или полипептид, содержащий такую часть. Этот антигенсвязывающий фрагмент обычно содержит одну или более чем одну "определяющую комплементарность (CDR)", а также одну или более чем одну "каркасную область (FR)". CDR представляют собой аминокислотные последовательности, способствующие специфичности и аффинности связывания антитела с антигеном, а каркасные области представляют собой аминокислотные последовательности, способствующие поддержанию подходящей конформации этих CDR, и содействуют связыванию антигенсвязывающей области с антигеном.

При использовании в настоящем описании "антигенсвязывающий фрагмент" цепи (тяжелой цепи или легкой цепи) антитела или иммуноглобулина включает часть антитела, которая не имеет некоторых аминокислот по сравнению с полноразмерной цепью, но может специфично связываться с антигеном. Этот фрагмент можно рассматривать как обладающий биологической активностью, в том аспекте, что он может специфично связываться с антигеном-мишенью или может конкурировать с другими антителами или антигенсвязывающими фрагментами за связывание с определенным эпитопом. В одном аспекте данный фрагмент содержит по меньшей мере одну CDR, присутствующую в полноразмерной легкой цепи или тяжелой цепи, и в некоторых воплощениях он содержит одну цепь из тяжелой цепи и/или легкой цепи или ее часть. Этот биологически активный фрагмент может быть получен методикой рекомбинантных ДНК или может быть получен, например, ферментативным или химическим разделением интактного антитела. Иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина включает, без ограничения, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, доменное антитело и одноцепочечное антитело (например, scFv, scFv-Fc и так далее) и может иметь происхождение от любого млекопитающего, включая, без ограничения, человека, мышь, крысу, представителей семейства верблюдовых или кролика. Функциональная часть антитела, такая как одна или более чем одна CDR, описанные здесь, может быть связана с вторичным белком или низкомолекулярным соединением ковалентной связью и использована в качестве терапевтического агента, направленного на определенную мишень.

В настоящем описании "Fab-фрагмент" состоит из одной легкой цепи и одной тяжелой цепи, содержащей только варибельную область и CH1. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой тяжелой цепью.

В настоящем описании "Fc-область" содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены CH2 и CH3 антитела. Эти 2 фрагмента тяжелой цепи связаны друг с другом двумя или более дисульфидными связями и гидрофобным взаимодействием доменов CH3.

В настоящем описании "Fab'-фрагмент" дополнительно содержит, помимо Fab-фрагмента, область между доменами CH1 и CH2 тяжелой цепи, и между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов может быть образована дисульфидная связь.

В настоящем описании "F(ab')₂-фрагмент" содержит две легких цепи и две тяжелых цепи, содержащие переменную область, CH1 и часть константной области между доменами CH1 и CH2, как указано выше, и между 2 тяжелыми цепями образована межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом, F(ab')₂-фрагмент состоит из двух Fab'-фрагментов, и эти два Fab'-фрагмента связаны друг с другом дисульфидной связью, образованной между ними.

В настоящем описании "Fv-область" представляет собой фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи и легкой цепи, но не содержащий константной области.

В настоящем описании "одноцепочечное антитело" представляет собой единую полипептидную цепь антигенсвязывающей области, образованную соединением переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи через гибкий линкер. Например, одноцепочечное антитело может представлять собой по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из scFv, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи связаны в одноцепочечной форме, scFv-Fc, где переменная область тяжелой цепи, переменная область легкой цепи и Fc связаны в одноцепочечной форме, и тому подобного. Одноцепочечное антитело может относиться, например, к патенту США № 5,260,203.

В настоящем описании "бивалентный антигенсвязывающий белок" или "бивалентное антитело" содержит два сайта связывания антигена. Это бивалентное антитело может содержать два сайта связывания антигена, обладающих специфичностью в отношении одного и того же антигена, или может представлять собой антитело с двойной специфичностью, связывающееся с разными антигенами, соответственно. В настоящем описании "мультиспецифичный антигенсвязывающий белок" или "мультиспецифичное антитело" направлены на два или более чем два антигена или эпитопа.

В настоящем описании "биспецифичные" антигенсвязывающий белок или антитело или антигенсвязывающий белок либо антигенсвязывающий белок или антитело "с двойной специфичностью" представляют собой гибридные антигенсвязывающий белок или антитело, имеющие два разных сайта связывания антигена. Такое биспецифичное антитело является разновидностью мультиспецифичного антигенсвязывающего белка или мультиспецифичного антитела и может быть получено различными известными методами, такими как слияние гибридом или слияние Fab'-фрагментов.

В настоящем описании "биспецифичные" антигенсвязывающий белок или антитело, антигенсвязывающий белок или антитело "с двойной специфичностью" представляют собой гибридные антигенсвязывающий белок или антитело, имеющие 2 разных сайта связывания антигена. Это биспецифичное антитело является одной из разновидностей мультиспецифичного антигенсвязывающего белка или мультиспецифичного антитела, и оно может быть получено различными известными методами, например, такими методами, как слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. Возможные ссылки включают, например, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 1990, 79:315-321, Kostelny et al., J. Immunol. 1992, 148:1547-1553 и тому подобное. Два эпитопа, отличающиеся друг от друга, с которыми связываются два сайта связывания антигена, присутствующие в биспецифичном антигенсвязывающем белке или антителе, могут быть расположены на одном и том же белке-мишени или на разных белках-мишенях. В одном воплощении антитело по настоящему изобретению может иметь форму биспецифичного антитела, дополнительно включающего связывание с носителем для доставки антитела через гематоэнцефалический барьер. Один способ доставки лекарственных средств через гематоэнцефалический барьер включает использование систем доставки, таких как рецептор-опосредованный трансцитоз, например, через переносчик глюкозы, переносчик аминокислот, рецептор инсулина или рецептор трансферрина в клетке.

В настоящем описании "конъюгат" обозначает химерную молекулу антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, раскрытых в настоящем описании, с другой молекулой, в особенности с переносчиками через гематоэнцефалический барьер или терапевтическим агентом, описанными ниже. В конъюгате антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связаны с другими молекулами ковалентной связью или физическими силами, такими как силы Ван-дер-Ваальса или силы гидрофобного взаимодействия, капсулированием, заключением или комбинацией указанных методов. В конъюгате по одному воплощению антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть соединены пептидным линкером.

Настоящее изобретение также включает одну или более чем одну аминокислотную последовательность, в существенной степени идентичную одной или более чем одной аминокислотной последовательности, раскрытой в настоящем описании. Существенная идентичность последовательности означает, что последовательность с изменением сохраняет эффекты, раскрытые в настоящем изобретении. В одном воплощении указанная последовательность идентична раскрытой переменной области тяжелой цепи приблизительно на 90%, 95% или 99%. В одном воплощении указанная последовательность идентична раскрытой переменной области легкой цепи приблизительно на 90%, 95% или 99%. Например, в случае варианта, демонстрирующего 90%-ю, 95%-ю или 99%-ю идентичность последовательности антитела или антигенсвязывающего фрагмента, раскрытых в настоящем изобретении, любое изменение последовательности происходит в карманной области переменной области, но не в CDR.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающиеся с альфасинуклеином или его агрегатами, по настоящему изобретению содержат переменную область тяжелой

цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и варибельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

В одном воплощении антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать следующие последовательности CDR:

CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:434 и SEQ ID NO:439,

CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:435-437 и 649 и SEQ ID NO:440-441,

CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:438 и SEQ ID NO:442,

CDR1 легкой цепи (L-CDR1), выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:443 и SEQ ID NO:446,

CDR2 легкой цепи (L-CDR2), выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:444 и SEQ ID NO:447, и

CDR3 легкой цепи (L-CDR3), выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:445 и SEQ ID NO:448.

Аминокислотные последовательности CDR1-CDR3 тяжелой цепи и аминокислотные последовательности CDR1-CDR3 легкой цепи изложены в табл. 8 и 9.

Таблица 8

Аминокислотные последовательности CDR1-CDR3 тяжелой цепи

Идентификатор клона	SEQ ID NO:	VH_CDR1 Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	VH_CDR2 Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	VH_CDR3 Аминокислотная последовательность
ch11F11-VH	434	GFTFSDFYME	435	ASRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH1	434	GFTFSDFYME	436	AIRNKANDYTTEYAASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH2	434	GFTFSDFYME	436	AIRNKANDYTTEYAASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH3	434	GFTFSDFYME	649	AIRNKANDYTTEYADSVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH4	434	GFTFSDFYME	649	AIRNKANDYTTEYADSVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VHv3	434	GFTFSDFYME	437	ATRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VHv1mu1 newmu	434	GFTFSDFYME	437	ATRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VHv3 newmu	434	GFTFSDFYME	437	ATRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH-v1	434	GFTFSDFYME	435	ASRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH-v2	434	GFTFSDFYME	435	ASRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH-v3	434	GFTFSDFYME	435	ASRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH-v4	434	GFTFSDFYME	435	ASRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
ch3A9-VH	439	GFTFSSYAMS	440	TISNGGGYTYYPDSVKG	442	HITTVRPTKYFDY
Hu3A9-VH1	439	GFTFSSYAMS	440	TISNGGGYTYYPDSVKG	442	HITTVRPTKYFDY
Hu3A9-VH2	439	GFTFSSYAMS	441	TISNGGGYTYADSVKG	442	HITTVRPTKYFDY
Hu3A9-VH3	439	GFTFSSYAMS	440	TISNGGGYTYYPDSVKG	442	HITTVRPTKYFDY
Hu3A9-VH4	439	GFTFSSYAMS	441	TISNGGGYTYADSVKG	442	HITTVRPTKYFDY
Hu3A9-VH-v1	439	GFTFSSYAMS	440	TISNGGGYTYYPDSVKG	442	HITTVRPTKYFDY
Hu3A9-VH-v2	439	GFTFSSYAMS	440	TISNGGGYTYYPDSVKG	442	HITTVRPTKYFDY

Таблица 9

Аминокислотные последовательности CDR1-CDR3 легкой цепи

Идентификатор клона	SEQ ID NO:	VL_CDR1 Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	VL_CDR1 Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	VL_CDR1 Аминокислотная последовательность
ch11F11-VL	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL1	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL2	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL3	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL4	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL5	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
Hu11F11-VLv3 4c	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
ch3A9-VL	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL1	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL2	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL3	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL4	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL-v1	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL-v2	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL-v2	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT

В одном воплощении антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:434, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:435-437 и 649, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:438, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:443, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:444, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:445.

Кроме того, в одном воплощении антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:439, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:440-441, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:442, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:446, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:447, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:448.

В другом воплощении антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать

каркасную область тяжелой цепи (H-FR1), расположенную на N-конце H-CDR1, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:449-450 и SEQ ID NO:468-473,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), расположенную между H-CDR1 и H-CDR2, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:451-452 и SEQ ID NO:474-477,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), расположенную между H-CDR2 и H-CDR3, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:453-464 и SEQ ID NO:478-483,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), расположенную на C-конце H-CDR3, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:465-467 и SEQ ID NO:484-485,

каркасную область легкой цепи (L-FR1), расположенную на N-конце L-CDR1, содержащую поли-

пептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:486-491 и SEQ ID NO:504-510,

каркасную область легкой цепи (L-FR2), расположенную между L-CDR1 и L-CDR2, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:492-494 и SEQ ID NO:511-514,

каркасную область легкой цепи (L-FR3), расположенную между L-CDR2 и L-CDR3, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:495-500 и SEQ ID NO:515-521, и/или

каркасную область легкой цепи (L-FR4), расположенную на С-конце L-CDR3, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:501-503 и SEQ ID NO:522.

Как аминокислотные последовательности, полезные здесь в качестве каркасных областей, примеры последовательностей каркасных областей тяжелой цепи приведены в табл. 3 и 4, а примеры последовательностей каркасных областей легкой цепи приведены в табл. 10 и 11.

Таблица 10

Аминокислотные последовательности каркасных областей 1-2 тяжелой цепи

Клон	SEQ ID NO:	Последовательность VH-FR1	SEQ ID NO:	Последовательность VH-FR2
ch11F11-VH	449	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCA TS	451	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH1	471	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA AS	452	WVRQAPGKGGLEWIA
Hu11F11-VH2	471	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA AS	452	WVRQAPGKGGLEWIA
Hu11F11-VH3	471	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA AS	475	WVRQAPGKGGLEWIA
Hu11F11-VH4	471	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA AS	452	WVRQAPGKGGLEWVA
Hu11F11-VHv3	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA TS	451	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VHv1mu1newmu	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA TS	451	WVRQPPGKRLEWIA

Hu11F11-VHv3 newmu	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA TS	451	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v1	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA TS	451	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v2	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA TS	451	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v3	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA TS	451	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v4	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA TS	451	WVRQPPGKRLEWIA
ch3A9-VH	468	EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCA AS	474	WVRQTPEKRLEWVA
Hu3A9-VH1	469	QVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCA AS	475	WVRQAPGKGLEWVA
Hu3A9-VH2	470	EVQLVQSGGGLVQP GGSLRLSCA AS	476	WVRQAPDKGLEWVA
Hu3A9-VH3	471	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCA AS	475	WVRQAPGKGLEWVA
Hu3A9-VH4	471	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCA AS	475	WVRQAPGKGLEWVA
Hu3A9-VH-v1	472	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCA AS	477	WVRQTPEKGLEWVA
Hu3A9-VH-v2	473	EVQLLES GGGLVQP GGSLKLSCA AS	477	WVRQTPEKGLEWVA

Аминокислотные последовательности каркасных областей 3-4 тяжелой цепи

Клон	SEQ ID NO:	Последовательность VH-FR3	SEQ ID NO:	Последовательность VH-FR4
ch11F11-VH	453	RFIVSRDTSQSILYLQMNALRAED TAIYYCAR	465	WGQGTLLTVSA
Hu11F11-VH1	454	RFTVSRDTSKNSLYLQMNSLKTE DTAVYYCAR	466	WGQGTLLTVSS
Hu11F11-VH2	455	RFTISRDTSKNSLYLQMNSLKTED TAVYYCAR	466	WGQGTLLTVSS
Hu11F11-VH3	456	RFTVSRDTSQNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAR	466	WGQGTLLTVSS
Hu11F11-VH4	457	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCSR	466	WGQGTLLTVSS
Hu11F11-VHv3	458	RFTISRDDSKSSLYLQMNSLRAED TAIYYCAR	467	WGQGTLLTVSS
Hu11F11-VHv1mu1 newmu	459	RFTISRDTSQSSLYLQMNSLKTED TAVYYCAR	467	WGQGTLLTVSS
Hu11F11-VHv3 newmu	460	RFTISRDTSQSSLYLQMNSLRAED TAIYYCAR	467	WGQGTLLTVSS
Hu11F11-VH-v1	461	RFTISRDDSKSSLYLQMNSLRAED TAIYYCAR	467	WGQGTLLTVSS
Hu11F11-VH-v2	462	RFTVSRDDSKSSLYLQMNSLRAE DTAIYYCAR	467	WGQGTLLTVSS
Hu11F11-VH-v3	463	RFTISRDTSKSSLYLQMNSLRAED TAIYYCAR	467	WGQGTLLTVSS
Hu11F11-VH-v4	464	RFTVSRDTSKSSLYLQMNSLRAE DTAIYYCAR	467	WGQGTLLTVSS
ch3A9-VH	478	RFTISRDNKNTLYLQMSSLRSED TAMYYCAR	484	WGQGTLLTVSS
Hu3A9-VH1	479	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRSE DSAMYYCAR	485	WGQGTLLTVSS
Hu3A9-VH2	480	RFTISRDNKNTLYLQMSSLKAE DSAVYYCAR	485	WGQGTLLTVSS
Hu3A9-VH3	481	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAR	485	WGQGTLLTVSS

Hu3A9-VH4	482	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCAR	485	WGQGTTLTVSS
Hu3A9-VH- v1	483	RFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAED TAMYYCAR	484	WGQGTTLTVSS
Hu3A9-VH- v2	483	RFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAED TAMYYCAR	484	WGQGTTLTVSS

Таблица 12

Аминокислотные последовательности каркасных областей 1-2 легкой цепи

Клон	SEQ ID NO:	Последовательность VL-FR1	SEQ ID NO:	Последовательность VL-FR2
ch11F11-VL	486	DIVMTQSPSSLA VSVGEKVTMSC	492	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu11F11-VL1	487	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	493	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VL2	488	DIVMTQSPSSLA VSLGERVTITC	493	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VL3	489	DIVMTQSPSSLA VSLGERATINC	493	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VL4	490	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITC	494	WYQQKPGKAPKLLIY
Hu11F11-VL5	486	DIVMTQSPSSLA VSVGEKVTMSC	493	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11- VLv3 4c	491	DIVMTQSPSSLA VSLGERVTMSC	492	WYQQKPGQSPKLLIY
ch3A9-VL	504	DIVMTQSPKFMSTSV GDRVSITC	511	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu3A9-VL1	505	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITC	512	WYQQKPGKAPKLLIY
Hu3A9-VL2	506	DIVMTQSPSTLSASV GDRVTITC	513	AWYQQKPGKAPKLLI Y
Hu3A9-VL3	507	DIVMTQSPATLSVSLGERATLSC	514	WYQQKPGQAPRLLIY
Hu3A9-VL4	508	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITC	512	WYQQKPGKAPKLLIY
Hu3A9-VL-v1	509	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITC	511	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu3A9-VL-v2	510	DIVMTQSPSSMSTSV GDRVTITC	511	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu3A9-VL-v2	510	DIVMTQSPSSMSTSV GDRVTITC	511	WYQQKPGQSPKLLIY

Таблица 13

Аминокислотные последовательности каркасных областей 3-4 легкой цепи

Клон	SEQ ID NO:	Последовательность VL-FR3	SEQ ID NO:	Последовательность VL-FR4
ch11F11-VL	495	GVPDRFTGSGSGTDFLTISVKA EDLAVYYC	501	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VL1	496	GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQA EDVAVYYC	502	FGGGTKVEIK
Hu11F11-VL2	497	GVPDRFSGSGSGTDFLTISVQA EDVAVYYC	501	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VL3	496	GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQA EDVAVYYC	501	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VL4	498	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPE DFATYYC	503	FGQGTKVEIK
Hu11F11-VL5	499	GVPDRFSGSGSGTDFLTISVQA EDLAVYYC	501	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VLv3 4c	500	GVPDRFTGSGSGTDFLTISVKA EDVAVYYC	501	FGGGTKLEIK
ch3A9-VL	515	GVPDRFTGSGSGTDFLTISNMQS EDLADYFC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL1	516	GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQPE DFATYYC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL2	517	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPD DFASYC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL3	518	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSE DFAVYYC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL4	519	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPE DFATYYC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL-v1	520	GVPDRFSGSGSGTDFFTISSMQS EDIATYFC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL-v2	521	GVPDRFSGSGSGTDFLTISSMQS EDLADYYC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL-v2	521	GVPDRFSGSGSGTDFLTISSMQS EDLADYYC	522	FGAGTKLELR

В другом воплощении антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую аминокислоту, выбранную из SEQ ID NO:434 и SEQ ID NO:439, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащую аминокислоту, выбранную из SEQ ID NO:435-437 и 649 и SEQ ID NO:440-441, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащую аминокислоту, выбранную из SEQ ID NO:438 и SEQ ID NO:442,

где переменная область тяжелой цепи дополнительно содержит каркасную область тяжелой цепи (H-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:449-450 и SEQ ID NO:468-473, каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:451-452 и SEQ ID NO:474-477, каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:453-464 и SEQ

Антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному воплощению настоящего изобретения содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:439, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:440-441, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:442, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:446, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:447, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:448,

где вариабельная область тяжелой цепи содержит каркасную область 1 тяжелой цепи (H-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:463-473, каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:474-477, каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:478-483, и каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:484-485, и

где вариабельная область легкой цепи содержит каркасную область 1 легкой цепи (L-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:504-510, каркасную область легкой цепи (L-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:511-514, каркасную область легкой цепи (L-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:515-521, и каркасную область легкой цепи (L-FR4), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:522.

В полноразмерных формах легкой цепи и тяжелой цепи вариабельная область и константная область соединены "J-областью" длиной приблизительно 12 или более аминокислот, а тяжелая цепь также содержит "D-область" длиной приблизительно 10 или более аминокислот. Возможные ссылки включают, например, *Fundamental Immunology*, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press. Обычно пара из вариабельных областей легкой цепи и тяжелой цепи антитела могут образовывать антигенсвязывающую область.

Вариабельная область цепи иммуноглобулина обычно имеет одну и ту же общую структуру и содержит относительно консервативные каркасные области (FR), соединенные тремя гипервариабельными участками, называемыми "областями или доменами, определяющими комплементарность", или CDR. CDR вариабельных областей каждой цепи, образующей пару "тяжелая цепь/легкая цепь", обычно выровнены каркасными областями с образованием структуры, специфично связывающейся с определенным эпитопом белка-мишени (альфа-синуклеина). Эти элементы встречающихся в природе вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи обычно включены в следующем порядке от N-конца к C-концу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Положение аминокислотных последовательностей, соответствующих каждому из этих элементов, в вариабельной области, обозначают в соответствии с системой нумерации Kabat (*Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (в редакциях от 1987 г. и 1991 г., NIH, Bethesda, MD)) или Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196 : 901-917; Chothia et al., 1989, *Nature* 342: 878-883.

Различные вариабельные области тяжелой цепи и вариабельные области легкой цепи, раскрытые здесь, показаны в табл. 14 и 15. Каждая из этих вариабельных областей может быть соединена с константной областью тяжелой цепи и константной областью легкой цепи с образованием тяжелой цепи и легкой цепи интактного антитела. Кроме того, полученные последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи можно также сочетать, образуя структуру полноразмерного антитела. Например, антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:523-534 или SEQ ID NO:535-541, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:542-548 или SEQ ID NO:549-556, и, конкретнее, вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:523-534, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:542-548, или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:535-541, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:549-556.

В одном конкретном воплощении настоящего изобретения антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:531-534, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:548 (например, Hu11F11 (ver.1), Hu11F11 (ver.2), Hu11F11 (ver.3), Hu11F11 (ver.4) и так далее), или могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:525, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:546 (например, антитело Hu11F11 (ABL2-4)).

Примеры аминокислотных последовательностей варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно одному воплощению приведены в табл. 14 и 15.

Таблица 14

Варибельная область тяжелой цепи (VH)

Клон	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
ch11F11-VH	523	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPG KRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQM NALRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGLVTVSA
Hu11F11-VH1	524	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPG KGLEWIAAIRNKANDYTTEYAASVKGRFTVSRDTSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARDAHGKPFAYWGQGLVTVSS
Hu11F11-VH2	525	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPG KGLEWIAAIRNKANDYTTEYAASVKGRFTISRDTSKNSLYLQM NSLKTEDTAVYYCARDAHGKPFAYWGQGLVTVSS

Hu11F11-VH3	526	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPG KGLEWIAAIRNKANDYTTEYADSVKGRFTVSRDTSQNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDAHGKPFAYWGQGTLVTVSS
Hu11F11-VH4	527	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPG KGLEWVAAIRNKANDYTTEYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSRDAHGKPFAYWGQGTLVTVSS
Hu11F11-VHv3	528	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPG KRLEWIAATR NKANDYTTEYSASVKGRFTISRDDSKSSLYLQM NSLRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11- VHv1mu1 newmu	529	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPG KRLEWIAATR NKANDYTTEYSASVKGRFTISRDTSSLYLQM NSLKTEDTAVYYCARDAHGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VHv3 newmu	530	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPG KRLEWIAATR NKANDYTTEYSASVKGRFTISRDTSSLYLQM NSLRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH- v1	531	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPG KRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDDSKSSLYLQM NSLRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH- v2	532	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPG KRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTVSRDDSKSSLYLQ MNSLRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH- v3	533	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPG KRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDTSSLYLQM NSLRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH- v4	534	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPG KRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTVSRDTSSLYLQ MNSLRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTTVTVSS
ch3A9-VH	535	EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSYAMSWVRQTPE KRLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMS SLRSEDTAMYYCARHITTVRPTKYFDYWGQGTTLTVSS

Hu3A9-VH1	536	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRSEDSAMYYCARHITTVRPTKYFDYWGQGTLTVSS
Hu3A9-VH2	537	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPD KGLEWVATISNGGGYTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMS SLKAEDSAVYYCARHITTVRPTKYFDYWGQGTLTVSS
Hu3A9-VH3	538	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARHITTVRPTKYFDYWGQGTLTVSS
Hu3A9-VH4	539	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVATISNGGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARHITTVRPTKYFDYWGQGTLTVSS
Hu3A9-VH-v1	540	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEK GLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSL RAEDTAMYYCARHITTVRPTKYFDYWGQGTTTLTVSS
Hu3A9-VH-v2	541	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEK GLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSL RAEDTAMYYCARHITTVRPTKYFDYWGQGTTTLTVSS
ch9B11-VH	557	EVQLQESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRQDFDYWGQGTTTLTVSS

Таблица 15

Варибельная область легкой цепи (VL)

Клон	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
ch11F11-VL	542	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWY QKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKA EDLAVYYCQYYSPWTFGGGTKLEIK
Hu11F11-VL1	543	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE

		DVAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKVEIK
Hu11F11-VL2	544	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAE DVAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIK
Hu11F11-VL3	545	DIVMTQSPSSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIK
Hu11F11-VL4	546	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQ QKPGKAPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQYYSYPWTFGQGTKVEIK
Hu11F11-VL5	547	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQA EDLAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIK
Hu11F11-VLv3 4c	548	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKA EDLAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIK
ch3A9-VL	549	DIVMTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTTVAWYQQKPGQ SPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADY FCQQYSNYPLTFGAGTKLELR
Hu3A9-VL1	550	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQQKPGK APKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYSNYPLTFGGGTKLEIK
Hu3A9-VL2	551	DIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQQKPGK APKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDEFASY CQQYSNYPLTFGQGTKVEIK
Hu3A9-VL3	552	DIVMTQSPATLSVSLGERATLSCKASQNVGTTVAWYQQKPGQ APRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYY CQQYSNYPLTFGGGTKVEIK
Hu3A9-VL4	553	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQQKPG KAPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYSNYPLTFGQGTKVEIK

Hu3A9-VL-v1	554	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGTTVAWYQQKPGQS PKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSMQSEDIATYFC QQYSNYPLTFGQGKLEIK
Hu3A9-VL-v2	555	DIVMTQSPSSMSTSVGDRTITCKASQNVGTTVAWYQQKPGQ SPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSMQSEDIADYY CQQYSNYPLTFGQGKLEIK
Hu3A9-VL-v2	556	DIVMTQSPSSMSTSVGDRTITCKASQNVGTTVAWYQQKPGQ SPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSMQSEDLADY YCQQYSNYPLTFGQGKLEIK
ch9B11-VL	558	DIVMTQSPSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHNSGNTYLHWYLQ KPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFCSQSTHVPLTFGAGTKLEQKR

Кроме того, антитела, содержащие комбинацию варибельной области тяжелой цепи с варибельной областью легкой цепи и константную область антитела или антигенсвязывающего фрагмента по одному воплощению, описаны в табл. 16.

Таблица 16

Примеры антител по изобретению

Название образца	Цепь	Аминокислотная последовательность
hu11F11 (ver.1)	Тяжелая (SEQ ID NO:560)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPG KRLEWIAASRNKANDYTTTEYSASVKGRFTISRDDSKSSLYLQ MNSLRAEDTAIYYCARD AHGKPFAYWGQGT TTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

	Легкая (SEQ ID NO:566)	DIVMTQSPSSLA VSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVK AEDVAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
hu1F11 (ver.2)	Тяжелая (SEQ ID NO:561)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPG KRLEWIAASRNKANDYTTTEYSASVKGRFTVSRDDSKSSLYLQ MNSLRAEDTAIYYCARDAGKPFAYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая (SEQ ID NO:566)	DIVMTQSPSSLA VSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVK AEDVAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

hu11F11 (ver.3)	Тяжелая (SEQ ID NO:562)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPG KRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDTKSSLYLQ MNSLRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая (SEQ ID NO:566)	DIVMTQSPSSLAVALSGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISSVK AEDVAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
hu11F11 (ver.4)	Тяжелая (SEQ ID NO:563)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPG KRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTVSRDTKSSLYLQ MNSLRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

	Легкая (SEQ ID NO:566)	DIVMTQSPSSLA VSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVK AEDVAVYYCQQYYSYPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
hu11F11 (H2L4)	Тяжелая (SEQ ID NO:564)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAP GKGLEWIAAIRNKANDYTTEYAASVKGRFTISRDTSKNSLYL QMNSLKTEDTAVYYCARDAGKPFAYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая (SEQ ID NO:567)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWY QQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLP EDFATYYCQQYYSYPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
hu3A9 (VH5/L3)	Тяжелая (SEQ ID NO:565)	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTP KGLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQM NSLRSEDTAVYYCARHITVRPTKYFDYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая (SEQ ID NO:568)	DIVMTQSPATLSVSLGERATLSCKASQNVGTTVAWYQQKPG QAPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAV YYCQQYSNYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

Для того чтобы вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи, описанные здесь, образовали тяжелую цепь и легкую цепь интактного антитела, каждая вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи может быть связана с константной областью тяжелой цепи и константной областью легкой цепи. Каждую из тяжелой цепи и легкой цепи, полученных как

описано выше, можно надлежащим образом комбинировать с получением комбинации "тяжелая цепь - легкая цепь", и полученная комбинация "тяжелая цепь - легкая цепь" может образовывать мультимер (например, димер в случае антитела типа IgG), что приводит к построению структуры интактного антитела.

Константная область может быть надлежащим образом выбрана из константных областей тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов (например, человеческих иммуноглобулинов). Например, без ограничения, константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область тяжелой цепи IgG1, константную область тяжелой цепи IgG3 или константную область тяжелой цепи IgG4, а константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или константную область лямбда. Для стабильности антитела, простоты его получения, аффинности в отношении антигена и/или других желаемых характеристик могут быть надлежащим образом выбраны и использованы другие типы константных областей или модифицированные константные области, которые очевидны специалистам в области техники.

В другом воплощении каждая из переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи, раскрытых в табл. 14 и 15, могут быть свободно скомбинированы друг с другом с образованием различных антител и связаны в одноцепочечной форме с получением одноцепочечных антител, таких как scFv.

Антитело, описанное здесь, может иметь определенную общую область или последовательность с другим антителом, раскрытым здесь. В одном воплощении антитело может иметь общую константную область с другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В другом воплощении оно может иметь общую Fc-область.

В одном воплощении антитело против альфа-синуклеина по настоящему изобретению также включает моноклональное антитело и поликлональное антитело. В другом воплощении антитело против альфа-синуклеина может представлять собой человеческое антитело, гуманизованное антитело, химерное антитело или антитело, имеющее происхождение от животного. В другом воплощении антитело против альфа-синуклеина может быть получено рекомбинантным методом или химическим синтезом.

Антигенсвязывающие фрагменты или фрагменты антител, описанных здесь, могут представлять собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из молекул одноцепочечных антител scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab', F(ab')₂, минитела, диатела, scFv и тому подобного.

В другом воплощении антитело, предложенное здесь, может представлять собой гуманизованное антитело или человеческое антитело и может относиться к различным изотипам (например, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE или IgD), особенно к типам IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, таким как типы IgG1 или IgG2.

В другом воплощении антитело против альфа-синуклеина может содержать только тяжелую цепь или легкую цепь, описанные выше. В другом воплощении антитело против альфа-синуклеина имеет только переменную область тяжелой цепи или только переменную область легкой цепи.

Специалистам в данной области будет ясно, что, когда антитело содержит один или более чем один CDR, раскрытые здесь, каждый из раскрытых CDR можно выбирать и комбинировать независимо от других. Таким образом, могут быть получены антитела, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или 6 независимо выбранных CDR. Специалистам в данной области также будет ясно, что, при выборе CDR для комбинации, CDR одного и того же типа не используют повторно и обычно не получают антитела, содержащие, например, два участка CDR-H2.

В одном воплощении антитело может представлять собой моноклональное антитело или поликлональное антитело. Антитела, раскрытые здесь, включают моноклональные антитела, связывающиеся с альфа-синуклеином. Моноклональные антитела могут быть получены с применением любой методики, известной в данной области. Например, они могут быть получены иммортализацией клеток селезенки, полученных от иммунизированных трансгенных животных. Моноклональные антитела, секретируемые гибридомными клеточными линиями, могут быть очищены с применением методик, известных в данной области.

В других воплощениях антитело может представлять собой антитело животного происхождения (например, мышинное антитело и так далее), химерное антитело (например, мышинное-человеческое химерное антитело), гуманизованное антитело или человеческое антитело. Антитело может также быть модифицировано различными способами для различных целей. Также предложены химерные антитела и гуманизованные антитела. Химерные антитела представляют собой антитела, в которых полипептидные фрагменты, имеющие происхождение от разных антител, ковалентно связаны с образованием иммунологически функциональных легкой цепи, тяжелой цепи или их фрагмента.

В таком моноклональном антителе определенный аминокислотный остаток, обычно входящий в состав части антитела, не участвующей в распознавании антигена, модифицирован, чтобы быть гомологичным соответствующему остатку изотипа, соответствующего человеческому антителу. Гуманизация может быть проведена различными известными методами, например, заменой по меньшей мере части переменной области грызуна на соответствующую область человеческого антитела (патенты США №№ 5,585,089 и 5,693,762; Jones et al., Nature 1986, 321: 522-525; Riechmann et al., Nature 1988, 332: 323-27; Verhoeven et al., Science 1988, 239: 1534-1536).

Полноразмерное человеческое антитело может быть получено иммунизацией трансгенного животного (обычно мыши), которое может вырабатывать человеческое антитело ввиду отсутствия выработки эндогенного иммуноглобулина. Полноразмерное человеческое антитело может также иметь происхождение от фаговой дисплейной библиотеки. Использование полноразмерных человеческих антител позволяет минимизировать иммуногенные и аллергические реакции, которые могут быть вызваны введением человеку мышинового mAb или mAb мышинового происхождения.

В одном воплощении отбор человеческих антител к альфа-синуклеину по настоящему изобретению проводят методом фагового дисплея. Моноклональные фаговые антитела, специфичные в отношении альфа-синуклеина, отобранные методом фагового скрининга, превращают в полноразмерную форму IgG с применением рекомбинантного метода. Последовательность каждого моноклонального фагового антитела получают для рекомбинантного получения антител против альфа-синуклеина. После соединения последовательности варибельной области тяжелой цепи с последовательностью константной области тяжелой цепи и последовательности варибельной области легкой цепи с последовательностью константной области легкой цепи в полученных последовательностях, аминокислотные последовательности преобразуют в нуклеотидную последовательность методом оптимизации кодонов. После клонирования полученных нуклеотидных последовательностей в векторы, используемые для культивирования клеток животных, клетки-хозяева, используемые для получения белков, такие как клетки CHO, трансформируют полученными векторами и культивируют. Для очистки антител, присутствующих в культуральной среде, рекомбинантные антитела выделяют и очищают с применением методики очистки, такой как аффинная хроматография.

В другом воплощении антитело может иметь типичную структуру встречающегося в природе антитела или модифицированную структуру.

Антитело, имеющее типичную структуру, может иметь мультимерную структуру, включающую структурные единицы, содержащие две разные полипептидные цепи (то есть тяжелую цепь и легкую цепь). Указанные две разные полипептидные цепи включают одну полноразмерную легкую цепь (приблизительно 25 кДа) и одну полноразмерную тяжелую цепь (приблизительно 50-70 кДа). Каждая цепь имеет характерную пространственную структуру и состоит из нескольких иммуноглобулиновых доменов, состоящих из приблизительно 90-110 аминокислот. Эти домены являются основными структурами, из которых состоит полипептид антитела. N-концевая часть каждой цепи обычно содержит часть, называемую варибельной областью или V-областью, которая представляет собой часть, распознающую антиген. С-концевая часть эволюционно более консервативна, чем N-концевая, и содержит часть, называемую константной областью или C-областью. Человеческую легкую цепь обычно классифицируют как легкие цепи каппа (κ) и лямбда (λ), и они содержат одну варибельную область и одну константную область. Тяжелую цепь обычно классифицируют как цепь мю (μ), дельта (δ), гамма (γ), альфа (α) или эпсилон (ϵ), и их определяют как изоотипы IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. IgG включает многочисленные подтипы, в том числе, без ограничения, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Константная область тяжелой цепи обычно содержит один или более чем один домен, демонстрирующие эффекторную функцию. Число доменов в константной области тяжелой цепи варьирует в зависимости от изоотипа. Тяжелая цепь IgG, например, содержит три домена C-области, известные как CH1, CH2 и CH3, соответственно. Антитело, раскрытое здесь, может представлять собой антитело любого из этих изоотипов и подтипов. В одном воплощении антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело подтипа IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 или IgG4.

Агрегат альфа-синуклеина по настоящему изобретению специфично распознает агрегаты альфа-синуклеина с высокой аффинностью и специфичностью, указывая на то, что антитело к альфа-синуклеину может быть полезно для диагностики или выявления таких заболеваний. Кроме того, антитело к альфа-синуклеину, специфично распознающее агрегаты альфа-синуклеина, по настоящему изобретению ингибирует образование агрегатов альфа-синуклеина, разрушает агрегаты или ингибирует межклеточный перенос агрегатов, благодаря чему оно может быть полезным образом использовано для лечения синуклеинопатий, в частности болезни Паркинсона.

Примеры биспецифичных антител по настоящему изобретению показаны в табл. 17.

Таблица 17

Биспецифичное антитело Идентификатор клона	Легкая цепь биспецифичного антитела	Комбинированная тяжелая цепь биспецифичного антитела	SEQ ID	Пояснения по тяжелой цепи биспецифичного антитела	SEQ ID
ch11F11-1564-3 bivalent	ch11F11-VL	ch11F11-1564-3 бивалентная (HC)	569	CH11F11 (IGG)-	640
				(G4S)3-	412
				1564-3 VL-	297
				(G4S)4-	411
				1564-3 VH	178
ch11F11-1564-2 bivalent	ch11F11-VL	ch11F11-1564-2 бивалентная (HC)	570	CH11F11 (IGG),	640
				(G4S)3,	412
				1564-2 VL,	296
				(G4S)4,	411
				1564-2 VH	177
ch11F11-1564-3 monovalent	ch11F11-VL	ch11F11-1564-3 моновалентная (HC 1, -впадина) (1564-3 scFv)	571	CH11F11 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВПАДИНА» АТ FC,	641
				(G4S)3,	412
				1564-3 VL,	297
				(G4S)4,	411
		1564-3 VH	178		
		ch11F11-1564 моновалентная (HC 2, -выступ)	573	CH11F11 (IGG) WITH МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	573
ch11F11-1564-2 monovalent	ch11F11-VL	ch11F11-1564-2 моновалентная (HC 1, -впадина) (1564-2 scFv)	572	CH11F11 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВПАДИНА» АТ FC,	641
				(G4S)3,	412
				1564-2 VL,	296
				(G4S)4,	411
		1564-2 VH	177		
		ch11F11-1564 моновалентная (HC 2, -выступ)	573	CH11F11 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВЫСТУП»	573
ch3A9-1564-3 bivalent	ch3A9-VL	ch3A9-1564-3 бивалентная (HC)	574	CH3A9 (IGG),	642
				(G4S)3,	412
				1564-3 VL,	297
				(G4S)4,	411
				1564-3 VH	178
ch3A9-1564-2 bivalent	ch3A9-VL	ch3A9-1564-2 бивалентная (HC)	575	CH3A9 (IGG),	642
				(G4S)3,	412

				1564-2 VL,	296
				(G4S)4,	411
				1564-2 VH	177
ch3A9-1564-3 monovalent	ch3A9-VL	ch3A9-1564-3 моновалентная (НС 1, -впадина)	576	СН3А9 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВПАДИНА» АТ FC	643
				(G4S)3,	412
				1564-3 VL,	297
				(G4S)4,	411
		1564-3 VH	178		
		ch3A9-1564 моновалентная (НС 2, -выступ)	578	СН3А9 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВЫСТУП»	578
ch3A9-1564-3 monovalent	ch3A9-VL	ch3A9-1564-2 моновалентная (НС 1, -впадина)	577	СН3А9 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВПАДИНА» АТ FC,	643
				(G4S)3,	412
				1564-2 VL,	296
				(G4S)4,	411
		1564-2 VH	177		
		ch3A9-1564 моновалентная (НС 2, -выступ)	578	СН3А9 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВЫСТУП»	578
hu11F11(ver.2)-1564-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-1564-3 бивалентная (НС)	579	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				1564-3 VL,	297
				(G4S)4,	411
				1564-3 VH	178
hu11F11(ver.2)-1564-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-1564-2 бивалентная (НС)	580	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				1564-2 VL,	296
				(G4S)4,	411
				1564-2 VH	177
hu11F11(ver.2)-1564-3 monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-1564-3 моновалентная (НС 1, -впадина)	581	hu11F11(ver.2 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВПАДИНА» АТ FC,	645
				(G4S)3,	412
				1564-3 VL,	297
				(G4S)4,	411

				1564-3 VH	178
		hu11F11(ver.2)-1564 моновалентная (НС 2, -выступ)	583	hu11F11(ver.2 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВЫСТУП»	583
hu11F11(ver.2)-1564-2 monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-1564-2 моновалентная (НС 1, -впадина)	582	hu11F11(ver.2 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВПАДИНА» АТ FC,	645
				(G4S)3,	412
				1564-2 VL,	296
				(G4S)4,	411
		1564-2 VH	177		
		hu11F11(ver.2)-1564 моновалентная (НС 2, -выступ)	583	hu11F11(ver.2 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВЫСТУП»	583
**		человеческий IgG1 M428L mutated (CH1, CH2, CH3)	584	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ IGG1 M428L МУТАЦИЯ АТ FC	584
hu11F11(ver.2)(M428L))-1564-DMP bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L))-1564-DMP bivalent(НС)	585	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				1564-DMP VL,	299
				(G4S)4,	411
1564-DMP VH	180				
hu11F11(ver.2)(M428L))-1564-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L))-1564-DM bivalen t(НС)	586	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				1564-DM VL,	298
				(G4S)4,	411
1564-DM VH	179				
hu11F11(ver.2)(M428L))-1564-DMP monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L))-1564-DMP моновалентная (НС 1, -впадина)	587	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				1564-DMP VL,	299
				(G4S)4,	411
		1564-DMP VH	180		
		hu11F11(ver.2)(M428L))-1564 monovalent, (НС 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L))-1564-DM monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L))-1564-DMP	588	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L,	647

		monovalent, (НС 1, - впадина)		МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА», (G4S)3,	412
				1564-DM VL,	298
				(G4S)4,	411
				1564-DM VH	179
		hu11F11(ver.2)(M428L)-1564 monovalent, (НС 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)-C04-3 monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-C04-3 моновалентная (НС 1, -впадина)	590	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	645
				(G4S)3,	412
				C04-3 VL,	334
				(G4S)4,	411
				C04-3 VH	215
		hu11F11(ver.2)-C04 моновалентная (НС 2, -выступ)	583	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	583
hu11F11(ver.2)-C04-2 monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-C04-2 моновалентная (НС 2, -выступ)	591	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	645
				(G4S)3,	412
				C04-2 VL,	333
				(G4S)4,	411
				C04-2 VII	214
		hu11F11(ver.2)-C04 моновалентная (НС 2, -выступ)	583	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	583
hu11F11(ver.2)-F06-03 monovalent		hu11F11(ver.2)-F06-3 моновалентная (НС 1, -впадина)	592	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	645
				(G4S)3,	412
				F06-3 VL,	339
				(G4S)4,	411
				F06-3 VH	220
		hu11F11(ver.2)-C04 моновалентная (НС 2, -выступ)	583	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	583
hu11F11(ver.2)-F06-02 monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-F06-02 моновалентная (НС 1, -впадина)	593	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	645
				(G4S)3,	412

				F06-2 VL,	338
				(G4S)4,	411
				F06-2 VH	219
		hu11F11(ver.2)-C04 моновалентная (HC 2, -выступ)	583	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	583
hu11F11(ver.2)-VH2-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH2-3 бивалентная (HC)	594	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH2-3 VL,	356
				(G4S)4,	411
				VH2-3 VH	237
hu11F11(ver.2)-VH2-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH2-2 бивалентная (HC)_2	595	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH2-2 VL,	355
				(G4S)4,	411
				VH2-2 VH	236
hu11F11(ver.2)-VH5-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH5-3 бивалентная (HC)	596	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH5-3 VL,	361
				(G4S)4,	411
				VH5-3 VH	242
hu11F11(ver.2)-VH5-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH5-2 бивалентная (HC)_2	597	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH5-2 VL,	360
				(G4S)4,	411
				VH5-2 VH	241
hu11F11(ver.2)-VH6-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH6-3 бивалентная (HC)	598	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH6-3 VL,	366
				(G4S)4,	411
				VH6-3 VH	247
hu11F11(ver.2)-VH6-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH6-2 бивалентная (HC)_2	599	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH6-2 VL,	365
				(G4S)4,	411
				VH6-2 VH	246

hu11F11(ver.2)-VH7-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH7-3 бивалентная (HC)	600	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH7-3 VL,	371
				(G4S)4,	411
				VH7-3 VH	252
hu11F11(ver.2)-VH7-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH7-2 бивалентная (HC)_2	601	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH7-2 VL,	370
				(G4S)4,	411
				VH7-2 VH	251
hu11F11(ver.2)-VH9-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH9 бивалентная (HC)	602	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH9-3 VL,	376
				(G4S)4,	411
				VH9-3 VH	257
hu11F11(ver.2)-VH9-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH9 бивалентная (HC)_2	603	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH9-2 VL,	375
				(G4S)4,	411
				VH9-2 VH	256
hu11F11(ver.2)-VH16-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH16 бивалентная (HC)	604	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH16-3 VL,	381
				(G4S)4,	411
				VH16-3 VH	262
hu11F11(ver.2)-VH16-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH16 бивалентная (HC)_2	605	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH16-2 VL,	380
				(G4S)4,	411
				VH16-2 VH	262
hu11F11(ver.2)-VH27 - 3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH27 бивалентная (HC)	606	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH27-3 VL,	386
				(G4S)4,	411

				VH27-3 VH	267
hu11F11(ver.2)-VH27-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH27 бивалентная (HC)_2	607	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH27-2 VL,	385
				(G4S)4,	411
				VH27-2 VH	266
hu11F11(ver.2)-VH32-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH32 бивалентная (HC)	608	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH32-3 VL,	391
				(G4S)4,	411
				VH32-3 VH	272
hu11F11(ver.2)-VH32-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH32 бивалентная (HC)_2	609	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH32-2 VL,	390
				(G4S)4,	411
				VH32-2 VH	271
hu11F11(ver.2)-VH35-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH35 бивалентная (HC)	610	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH35-3 VL,	396
				(G4S)4,	411
				VH35-3 VH	277
hu11F11(ver.2)-VH35-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH35 бивалентная (HC)_2	611	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH35-2 VL,	395
				(G4S)4,	411
				VH35-2 VH	276
hu11F11(ver.2)(M428L)-C04-DMP monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-C04-DMP моновалентная (HC 1, -впадина)	612	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				C04-DMP VL,	336
				(G4S)4,	411
				C04-DMP VH	217
		hu11F11(ver.2)(M428L)-C04 (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА	589

				«ВЫСТУП»	
hu11F11(ver.2)(M428L)-C04-DM monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-C04-DM моновалентная (НС 1, -впадина)	613	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				C04-DM VL,	335
				(G4S)4,	411
		C04-DM VH	216		
		hu11F11(ver.2)(M428L)-C04 (НС 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L)-F06-DMP monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-F06-DMP моновалентная (НС 1, -впадина)	614	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				F06-DMP VL,	341
				(G4S)4,	411
		F06-DMP VH	222		
		hu11F11(ver.2)(M428L)-F06 моновалентная (НС 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L)-F06-DM monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-F06-DM моновалентная (НС 1, -впадина)	615	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				F06-DM VL,	340
				(G4S)4,	411
		F06-DM VH	221		
		hu11F11(ver.2)(M428L)-F06 monovalent, deamidated, S->P (НС 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH2-DMP bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH2-DMP бивалентная (НС)	616	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH2-DMP VL,	358
				(G4S)4,	411
				VH2-DMP VH	239

hu11F11(ver.2)(M428L)-VH2-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH2-DM бивалентная (HC)	617	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH2-DM VL,	357
				(G4S)4,	411
				VH2-DM VH	238
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5-DMP bivalent, (HC)	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5-DMP bivalent, (HC)	618	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH5-DMP VL,	363
				(G4S)4,	411
				VH5-DMP VH	244
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5-DM bivalent, (HC)	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5-DM bivalent, (HC)	619	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH5-DM VL,	362
				(G4S)4,	411
				VH5-DM VH	243
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5-DMP monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5-DMP monovalent, (HC 1, - впадина)	620	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				VH5-DMP VL,	363
				(G4S)4,	411
		VH5-DMP VH	244		
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5_DM monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5_DM monovalent, (HC 1, - впадина)	621	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				VH5-DM VL,	362
				(G4S)4,	411
		VH5-DM VH	243		
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5 monovalent, deamidated, S->P (HC 2, -выступ)			589	hu11F11(ver.2 (IGG),M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
				hu11F11(ver.2 (IGG),M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА	589

				«ВЫСТУП»	
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH6-DMP bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH-DMP6 бивалентная (HC)	622	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH6-DMP VL,	368
				(G4S)4,	411
				VH6-DMP VH	249
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH6-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH6-DM бивалентная (HC)	623	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH6-DM bivalent VL, (G4S)4,	367
				(G4S)4,	411
				VH6-DM VH	248
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH7-DMP bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH7-DMP бивалентная (HC)	624	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH7-DMP VL,	373
				(G4S)4,	411
				VH7-DMP VH	254
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH7-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH7-DM bivalent, (HC)	625	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH7-DM VL,	372
				(G4S)4,	411
				VH7-DM VH	253
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DMP bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DMP бивалентная (HC)	626	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH9-DMP VL,	378
				(G4S)4,	411
				VH9-DMP VH	259
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DM bivalent, (HC)	627	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH9-DM VL,	377
				(G4S)4,	411
				VH9-DM VH	258

hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DMP monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DMP monovalent, (HC 1, -впадина)	628	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				VH9-DMP VL,	378
				(G4S)4,	411
		VH9-DMP VH	259		
		hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9 monovalent, deamidated, S->P (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DM monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DM моновалентная (HC 1, -впадина)	629	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				VH9-DM VL,	377
				(G4S)4,	411
		VH9-DM VH	258		
		hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9 monovalent, deamidated, S->P (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DMP bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DMP bivalent, (HC)	630	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH16-DMP VL,	383
				(G4S)4,	411
				VH16-DMP VH	264
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DM бивалентная (HC)	631	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH16-DM VL,	382
				(G4S)4,	411
				VH16-DM VH	263
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DMP monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DMP моновалентная (HC 1, -впадина)	632	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				VH16-DMP VL,	383

				(G4S)4,	411
				VH16-DMP VH	264
		hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16 monovalent, deamidated, S->P (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG),M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DM monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DM моновалентная (HC 1, -впадина)	633	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»»,	647
				(G4S)3,	412
				VH16-DM VL,	382
				(G4S)4,	411
		VH16-DM VH	263		
		hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16 monovalent, deamidated, S->P (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG),M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH27-DMP бивалентная (HC)	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH27-DMP бивалентная (HC)	634	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH27-DMP VL,	388
				(G4S)4,	411
VH27-DMP VH	269				
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH27-DM бивалентная (HC)	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH27-DM бивалентная (HC)	635	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH27-DM VL,	387
				(G4S)4,	411
VH27-DM VH	268				
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH32 -DMP bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH32 -DMP бивалентная (HC)	636	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH32-DMP VL,	393
				(G4S)4,	411
VH32-DMP VH	274				
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH32-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH32-DM bivalent(HC)	637	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH32-DM VL,	392

				(G4S)4,	411
				VH32-DM VH	273
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH35-DMP bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH35-DMP бивалентная (HC)	638	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH35-DMP VL,	398
				(G4S)4,	411
				VH35-DMP VH	279
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH35-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH35-DM bivalent (HC)	639	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH35-DM VL,	397
				(G4S)4,	411
				VH35-DM VH	278

Эффект изобретения

Антитело, полученное в одном воплощении настоящего изобретения, специфично связывается с IGF1R с оптимизированной силой связывания, подходящей для трансцитоза через эндотелий головного мозга, и может быть полезно для доставки терапевтических антител для применения при дегенеративных заболеваниях головного мозга и раке головного мозга, терапевтическая эффективность которых ограничена из-за низкой способности к проникновению через сосудистый барьер головного мозга. В частности, моноклональное антитело, раскрытое в настоящем изобретении, не влияет на связывание лигандов, таких как IGF-1, IGF-2 и инсулин, и их гомологов с IGF1R и действует, не ингибируя передачу сигналов через IGF1R. Таким образом, его полезность связана с проникновением через гематоэнцефалические барьеры.

Антитела, раскрытые здесь, позволяют эффективно удалять агрегаты альфа-синуклеина или стимулировать их распад, ингибируют проникновение альфа-синуклеина в клетки и поэтому могут быть полезным образом использованы в лечении заболеваний, ассоциированных с накоплением агрегатов альфа-синуклеина.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлены результаты дот-блоттинга, демонстрирующие, что антитело против альфа-синуклеина, полученное в одном воплощении настоящего изобретения, специфично связывается с нативным альфа-синуклеином в агрегированной форме.

На фиг. 2 представлены результаты ELISA-анализа аффинности антитела против альфа-синуклеина, полученного в одном воплощении настоящего изобретения.

На фиг. 3а представлены результаты ВIАсоге-анализа специфичности и аффинности преимущественного связывания антитела против альфа-синуклеина, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, с агрегатами альфа-синуклеина. На фиг. 3б представлена таблица, в которой показаны результаты, представленные на фиг. 3а.

На фиг. 4а представлены результаты Octet-анализа специфичности преимущественного связывания антитела против альфа-синуклеина, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, с агрегатами альфа-синуклеина. На фиг. 4б представлена таблица, в которой показаны результаты, представленные на фиг. 4а.

На фиг. 5а и 5б показаны результаты, согласно которым антитела против альфа-синуклеина 3А9 и 11F11 в одном воплощении настоящего изобретения могут специфично распознавать тельца Леви и нейриты Леви в ткани головного мозга человека, соответственно. Показано, что антитела по настоящему изобретению связываются с тельцами Леви (стрелки) и нейритами Леви (нитевидная форма в нижней левой части).

На фиг. 6 представлено схематическое отображение результатов картирования эпитопов антител против альфа-синуклеина по одному воплощению настоящего изобретения, где антитела по настоящему изобретению связываются, в основном, с С-концевой областью.

На фиг. 7 представлены результаты ELISA-анализа аффинности химерного антитела против альфа-синуклеина и гуманизированного антитела 11F11, полученных в одном воплощении настоящего изобретения.

На фиг. 8 представлены результаты ВIАсоге-анализа специфичности и аффинности преимущественного связывания химерного антитела против альфа-синуклеина и гуманизированного антитела 11F11, полученных в одном воплощении настоящего изобретения, с агрегатами α -syn.

На фиг. 9а, 9б и 10 представлены результаты дот-блоттинга и результаты ELISA-анализа, демонстрирующие, что химерное антитело к альфа-синуклеину, полученное в одном воплощении настоящего изобретения, специфично связывается с альфа-синуклеином, в особенности с агрегатами альфа-синуклеина, но не с бета-синуклеином, гамма-синуклеином, амилоидом бета₁₋₄₂ или белком тау.

На фиг. 11a-11b представлены данные по связыванию антитела против IGF1R, полученного в одном из воплощений настоящего изобретения, с белком IGF1R.

На фиг. 12 представлены данные по связыванию антитела против IGF1R, полученного в одном из воплощений настоящего изобретения, с клеточными линиями, экспрессирующими IGF1R.

На фиг. 13 представлены данные по результатам, связанным с интернализацией антитела против IGF1R, полученного в одном из воплощений настоящего изобретения, клеточными линиями, экспрессирующими IGF1R, и тем, что происходит с ним в этих клеточных линиях.

На фиг. 14 представлены данные по результатам, демонстрирующим, что антитело против IGF1R, полученное в одном из воплощений настоящего изобретения, не влияет на передачу сигналов через IGF1R или инсулин.

На фиг. 15a представлены данные по результатам, демонстрирующим, что антитело против IGF1R, полученное в одном из воплощений настоящего изобретения, не обладает ADCC.

На фиг. 15b представлены данные по результатам, демонстрирующим, что многократное введение антитела против IGF1R, полученного в одном из воплощений настоящего изобретения, не влияет на уровень IGF1R в головном мозге.

На фиг. 15c представлена микроскопическая картина, демонстрирующая, что антитело против IGF1R, полученное в одном из воплощений настоящего изобретения, связывается с эндотелиальной клеткой головного мозга без связывания с нормальным нейроном в головном мозге.

На фиг. 16 представлены данные по результатам, демонстрирующим, что биспецифичное антитело, содержащее антитело против IGF1R и терапевтическое антитело, может проникать в ГЭБ-систему эффективнее, чем терапевтическое антитело.

На фиг. 17 представлены данные по результатам, демонстрирующим, что антитело против IGF1R и биспецифичное антитело, содержащее антитело против IGF1R и терапевтическое антитело, имеют распределение в головном мозге и СМЖ больше, чем терапевтическое антитело само по себе, когда их однократно вводят крысе.

На фиг. 18a представлены результаты, идентифицирующие остаток, подверженный дезамидированию, в антителе против IGF1R, полученном в одном из воплощений настоящего изобретения.

На фиг. 18b представлены варианты, полученные посредством замены конкретных аминокислот для предотвращения дезамидирования.

На фиг. 19 представлены результаты картирования эпитопов антитела против IGF1R.

На фиг. 20a и 20b представлены результаты ELISA-анализа по измерению аффинности биспецифичного антитела по одному воплощению настоящего изобретения в отношении каждого антигена.

На фиг. 20c и 20d представлены результаты ELISA-анализа по сравнению химерного антитела и гуманизированного антитела применительно к каждому антигену.

На фиг. 20e представлены результаты оценки фагоцитарной активности микроглии применительно к биспецифичному антителу, полученному в одном воплощении настоящего изобретения.

На фиг. 21a-21e представлены результаты оценки эффективности биспецифичного антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, по сравнению с одиночным антителом в модели на мышах.

На фиг. 22 представлен результат, демонстрирующий увеличенный период полувыведения и лучшее проникновение через ГЭБ в результате конструирования Fc биспецифичного антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения.

Вариант осуществления изобретения

Пример 1. Получение мышинового антитела к альфа-синуклеину.

1-1. Иммунизация и получение гибридомы.

Мономерный альфа-синуклеин, полноразмерный (140 остатков) или без 21 остатков на C-конце (119 остатков), помещали в термомиксер при 37°C, агрегировали с покачиванием при 1050 об/мин на протяжении 14 суток и обрабатывали ультразвуком. Фибриллы α -syn, 140 остатков и 119 остатков, 1 мг/мл, смешивали с адьювантом в отношении 1:1 (об./об.).

Аминокислотная последовательность альфа-синуклеина Homo sapiens (SEQ ID NO:559):

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVAT

VAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGTFVKKDQLGKNEEGAPQ

EGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPAA.

Затем 200 мкл полученной смеси вводили подкожно самкам мышей BALB/c в возрасте от 5 до 7 недель. Через 2 недели проводили еще одно подкожное введение 200 мкл полученной смеси для стимуляции выработки антител. Через одну неделю после второй инъекции проводили забор крови и титрование иммунизации методом ELISA с использованием введенного антигена. Затем проводили третью инъекцию с подкожным введением антигена самого по себе.

У иммунизированных мышей удаляли селезенку и получали из нее клетки селезенки. Полученные клетки селезенки суспендировали в среде Hybridoma-SFM (Thermo Fisher Scientific, США), дополненной

10%FBS. Для получения гибридомы клетки селезенки и клетки мышинной миеломы SP2/0-Ag14 смешивали в среде Hybridoma-SFM без сыворотки с последующим центрифугированием для удаления среды. Затем к полученному клеточному осадку добавляли ПЭГ и проводили инкубацию при 37°C на протяжении 1 минуты для индукции слияния клеток.

1-2. Клонирование отдельных клеток и очистка антител.

Через 2 недели после индукции слияния, слияние с мышинными В-клетками, продуцирующими антитела, подтверждали методом ELISA с использованием антигена, вводимого мышам, и среды для культивирования клеток. Затем проводили клонирование отдельных клеток с использованием гибридомы, отбирая 16 гибридом, продуцирующих моноклональные антитела. Клоны 9B11 (IgG1 каппа) были получены с использованием агрегатов полноразмерного (140 остатков) α -суп в качестве антигена, а клоны 3A9 и 11F11 (IgG2b каппа и IgG2b каппа, соответственно) были получены с использованием агрегатов α -суп без 21 остатков на С-конце в качестве антигенов.

Для очистки антител каждую гибридому культивировали в среде RPMI1640, содержащей 10%FBS. Для получения антител культуральную среду заменяли бессывороточной средой SFM и проводили культивирование на протяжении приблизительно 4 суток. Супернатант клеточной культуры отделяли, центрифугировали, фильтровали через 0,22 мкм фильтр и очищали с использованием колонки с белком G для типа IgG1 и колонки с белком A для остальных антител.

1-3. Определение последовательности варибельной области.

Последовательности варибельных областей и CDR определяли по Ahn et al, Mol. Cells 2004, 18 (2): 237-241. Гибридомы культивировали и центрифугировали, выделяя только клетки. Из выделенных гибридом выделяли РНК, добавляя триазол, и использовали ее в качестве матрицы для синтеза кДНК. Последовательности варибельных областей и CDR подтверждали секвенированием.

Пример 2. Получение (химерных) антител против альфа-синуклеина.

2-1. Клонирование и экспрессия антител.

Используя нуклеотидные последовательности варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи антитела, полученного после гуманизации, синтезировали gBlock (M.Biotech) короткого нуклеотидного фрагмента и клонировали его в вектор для культур клеток животных (pcDNA3.4). gBlock синтезировали, включая перекрывающиеся последовательности длиной приблизительно 20 п.о. до и после варибельной области, и часть вектора pcDNA3.4 без варибельной области амплифицировали посредством ПЦР и клонировали методом сборки по Гибсону.

Для трансфекции и экспрессии клонированного антитела полученный вектор использовали для Maxi-Prep (Qiagen) с получением большого количества плазмидной ДНК и затем вводили ее в клетки следующим образом. В день, предшествующий трансфекции, концентрацию клеток ExpiCHO™ (Gibco, номер по каталогу A29127) доводили до $3-4 \times 10^6$ жизнеспособных клеток на 1 мл в экспрессионной среде ExpiCHO™ (Gibco, номер по каталогу A29100-01) и проводили культивирование при 8% CO₂, 37°C и 120 об/мин на протяжении 1 суток. В день трансфекции ДНК проводили подготовку клеток, выращенных до $7-10 \times 10^6$ жизнеспособных клеток на 1 мл, с показателями выживаемости 95% или более, разводя их свежей средой до 6×10^6 жизнеспособных клеток на 1 мл.

Для трансфекции исходных клеток подготавливали комплекс ExpiFectamine™ CHO и плазмидной ДНК с использованием набора для трансфекции ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit (Gibco, номер по каталогу A29129). ДНК и реагенты ExpiFectamine™ CHO подготавливали в подходящих концентрациях, разводя их холодной средой OptiPRO™ SFM® (Gibco, номер по каталогу 12309019), вносили соответствующим образом и перемешивали, оставляя стоять при комнатной температуре на 5 минут. Полученный продукт добавляли к исходным клеткам и проводили их посттрансфекционное культивирование. На следующий день после трансфекции к трансфицируемым клеткам добавляли реагенты Enhancer и Feed, входящие в состав набора ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit, и через 5 суток еще раз добавляли реагент Feed, после чего проводили инкубацию на протяжении 10 суток при 8% CO₂, 37°C и 120 об/мин с получением трансфицированных клеток.

Для получения культурального раствора культуральную среду переносили в центрифужную бутылку для центрифугирования и центрифугировали при 4°C и 6500 об/мин на протяжении 30 минут с последующей фильтрацией через фильтр размером 0,2 мкм, получая культуральную среду без взвешенных твердых частиц, и затем полученную культуральную среду использовали для последующей очистки.

2-2. Очистка и секвенирование антитела.

Культуру очищали с использованием HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare, 11-0034-94). После уравнивания уравнивающим буфером (50 mM трис-HCl, pH 7,2, 100 mM NaCl) полученную культуру загружали на колонку. По завершении загрузки среду промывали 50 mM цитратом натрия (pH 5,0) и затем проводили элюирование с использованием 50 mM цитрата натрия (pH 3,4). К элюату добавляли 1 M трис-HCl, pH 9,0, для нейтрализации до pH 6,0. Затем в элюате заменяли буфер, концентрировали его с использованием PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор, pH 7,4) и хранили при 4°C до последующего использования.

При необходимости дополнительной очистки проводили вторую очистку исходя из размера элюи-

рованного образца, пропуская первый очищенный продукт через IX PBS-буфер на колонке HiLoad 26/600 Superdex 200. Аминокислотную последовательность очищенного антитела анализировали масс-спектрометрией и подтверждали ее соответствие вариательной области моноклонального антитела мышинного происхождения.

Остов вариательной области человеческого антитела изотипа IgG1 заменяли вариательными областями антител 3A9, 9B11 и 11F11, определенными описанным выше методом, с получением химерного человеческого антитела IgG1. Среди полученных химерных антител, в частности, антитело Ch11F11 представляет собой антитело в форме IgG и содержит комбинацию последовательности вариательной области тяжелой цепи SEQ ID NO:90 (ch11F11-VH) и последовательности вариательной области легкой цепи SEQ ID NO:109 (ch11F11-VL), и антитело Ch3A9 представляет собой антитело в форме IgG и содержит комбинацию последовательности вариательной области тяжелой цепи SEQ ID NO:102 (ch11F11-VH) и последовательности вариательной области легкой цепи SEQ ID NO:116 (chl 1F11-VL).

Пример 3. Получение гуманизированного антитела.

3-1. Получение фаговой библиотеки.

Конструировали минибиблиотеку, в которой последовательность мышинного или человеческого происхождения была введена в каждый остаток CDR, при связывании человеческих каркасных областей с остатками CDR1, CDR2 и CDR3 химерного антитела.

Компетентные клетки полученной минибиблиотеки вносили в 2X среду YT (17 г триптона (CONDA, 1612.00), 10 г дрожжевого экстракта (CONDA, 1702.00) и 5 г NaCl (Sigma, S7653)), содержащую 34 мкг/мл хлорамфеникола (Sigma, C0857), 2% глюкозы (Sigma, G5400) и 5 mM MgCl₂ (Sigma, C0857), при 30°C на 3 часа до OD₆₀₀ 0,5-0,7. Затем клетки инфицировали фагом-помощником и культивировали в 2X среде YT, содержащей 34 мкг/мл хлорамфеникола, 5 mM MgCl₂, 70 мкг/мл канамицина (Sigma, K1876) и 1 mM IPTG (ELPISBIO, IPTG025), при 30°C на протяжении 6 часов для индукции упаковки фагов. Культуральный раствор центрифугировали при 4500 об/мин и 4°C на протяжении 15 минут. В супернатант добавляли 4% ПЭГ 6000 (Fluka, 81253) и 3% NaCl (Sigma, S7653) и проводили инкубацию на протяжении 1 часа на льду. Полученный продукт центрифугировали при 8000 об/мин на протяжении 20 минут при 4°C, затем осадок суспендировали в PBS и центрифугировали снова при 4°C и 12000 об/мин на протяжении 10 минут с получением супернатанта, содержащего фаговую библиотеку. Полученный супернатант хранили при 4°C до последующего использования.

3-2. Пэннинг с фаговым дисплеем.

Для отбора антител, связывающихся преимущественно с агрегатами альфа-синуклеина, а не с его мономерами, проводили пэннинг с использованием агрегатов полноразмерного альфа-синуклеина, полученных в примере 1, и в общей сложности три пэннинга проводили следующим образом.

Бычий сывороточный альбумин (BSA) добавляли к клеткам в концентрации 3% в пробирке при 4°C на ночь, вносили в нее 10 мкг/мл агрегатов и мономеров рекомбинантного альфа-синуклеина в растворе PBS в иммунологической пробирке (Maxisorp 444202) и защищали поверхности, на которые не были сорбированы агрегаты и мономеры альфа-синуклеина. После опорожнения пробирки фаговую библиотеку антител, разведенных в 3%-м растворе BSA до 10¹²КОЕ, помещали в иммунологическую пробирку, на которую были сорбированы агрегаты и мономеры альфа-синуклеина, и проводили взаимодействие на протяжении 1 часа (отрицательный отбор). Затем фаги, не связанные с агрегатами и мономерами альфа-синуклеина, выделяли и подвергали взаимодействию на протяжении 2 часов при комнатной температуре с сорбированными агрегатами и мономерами альфа-синуклеина. Забуференный фосфатом физиологический раствор (0,05% Tween 20) использовали для восстановления 100 мкМ раствора триэтиламина, который восстанавливали с использованием раствора PBS-T. E. coli при 37°C на протяжении 1 часа, и инфицированные E. coli высевали на 2X агаровую среду YT и культивировали при 37°C в течение ночи (pH 7,4), их инфицировали ER2537. На следующий день культивированные E. coli суспендировали в 4 мл 2X культурального раствора YT, содержащего карбенициллин, добавляли 15% глицерин и часть хранили при -80°C, а остальное использовали для получения фагов для последующих экспериментов. Повторяя этот процесс на протяжении в общей сложности 3 раундов, амплифицировали и концентрировали пул фагов, специфичных в отношении антигена альфа-синуклеина. Во время более поздних раундов пэннинга число промывок с использованием PBS-T увеличивали для увеличения количества и концентрации антигенспецифичных фагов.

3-3. Скрининг отдельных клонов.

Для отбора моноклональных антител, специфично связывающихся с агрегатами альфа-синуклеина из пула фагов, полученного при пэннинге, проводили следующий эксперимент.

Для выделения моноклонов из концентрированного пула, после посева пула фагов на агаровую среду LB с тетрациклином/карбенициллином и культивирования, выделяли отдельные колонии. Затем, после внесения моноклонов в глубокий 96-луночный планшет, в каждую лунку которого вносили по 400 мкл 2X среды YT с тетрациклином/карбенициллином, и выращивания в течение ночи, по 10 мкл культурального раствора вносили в новый глубокий 96-луночный планшет, в который вносили по 390 мкл 2X среды YT с тетрациклином/карбенициллином, и культивировали при 37°C на протяжении

4 часов. В культуральный раствор вносили 1 мМ IPTG и культивировали его при 30°C в течение ночи. Культуральный раствор, культивированный в течение ночи, центрифугировали, отбирая супернатант.

Затем клоны, экспрессирующие моноклональные растворимые scFv, связывающиеся с агрегатами альфа-синуклеина, отбирали с применением метода ELISA, как описано ниже (Steinberger, Rader and Barbas III. 2000. Phage display vectors. In: Phage Display Laboratory Manual, 1sted. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY. USA. pp. 11.9-11.12). Конкретно, антитело 7B7, отобранное в Примере 1-1, вносили в 96-луночный планшет (Nunc-Immuno Plates, NUNC, США) и проводили сорбцию при 4°C в течение ночи. В каждую лунку вносили 3% BSA в количестве 200 мкл с последующей блокировкой при 37°C на протяжении 2 часов. Затем вносили агрегаты и мономеры альфа-синуклеина в концентрации 100 нг на лунку, проводили взаимодействие при 37°C на протяжении 2 часов и пятикратную промывку с использованием 300 мкл PBS-T. Полученный супернатант отдельного клона смешивали с 3% BSA в объемном отношении 1:1 (об./об.) и 100 мкл полученного раствора вносили в планшет, с которым были связаны агрегаты и мономеры, с последующим взаимодействием при 37°C на протяжении 2 часов. Клетки промывали пять раз с использованием 300 мкл PBS-T и инкубировали при 37°C на протяжении 1 часа с антителом против HA, конъюгированным с HRP, с последующей пятикратной промывкой PBS-T. После добавления 100 мкл ТМВ (тетраметилбензидин, Sigma, T0440), реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 N H₂SO₄ для измерения оптической плотности при 450 нм. Клоны с оптической плотностью 0,5 или более рассматривали как положительную реакцию связывания, а клоны, неспецифично связывавшиеся с BSA, исключали.

Остатки CDR клонов, обнаруженных в библиотеке, анализировали на компьютере параллельно и отбирали клоны, приводившие к серьезным проблемам со связыванием с каркасными областями, или клоны, не имевшие T-клеточного эпитопа, B-клеточного эпитопа и эпитопа МНСII в каркасных областях, отличных от CDR.

Затем для пяти антител, полученных с использованием следующих комбинаций переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, переменную область гуманизированного антитела человеческого изотипа IgG1 заменяли на остов переменной области с получением пяти гуманизированных антител с остовом IgG1. Конкретно, Hu11F11 (ABL2-4) представляет собой антитело типа IgG и содержит комбинацию последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO:92 (Hu11F11-VH2) и последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO:113 (Hu11F11-VL4). Hu11F11 (ver.1) представляет собой антитело типа IgG и содержит комбинацию последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO:98 (Hu11F11-VH-v1) и последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO:115 (Hu11F11-VLv3 4c). Hu11F11 (ver.2) представляет собой антитело типа IgG и содержит комбинацию последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO:99 (Hu11F11-VH-v2) и переменной области легкой цепи SEQ ID NO:115 (Hu11F11-VLv3 4c). Hu11F11 (ver.3) представляет собой антитело типа IgG и содержит последовательность переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO:100 (Hu11F11-VH-v3) и последовательность переменной области легкой цепи SEQ ID NO:115 (Hu11F11-VLv3 4c).

Hu11F11 (ver.4) представляет собой комбинацию последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO:101 (Hu11F11-VH-v4) и последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO:115 (Hu11F11-VLv3 4c).

Пример 4. Анализ специфичности и аффинности связывания с антигеном при использовании антитела к альфа-синуклеину.

4-1. Дот-блоттинг-анализ с использованием антитела против альфа-синуклеина.

Эксперименты с дот-блоттингом проводили для анализа возможного связывания антитела по настоящему изобретению с мономерами или агрегатами в нативном состоянии. Для эксперимента 50 нг или 100 нг мономерного или фибриллярного белка α -syn (полученного профессором Lee Seung-jae из Национального университета Сеула (Seoul National University); Bae et al., J. Neurosci 32: 13454, 2012) наносили пятнами на нитроцеллюлозную мембрану. Двукратные разведения мономерного или фибриллярного белка наносили последовательно от правого края мембраны к левому (12,5, 25, 50, 100 нг). Мембрану блокировали 5% нежирным сухим молоком с TBST на протяжении 1 часа при комнатной температуре. 1 мг/мл антитела к α -syn, полученного в примере 1, добавляли к TBST, содержащему 1% бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали при комнатной температуре на протяжении 1 часа. После промывки с использованием TBST сигналы анализировали с использованием хемилюминесцентного субстрата (NEN) в качестве субстрата и вторичного антитела, конъюгированного с HRP (пероксидаза хрена), следуя инструкциям изготовителя. Результаты визуализировали с использованием системы анализа люминесцентных изображений LAS-3000 Luminescent Image Analysis System (FUJIFILM Life Science). Результаты показаны на фиг. 1.

Как показано на фиг. 1, было обнаружено, что антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению связывается преимущественно с агрегатами, но не с мономерами альфа-синуклеина. В частности, 9B11, 3A9 и 11F11 связывались с агрегатами. Антитело 274 (Bae et al., J Neurosci. 2012 Sep 26; 32 (39): 13454-13469) использовали в качестве антитела сравнения, связывающегося как с мономерами, так и с агрегатами.

4-2. ELISA-анализ с использованием мышинового моноклонального антитела против α -syn.

ELISA-анализ проводили для количественного анализа аффинности связывания антитела по настоящему изобретению с антигеном. Для этого антитело к альфа-синуклеину, полученное в примере 1, сорбировали на 96-луночный планшет в концентрации 1 мкг/мл и обрабатывали агрегатами фибрилл альфа-синуклеина в концентрации 10, 100, 1000 и 10000 нг/мл. После промывки с использованием PBS вносили стрептавидин, конъюгированный с HRP, и конъюгат вторичного антитела с биотином и затем проводили взаимодействие с TMB в качестве субстрата. Измеряли оптическую плотность, и полученные результаты показаны на фиг. 2.

Как показано на фиг. 2, было обнаружено, что антитела по настоящему изобретению связываются преимущественно с агрегатами с высокой аффинностью связывания. Результаты ELISA показали, что антитела, связывающиеся преимущественно с агрегатами, имеют аффинность от $0,1 \times 10^{-9}$ М до 2×10^{-9} М, в то время как аффинность антител, связывавшихся как с мономерами, так и с агрегатами, была выше и составляла приблизительно 1×10^{-10} М. Антитело по настоящему изобретению связывалось преимущественно с агрегатами альфа-синуклеина с высокой аффинностью, но получить аффинность в отношении мономера не удалось, поскольку оно связывалось с мономером с меньшей аффинностью, чем с агрегатами, или не связывалось с мономером. Эти результаты показывают, что рассматриваемое антитело позволяет эффективно устранять или ингибировать действие агента, вызывающего нейродегенеративные заболевания, связанные с альфа-синуклеиновой этиологией, такие как болезнь Паркинсона.

4-3. ВІАCore-анализ с использованием антитела против альфа-синуклеина.

Проводили количественный анализ связывания антитела к альфа-синуклеину, полученного в примере 1, с мономерными и агрегированными антигенами с применением ВІАCore-анализа.

Используемый прибор представлял собой T200 (GE Healthcare, серийный номер 1565888). В качестве чипа использовали белок А (GE Healthcare, номер по каталогу 29-1275-56). 10 мМ глицин-НСІ, рН 1,5 (GE Healthcare, номер по каталогу BR-1003-54), был восстанавливающим буфером. Рабочим буфером, буфером для разведения аналитов и буфером для разведения образцов был HBS-EP. Антитела к α -syn (3A9, 9B11 и 11F11), полученные в примере 1, разводили в 1x HBS-EP (GE Healthcare, номер по каталогу BR-1006-69), альфа-синуклеин в форме мономерного (1 мг/мл) и фибриллярного (3 мг/мл) белка разводили серийно в двух повторах и анализировали в общей сложности 6 концентраций (0, 0,39, 1,56, 6,25, 25, 100 нМ), включая 0 нМ. Для захвата число RU мономера составляло 800 (теоретическое), а число RU фибрилл -100 (теоретическое). Фазу захвата проводили при времени контакта 60 секунд, скорости потока 30 мкл/мин и периоде стабилизации 180 секунд. Фазу ассоциации проводили при времени ассоциации 120 секунд, и скорость потока составляла 30 мкл/мин. Фазу диссоциации проводили при времени диссоциации 360 секунд и скорости потока 30 мкл/мин. Фазу регенерации проводили дважды при времени регенерации 240 секунд (первичная) и 60 секунд (вторичная) и скорости потока 30 мкл/мин. Приближение проводили с использованием модели связывания 1:1, и аналитическим программным обеспечением было программное обеспечение ВІАCore T200 Evaluation Software (GE Healthcare). Полученные результаты показаны на фиг. 3а и 3б.

На фиг. 3а представлены результаты ВІАCore-анализа специфичности и аффинности преимущественного связывания моноклонального антитела, полученного в одном примере настоящего изобретения, с агрегатами альфа-синуклеина. Показано, что антитело по настоящему изобретению связывается с агрегатами с высокой аффинностью. Эти результаты показывают, что рассматриваемое антитело позволяет эффективно устранять или ингибировать действие агента, вызывающего нейродегенеративные заболевания, связанные с альфа-синуклеиновой этиологией, такие как болезнь Паркинсона. На фиг. 3б представлена таблица, в которой показаны результаты, представленные на фиг. 3а.

Как показано на фиг. 3а и 3б, 3A9, 9B11 и 11F11, у которых среди четырех антител к альфа-синуклеину, проанализированных другими методами, описанными выше, было подтверждено преимущественное связывание с агрегатами, в ВІАCore-анализе связывались только с агрегатами с высокой аффинностью, составлявшей приблизительно от 1×10^{-9} М до 3×10^{-9} М.

4-4. Octet-анализ с использованием мышинового моноклонального антитела против α -syn.

Проводили количественный анализ связывания антител к альфа-синуклеину (3A9, 9B11, 11F11), полученных в примере 1, с мономерными и агрегированными антигенами с применением Octet.

Конкретно, рабочий буфер представлял собой 1x буфер KB (номер по каталогу 18-1092) или 1x буфер PBS при 1000 об/мин, а буфер для иммобилизации представлял собой ацетат натрия, рН 5 (10 мМ, номер по каталогу 18-1068). Мономеры α -syn иммобилизовали как антиген α -syn, а фибриллы иммобилизовали для анализируемых антител. Целевые концентрации составляли 20 мкг/мл для мономера и 0,4 мкг/мл для фибрилл. Для оценки кинетики концентрации последовательно снижали в два раза, начиная с 50 нМ для мономеров и 100 нМ для фибрилл, получая в общей сложности 7 точек, соответственно. Время ассоциации/диссоциации составляло 5 мин/20 мин для мономера и 5 мин/25 мин для фибрилл. Биосенсор представлял собой ARG2, и приближение проводили с применением модели приближения 1:1. Полученные результаты показаны на фиг. 4. На фиг. 4а представлены результаты Octet-анализа специфичности преимущественного связывания антитела к альфа-синуклеину по одному воплощению настоящего изобретения с агрегатами α -syn.

Как показано на фиг. 4а, 3А9, 9В11 и 11F11 продемонстрировали незначительное связывание с мономерами (рамка с красными точками), но хорошо связывались с агрегатами (возрастающая часть графика в рамке с красными точками). Эти результаты сходны или согласуются с результатами дот-блоттинга, Остет-анализа и ELISA-анализа, и показывают, что 3А9, 9В11 и 11F11, у которых среди четырех антител к альфа-синуклеину, проанализированных другими методами, описанными выше, было подтверждено преимущественное связывание с агрегатами, в Остет-анализе связывались только с агрегатами. На фиг. 4b представлена таблица, в которой показаны результаты, представленные на фиг. 4а. Результаты, представленные на фиг. 4а и 4b, демонстрируют преимущественное связывание с агрегатами альфа-синуклеина и согласуются с результатами, представленными на фиг. 1. Антитело #274, использованное в качестве контрольной группы, хорошо связывалось как с мономерами, так и с агрегатами.

Пример 5. Выявление телец Леви в ткани головного мозга человека антителом против альфа-синуклеина.

Тельца Леви и нейриты Леви в заключенных в парафин срезах головного мозга толщиной десять микрометров, полученных от пациентов, умерших от болезни Паркинсона (Dr. Halliday, Сиднейский университет (University of Sydney)), окрашивали с использованием антитела, использованного в примере 5, следующим образом. Срезы ткани обрабатывали 90% муравьиной кислотой на протяжении 3 минут для демаскировки антигенов и затем пероксидазную активность самой ткани ингибировали 1% H₂O₂ (на основе 50% этанола). Проводили обработку 10% нормальной лошадиной сывороткой для предотвращения неспецифического связывания с тканями. Затем, после промывки фосфатным буфером, соседние срезы обрабатывали антителами 3А9, 11F11 и 11F11 по настоящему изобретению при 4°C в течение ночи. После промывки фосфатным буфером проводили обработку антителом против человеческого IgG, конъюгированным с биотином, при 37°C на протяжении 30 минут и взаимодействие с образованием авидин-биотинового комплекса при комнатной температуре на протяжении 30 минут (набор Vectastatin Elite; Vector Laboratories).

Затем проводили окрашивание с использованием DAB, содержавшего 0,005% H₂O₂, и контрастирующее окрашивание срезов 0,5% крезил-фиолетом для различения каждой клетки. Полученные результаты показаны на фиг. 5а и 5b.

На фиг. 8а и 8b показаны результаты, согласно которым моноклональные антитела 3А9 и 11F11 согласно одному воплощению настоящего изобретения могут специфично распознавать тельца Леви и нейриты Леви в ткани головного мозга человека, соответственно. Они показывают, что антитела по настоящему изобретению связываются с тельцами Леви (стрелки) и нейритами Леви (нитевидная форма в нижней левой части).

Как показано на фиг. 8а и 8b, антитело по настоящему изобретению продемонстрировало эффективное связывание с тельцами Леви и нейритами Леви (показано стрелками). Эти результаты показывают, что оно способно эффективно связываться с агрегатами альфа-синуклеина, входящими в состав телец Леви, в ткани головного мозга человека. Показано, что антитела, доставленные в головной мозг человека, могут эффективно и специфично связываться с агрегатами альфа-синуклеина. Эти результаты указывают на то, что антитела по настоящему изобретению фактически могут специфично связываться с агрегатами альфа-синуклеина в ткани головного мозга человека и могут быть эффективно использованы для предотвращения и/или лечения заболеваний, связанных с альфа-синуклеиновой этиологией.

Пример 6. Анализ эпителий антитела против альфа-синуклеина.

Картирование эпителий антител 3А9 и 11F11 как химерных антител, полученных в примере 2, проводили, запрашивая пептидный аллельный анализ у PEPSCAN (Нидерланды). Полученные результаты показаны на фиг. 6. На фиг. 6 представлено схематическое отображение результатов картирования эпителий антител согласно одному воплощению настоящего изобретения.

Как показано на фиг. 6, было продемонстрировано, что большинство антител по настоящему изобретению связываются с С-концевой областью. Антитела к альфа-синуклеину, распознающие N-конец, не могли распознавать агрегаты при других заболеваниях, таких как мультисистемная атрофия, принадлежащих к синуклеинопатиям, которые, вместе взятые, называются заболеваниями, связанными с альфа-синуклеином. В отличие от этого, антитела к альфа-синуклеину, распознающие С-концевую область, обладают тем преимуществом, что они распознают агрегаты при различных других синуклеинопатиях так же, как при болезни Паркинсона. В частности, как описано выше, было показано, что антитела, распознающие область между остатками 110 и 122, связываются преимущественно с агрегатами.

Пример 7. ELISA-анализ с использованием антитела против альфа-синуклеина.

Для количественного анализа аффинности связывания химерных антител (ch11F11), полученных в примере 2, и гуманизированных антител (Hu11F11), полученных в примере 3, проводили сэндвич-ELISA, применяя почти такой же метод, как в примере 4-2.

Конкретно, каждое антитело разводили в отношении 1/10, получая концентрации от 0,04 до 400 нМ, и сорбировали на 96-луночный планшет, после чего в каждую лунку вносили агрегаты фибрилл синуклеина в концентрации 2000 нг/мл. После промывки с использованием 1X PBS вносили стрептавидин, конъюгированный с HRP, и конъюгат вторичного антитела с биотином и затем проводили взаимодейст-

вие с ТМВ в качестве субстрата. Измеряли оптическую плотность. Полученные результаты показаны на фиг. 7.

Как показано на фиг. 7, было подтверждено, что гуманизированные антитела по настоящему изобретению, в частности гуманизированные антитела, имеющие происхождение от химерного 11F11 (гуманизированные антитела 11F11), демонстрируют аффинность связывания, эквивалентную химерному клону 11F11. Было подтверждено, что гуманизированные антитела, особенно гуманизированные антитела, имеющие происхождение от химерного 11F11, такие как Hu11F11 (ver. 1), содержащее комбинацию Hu11F11-VH-v1 и Hu11F11-VL_{v3} 4с, Hu11F11 (ver.2), содержащее комбинацию Hu11F11-VH-v2 и Hu11F11-VL_{v3} 4с, hu11F11 (ver.3) содержащее комбинацию Hu11F11-VH-v3 и Hu11F11-VL_{v3} 4с, Hu11F11 (ver.4), содержащее комбинацию Hu11F11-VH-v4 и Hu11F11-VL_{v3} 4с, демонстрировали аффинность связывания, эквивалентную химерному 11F11, а их EC₅₀ составляла от 11,5 до 15,1 нМ, что сходно с EC₅₀ химерного антитела 11F11, составлявшей 12,5 нМ.

Пример 8. ВІАсоге-анализ с использованием антитела против альфа-синуклеина.

Для количественного анализа аффинности связывания химерных антител (ch11F11), полученных в примере 2, и гуманизированных антител (Hu11F11), полученных в примере 3, проводили ВІАсоге-анализ, применяя почти такой же метод, как в примере 4-3. Результаты анализа показаны на фиг. 8 и в следующей таблице.

Таблица 18

Название клона	K _D (нМ)
Ch11F11	0,02472
Hu11F11(ver.2)	0,0596
Hu11F11(ver.3)	0,0316
Hu11F11(ver.4)	0,0204

В результате, гуманизированные антитела по настоящему изобретению, особенно варианты клона 11F11, а именно Hu11F11 (ver.2) (комбинация Hu11F11-VH-v2 и Hu11F11-VL_{v3} 4с), Hu11F11 (ver.3) (комбинация Hu11F11-VH-v3 и Hu11F11-VL_{v3} 4с) или Hu11F11 (ver.4) (комбинация Hu11F11-VH-v4 и Hu11F11-VL_{v3} 4с), продемонстрировали значения K_D, сходные со значениями K_D химерного клона 11F11. Применительно к аффинности связывания, гуманизированные клоны продемонстрировали K_D 0,02-0,06×10⁻⁹ М, а химерный клон 11F11 продемонстрировал K_D 0,02×10⁻⁹М. То есть гуманизированные клоны продемонстрировали высокую аффинность связывания с агрегатами.

Пример 9. Оценка специфичного связывания химерного антитела с альфа-синуклеином.

9-1. ELISA-анализ с бета-синуклеином и гамма-синуклеином.

После получения трех химерных антител 3A9, 9B11 и 11F11 по примеру 2 проводили сравнение специфичности связывания этих антител с альфа-синуклеином по результатам ELISA-анализа с бета-синуклеином и гамма-синуклеином, которые являются гомологами альфа-синуклеина.

Для проведения оценки каждый белок из человеческого бета-синуклеина (Uniprot: Q16143) (CUSABIO, номер по каталогу CSB-EP624090HU) и человеческого гамма-синуклеина (Uniprot: 076070) (CUSABIO, номер по каталогу CSB-EP021915HU) сорбировали на 96-луночный планшет в концентрации 100 нг/мл, проводили промывку и последующую блокировку 5% BSA на протяжении 2 часов. В данном случае в качестве положительного контроля использовали антитело ко всем типам синуклеина (rap-syn) (Santa Cruz, номер по каталогу FL-140, sc-10717, кроличье), связывающееся с альфа-синуклеином, бета-синуклеином и гамма-синуклеином. После промывки химерные антитела (3A9, 9B11, 11F11) разводили 1/10 до концентраций от 400 нМ до 0,04 нМ и вносили на 2 часа, проводили промывку с использованием PBS и затем вносили козы антитела против hFc, связанные с HRP, в качестве антител для выявления. Затем измеряли оптическую плотность при 450 нм и 650 нм после взаимодействия с ТМВ в качестве субстрата. Для положительного контроля в качестве антитела для выявления использовали козы противокроличье антитело, связанное с HRP.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 9а и 9б, где представлены результаты ELISA-анализа, демонстрирующие, что химерные антитела (3A9, 9B11, 11F11) имеют очень низкую аффинность связывания с человеческим бета-синуклеином и человеческим гамма-синуклеином. В отличие от них, антитело rap-syn, использованное в качестве положительного контроля, продемонстрировало высокую аффинность связывания с бета-синуклеином и гамма-синуклеином. Фиг. 9а относится к человеческому бета-синуклеину, а фиг. 9б относится к человеческому гамма-синуклеину.

9-2. Дот-блоттинг-анализ с агрегатами бета-амилоида и белка тау.

Три типа химерных антител 3A9, 9B11 и 11F11, полученных в примере 2, подвергали взаимодействию с агрегатами амилоида бета₁₋₄₂ (Uniprot: P05067; CAS-номер: 107761-42-2) и белка тау (Uniprot: P10636-8). Способность антител к специфичному связыванию с агрегатами альфа-синуклеина анализировали блоттингом по следующей причине.

Амилоид бета₁₋₄₂ и белок тау образуют агрегаты, которые, как полагают, являются важными этио-

логическими факторами нейродегенеративных заболеваний, особенно болезни Альцгеймера, и эти агрегаты имеют олигомеры, протофибриллы и фибриллы, аналогично агрегатам альфа-синуклеина. Таким образом, дот-блоттинг позволил подтвердить, что химерные антитела 3A9, 9B11 и 11F11 распознают специфическую последовательность альфа-синуклеина и не распознают общую структуру агрегатов, имеющих происхождение от альфа-синуклеина, амилоида бета и белка тау.

В данном примере метод дот-блоттинга применяли почти таким же образом, как в примере 4-3, и рекомбинантный амилоид бета₁₋₄₂, белок тау и их агрегаты были получены профессором Seung-jae Lee из Национального университета Сеула (Seoul National University). Syn-1, 6E10 и Tau5 представляют собой известные антитела, связывающиеся с альфа-синуклеином, амилоидом бета₁₋₄₂ и белком тау, соответственно. Результаты анализа показаны на фиг. 10.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 10 и демонстрируют, что химерные антитела 3A9, 9B11 и 11F11 по настоящему изобретению специфично связываются только с агрегатами, имеющими происхождение от альфа-синуклеина, но не с агрегатами, имеющими происхождение от амилоида бета₁₋₄₂ и белка тау. В отличие от них, антитела 6E10 и Tau5, которые, как известно, связываются с амилоидом бета₁₋₄₂ и белком тау, соответственно, продемонстрировали связывание с соответствующими агрегатами при дот-блоттинге.

Согласно описанным выше результатам, химерные антитела не связываются с гомологами альфа-синуклеина и агрегатами, имеющими происхождение от других белков, но эффективно связываются только с белком-мишенью. Это позволяет предполагать, что они могут быть эффективнее антител или лекарственных средств, связывающихся с гомологами и агрегатами, имеющими происхождение от других белков.

Пример 10. Получение биспецифичных антител.

10-1. Клонирование бивалентного биспецифичного антитела.

Для конструирования вектора экспрессии бивалентного биспецифичного антитела нуклеотидную последовательность антитела, содержащую сигнальную последовательность, вводили в множественный сайт клонирования (MCS) вектора pCDNA3.4 (Invitrogen). Вектор экспрессии биспецифичного антитела представлял собой моноцистронный вектор, и, соответственно, были получены вектор экспрессии тяжелой цепи и вектор экспрессии легкой цепи.

В качестве последовательности тяжелой цепи, вводимой в вектор экспрессии тяжелой цепи, scFv против IGF1R был связан через линкер с С-концом иммуноглобулина, где были связаны переменная область тяжелой цепи, кодирующая антитело против альфа-синуклеина, и человеческая константная область тяжелой цепи. В качестве последовательности легкой цепи, вводимой в вектор экспрессии легкой цепи, были связаны переменная область легкой цепи, кодирующая антитело против альфа-синуклеина, и человеческая константная область легкой цепи.

10-2. Клонирование моновалентного биспецифичного антитела.

Моновалентное биспецифичное антитело представляло собой гетеродимер, содержащий тяжелую цепь ("впадина") иммуноглобулина против альфа-синуклеина, с С-концом которой был связан scFv против IGF1R, и тяжелую цепь ("выступ") иммуноглобулина против альфа-синуклеина без связанного scFv, и легкую цепь, конъюгированную с указанным гетеродимером.

Для повышения эффективности конъюгации гетеродимера тяжелых цепей применяли методику "выступ во впадину" (Knob-in-Hole). То есть в СН3-части кодирующей последовательности тяжелой цепи типа "впадина" проводили замены T366S, L368A и Y406V, а в СН3-части кодирующей последовательности тяжелой цепи типа "выступ" проводили аминокислотную замену T366W.

10-3. Транзиторная трансфекция.

Полученный вектор использовали в Maxi-Prep (Qiagen) с получением большого количества плазмидной ДНК. Затем ее вводили в клетки следующим образом. Для получения моновалентного BsAb, ДНК вектора экспрессии тяжелой цепи и ДНК вектора экспрессии легкой цепи использовали для трансфекции в отношении 1:1. Для получения моновалентного BsAb ДНК вектора экспрессии тяжелой цепи типа "впадина", ДНК вектора экспрессии тяжелой цепи типа "выступ" и ДНК вектора экспрессии легкой цепи использовали для трансфекции в отношении 0,5:0,5:1.

В день, предшествующий трансфекции, концентрацию клеток ExpiCHO™ (Gibco, номер по каталогу A29127) в экспрессионной среде ExpiCHO™ (Gibco, номер по каталогу A29100-01) корректировали до $3-4 \times 10^6$ жизнеспособных клеток на 1 мл и затем проводили инкубацию при 8% CO₂, 37°C и 120 об/мин на протяжении 1 суток. В день трансфекции ДНК проводили разведение клеток, выращенных до $7-10 \times 10^6$ жизнеспособных клеток на 1 мл, с показателями выживаемости 95% или более свежей средой до 6×10^6 жизнеспособных клеток на 1 мл.

Для трансфекции исходных клеток подготавливали комплекс ExpiFectamine™ CHO и плазмидной ДНК с использованием набора для трансфекции ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit (Gibco, номер по каталогу A29129). ДНК и реагенты ExpiFectamine™ CHO подготавливали в подходящих концентрациях, вносили в старую среду OptiPRO™ SFM® (Gibco, номер по каталогу 12309019) и перемешивали, оставляя при комнатной температуре на 5 минут. Полученный продукт добавляли к исходным клеткам и на-

чинали их посттрансфекционное культивирование. На следующий день после трансфекции к трансфицируемым клеткам добавляли реагенты Enhancer и Feed, входящие в состав набора ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit, через 5 суток еще раз добавляли реагент Feed и проводили инкубацию на протяжении 10 суток при 8% CO₂, 37°C и 120 об/мин с получением трансфицированных клеток.

10-4. Сбор среды.

Для получения культурального раствора по завершении продуцирования культуральную среду переносили в центрифужную бутылку для центрифугирования и центрифугировали при 4°C и 6500 об/мин на протяжении 30 минут с последующей фильтрацией через фильтр размером 0,2 мкм, получая культуральную среду без взвешенных твердых частиц. Затем полученную культуральную среду использовали для последующей очистки.

Пример 11. Получение антитела к IGF1R (scFv).

11-1. Получение антитела к IGF1R (scFv).

Моноклональные антитела получали с применением методики фагового дисплея/пэннинга. Конкретно, антигены, использованные в пэннинге с фаговым дисплеем и других анализах, использовали в виде следующих белков. Пептид, состоящий из остатков 31-932 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:99, где из внеклеточного домена человеческого IGF1R была удалена сигнальная последовательность, метили гистидином на С-конце и использовали для данного примера (R&D Systems, США, 391-GR). IGF1R обезьяны (Национальный научно-исследовательский совет Канады), мышинный IGF1R (R&D Systems, 6630-GR/CF) и крысиный IGF1R (Национальный научно-исследовательский совет Канады) с His-меткой на С-конце использовали в качестве антигена для анализа межвидовой перекрестной реактивности.

1×10^{10} клеток полученной библиотеки scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент), обладавших разнообразием и имевших происхождение от человека (получены SHIM Hyunbo в Женском университете Ихва), вносили в 2X среду YT (17 г триптона (CONDA, 1612.00), 10 г дрожжевого экстракта (CONDA, 1702.00) и 5 г NaCl (Sigma, S7653)), содержащую 34 мкг/мл хлорамфеникола (Sigma, C0857), 2% глюкозы (Sigma, G5400) и 5 mM MgCl₂ (Sigma, C0857), при 30°C на 3 часа до OD600 0,5-0,7. Затем клетки инфицировали фагом-помощником и культивировали в 2X среде YT, содержащей 34 мкг/мл хлорамфеникола, 5 mM MgCl₂, 70 мкг/мл канамицина (Sigma, K1876) и 1 mM IPTG (ELPISBIO, IPTG025), при 30°C на протяжении 16 часов для индукции упаковки фагов. Затем культуральный раствор центрифугировали при 4500 об/мин и 4°C на протяжении 15 минут. В супернатант добавляли 4% ПЭГ 6000 (Fluka, 81253) и 3% NaCl (Sigma, S7653) и проводили инкубацию на протяжении 1 часа на льду. Полученный продукт центрифугировали при 8000 об/мин на протяжении 20 минут при 4°C, затем осадок суспендировали в PBS и центрифугировали снова при 4°C и 12000 об/мин на протяжении 10 минут с получением супернатанта, содержащего фаговую библиотеку. Полученный супернатант хранили при 4°C до последующего использования.

11-2. Пэннинг с фаговым дисплеем.

Для скрининга человеческого антитела к IGF1R проводили три раунда пэннинга, как описано ниже. Фаговая библиотека представляла собой синтетическую библиотеку человеческих scFv, а процедура пэннинга с фаговым дисплеем и полученные результаты показаны в табл. 19.

Таблица 19

Стадия	Пэннинг		
	1-й раунд	2-й раунд	3-й раунд
Антиген	ECD IGF1R (биотинилированный)	ECD IGF1R (биотинилированный)	Клетки MCF-7
Метод сорбции	Непрямая иммобилизация	Непрямая иммобилизация	–
Исходное количество	$7,0 \times 10^{12}$	$6,0 \times 10^{12}$	$5,0 \times 10^{12}$
Выход	IGF1R или MCF-7 $4,9 \times 10^8$	$3,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
Промывка	PBS-T**	5 раз	10 раз
	PBS	2 раза	2 раз

Конкретно, 1 мл рекомбинантного человеческого белка IGF1R в концентрации 5 мкг/мл (R&D Systems, США, 391-GR, или Sino Biological Life Technologies, США, 10164-H08H-50R) вносили в иммунологическую пробирку (Maxisorp 444202) и сорбировали на поверхность иммунологической пробирки при 4°C на протяжении 16 часов. Затем супернатант удаляли и проводили инкубацию с добавлением PBS, содержащего 3% BSA, при 37°C на протяжении 1 часа для блокировки неспецифического связывания

посредством связывания BSA с поверхностью, не связанной с IGF1R. После удаления супернатанта фаговую библиотеку, полученную в Примере 11-1, смешанную с 1,5% раствором BSA, помещали в иммунологическую пробирку и проводили взаимодействие при 37°C на протяжении 1 часа, позволяя IGF1R-специфичным фагам связаться с антигеном. Затем полученный продукт промывали раствором PBS-T (забуференный фосфатом физиологический раствор с 0,05% Tween 20) для удаления фагов, связанных неспецифично, и фаги, связанные с IGF1R, собирали с использованием 100 мМ раствора триэтиламина.

Собранные фаги нейтрализовали буферным раствором с 1 М трис (pH 7,4), трансфицировали *E. coli* K12ER2738 при 37°C на протяжении 1 часа и инфицированные *E. coli* распределяли по агаровой среде LB, содержащей тетрациклин и карбенициллин, и культивировали при 37°C в течение ночи. На следующий день культивированные *E. coli* суспендировали в 5 мл среды SB (superbroth), содержащей тетрациклин и карбенициллин, и добавляли равный объем 50% глицерина. Одну часть хранили при -80°C, а 50 мкл продукта суспендировали в 40 мл среды SB (superbroth), содержащей тетрациклин и карбенициллин, добавляли 10^{12} БОЕ фага-помощника VCSM13 и проводили культивирование с перемешиванием при 37°C на протяжении 1 часа. Затем в культуральный раствор добавляли канамицин и проводили культивирование при 30°C на протяжении приблизительно 16 часов, культивируя только *E. coli*, инфицированные фагом-помощником.

На следующий день, после центрифугирования культурального раствора, отбирали супернатант и вносили его в буфер, содержащий 4% ПЭГ 8000 и 3% хлорида натрия (NaCl), проводили взаимодействие при 4°C на протяжении приблизительно 1 часа, фаги осаждали и проводили центрифугирование. После удаления супернатанта пул осажденных фагов ресуспендировали в PBS-буфере, содержащем 1% BSA, и использовали для следующего раунда пэннинга. Во время более поздних раундов пэннинга число промывок с использованием PBS-T увеличивали для увеличения количества и концентрации антигенспецифичных фагов.

11-3. Скрининг отдельных клонов.

Проводили отбор клеточных клонов, демонстрировавших аффинность связывания с ECD (внеклеточный домен) человеческого IGF1R и MCF-7, экспрессирующими IGF1R.

Конкретно, для отбора моноклональных антител, специфично связывающихся с IGF1R, из пула фагов, полученного в примере 11-2, проводили следующий эксперимент.

Для выделения моноклонов из концентрированного пула, пул фагов, полученных на агаровой среде LB с тетрациклином/карбенициллином, высевали на среду и культивировали, получая отдельные колонии. После посева этих колоний в глубокий 96-луночный планшет и инкубации в течение ночи 10 мкл полученного культурального раствора еще раз вносили в глубокий 96-луночный планшет и инкубировали таким же образом при 37°C на протяжении приблизительно 4 часов до получения подходящей OD (от 0,5 до 0,7). После добавления 20 МОИ фага-помощника в культуральный раствор полученную смесь подвергали взаимодействию при 37°C на протяжении 1 часа. Затем в культуральную среду добавляли канамицин и проводили культивирование в течение ночи при 30°C. На следующий день культуральную среду центрифугировали и отбирали супернатант для проведения ELISA для отбора IGF1R-специфичных фагов (Steinberger, Rader and Barbas III. 2000. Phage display vectors. In: Phage Display Laboratory Manual. 1sted. Cold Spring Harbor Laboratory Press NY, USA. Pp.11.9-11.12).

По 100 нг рекомбинантного IGF1R вносили в каждую лунку планшета для ELISA и проводили взаимодействие при 4°C на протяжении приблизительно 15 часов для сорбции антигена на планшет. Для предотвращения неспецифического связывания в каждую лунку вносили по 200 мкл PBS-буфера, содержащего 3% BSA, и проводили взаимодействие при 37°C на протяжении приблизительно 1 часа. Супернатант удаляли.

В каждую лунку вносили по 100 мкл раствора, содержащего полученный моноклональный фаг, проводили взаимодействие при 37°C на протяжении 1 часа и 3-кратную промывку с использованием 300 мкл PBS-T. Для выявления фага, связанного с антигеном IGF1R, антитело против HA с HRP разводили 1:5000 в PBS-буфере, содержащем 3% BSA, и проводили взаимодействие при 37°C на протяжении 1 часа. После 3-кратной промывки с использованием 300 мкл PBS-T вносили 100 мкл ТМБ (тетраметилбензидин, Sigma, T0440) для окрашивания, а для остановки реакции вносили 50 мкл 1 N H₂SO₄. Измеряя оптическую плотность при 450 нм, отбирали клоны с высокой оптической плотностью по сравнению с контрольной группой BSA как клоны антигенспецифичных антител.

При двукратном скрининге были отобраны семь (7) видов клонов: 1564, 48G5, 49G11, 54H4, 60A11, 60H6 и B11.

Пример 12. Получение аффинного варианта антитела к IGF1R.

Антитела оптимизировали, варьируя аффинность отобранных клонов, посредством оценки их способности к связыванию с лигандом и проникновению через ГЭБ. В первом эксперименте получали ручную смесь NNS-праймеров для рандомизации CDR2 тяжелой цепи и CDR3 легкой цепи на основе scFv 1564 и ген scFv 1564, содержащий рандомизационную последовательность, амплифицировали с применением методики ПЦР. Амплифицированные генные продукты вводили в вектор pComb3x с получением библиотеки в форме, подходящей для фагового дисплея, и при пэннинге с использованием этой библио-

теки и ELISA-скрининге удалось отобрать несколько клонов scFv, которые связывались с IGF1R. У отобранных клонов определяли аминокислотную последовательность варибельной области посредством секвенирования генов.

Во втором эксперименте конструировали две минибиблиотеки тяжелой и легкой цепи с введением обратной мутации эмбрионального типа в CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно. По результатам анализа 96 колоний было подтверждено, что 31 клон VL и 39 клонов VH имели уникальные последовательности. В итоге, при отборе аффинных вариантов на основе продуктивности и аффинности связывания клонов с антигеном были получены клоны.

Пример 13. Получение вариантов антител, имеющих остаток, подверженный дезамидированию.

13-1. Определение остатка, подверженного дезамидированию.

При дезамидировании в области CDR происходит деградация антитела и ослабление его связывания с антигеном, что может приводить к снижению эффективности и к неоднородности образцов. Неоднородность образцов приводит к сложностям при его идентификации в клинических исследованиях. Поэтому была предпринята попытка определить положение, по которым происходит дезамидирование, с применением компьютерного анализа и пептидного картирования.

Как показано на фиг. 8а, при компьютерном анализе и пептидном картировании был установлен факт дезамидирования исходного клона 1564. Для этого образцы хранили при 4°C или 40°C на протяжении одной недели до анализа, и было подтверждено, что дезамидирование происходит в L-CDR2, L-CDR3 и H-CDR2. Для подтверждения мест дезамидирования были также проанализированы аффинные варианты, раскрытые в примере 12.

13-2. Получение вариантов антител.

При компьютерном анализе исходный клон 1564 имел результирующий заряд -0,7. Обычно при результирующем заряде менее 0 или более 5,5 антитело подвержено быстрому клиренсу в организме. Поэтому предполагается, что замена остатков, подверженных дезамидированию, на положительные заряды, такие как H, R, K и так далее, позволит предотвратить быстрый клиренс благодаря устранению дезамидирования и увеличению общего заряда. Таким образом, были получены мутанты с заменами сайтов дезамидирования, как показано на фиг. 18b.

Для удаления остатка, подверженного дезамидированию, получали мутант, имеющий замену по этому остатку, следующим образом.

1) В аминокислотной последовательности Asn заменяли на D или Q, сходные с Asn. При отсутствии изменений аффинности связывания мутанта все остатки заменяли на Q.

2) Поскольку результирующий заряд исходного клона составлял -0,7, а результирующий заряд, приводящий к быстрому клиренсу, составляет менее 0 или более 5,5, предпочтительно, чтобы заряд стал положительным. Поэтому N95а, остаток L-CDR3, подверженный дезамидированию, заменяли на H, R и K, имеющие положительный заряд.

Пример 14. Получение различных форм антител против IGF1R.

14-1. Получение минитела против IGF1R.

Минитело получали соединением полноразмерного scFv IGF1R-специфичного моноклонального фагового антитела, полученного в примерах 11-13, с С-концом Fc. Для этого получали нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность scFv, как раскрыто в настоящем изобретении, и полученную нуклеотидную последовательность расщепляли рестриктазой и клонировали в вектор экспрессии на основе pcDNA, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую Fc.

14-2. Получение бивалентного антитела против IGF1R.

Получали полноразмерный scFv IGF1R-специфичного моноклонального фагового антитела, полученного в примерах 11-13, и два полноразмерных scFv связывали с каждым С-концом терапевтического антитела в форме IgG с получением бивалентного антитела. Для этого получали нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность scFv, как раскрыто в настоящем изобретении, расщепленную рестриктазой, и клонировали ее в вектор экспрессии на основе pcDNA, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтическое антитело.

14-3. Получение IgG-антитела (Full-IgG) против IGF1R.

Для преобразования последовательностей антитела 1564 и антитела F06 в форму полноразмерных IgG1 (Full IgG) IGF1R-специфичных моноклональных фаговых антител, полученных в примерах 11 и 12, синтезировали нуклеотидные последовательности областей тяжелой цепи и легкой цепи (Genotec Inc.). Синтезированные гены тяжелой цепи и легкой цепи клонировали в векторы экспрессии.

14-4. Получение моновалентного антитела с scFv против IGF1R.

В примере 14-1 представлена форма минитела, где scFv-форма антитела против IGF1R связана с каждым С-концом двух Fc тяжелой цепи. В данном примере один scFv связан с С-концом только одного Fc тяжелой цепи. В форме антитела, полученной в примерах 11-13, конструировали вектор, где IGF1R-специфичные моноклональные фаговые антитела 1564, F06, C04, VH5, VH16, VH35, VH9, VH2, VH7 и VH32 были связаны с С-концом только одного Fc, и вектор без антитела против IGF1R, связанного с С-концом. При получении антител в клетках в Fc-области вводили мутации типа "выступ во впадину" для получения гетеродимерной формы. При трансфекции в клетки CHO-S для получения антитела все три

вектора, в том числе вектор, соответствующий тяжелой цепи, в которой антитело против IGF1R связано с C-концом Fc терапевтического антитела, вектор, соответствующий тяжелой цепи, в которой антитело против IGF1R не связано с C-концом Fc терапевтического антитела, и вектор, соответствующий легкой цепи терапевтического антитела, были инъецированы в клетки CHO-S.

14-5. Экспрессия и очистка различных антител против IGF1R.

Векторы, полученные в примерах 14-1, 14-2 14-3 и 14-4, вводили в клетки следующим образом.

Конкретно, концентрацию клеток CHO-S доводили до $1,5 \times 10^6$ клеток/мл в среде CD-CHO (Gibco, 10743) и затем проводили культивирование при 8% CO₂ и 37°C на протяжении 1 суток. В день трансфекции ДНК проводили подготовку клеток, выращенных до $2,5-3 \times 10^6$ клеток/мл, в концентрации $2,1 \times 10^6$ клеток/мл с использованием среды CD-CHO, содержавшей 1% DMSO, и затем культивировали их в условиях 8% CO₂ и 37°C на протяжении 3 часов. После центрифугирования при 3000 об/мин на протяжении 15 минут супернатант удаляли и проводили ресуспендирование в среде RPMI 1640 с 2,5% FBS.

Затем комбинацию векторов разводили в среде Opti-MEM до концентрации 1 мкг на 1 мл среды и PEI (Polysciences, 23966, исходная концентрация 1 мг/мл) разводили до 8 мкг/мл культуральной среды. После смешивания ДНК со смесями PEI и оставления полученной смеси при комнатной температуре на 10 мин эту смесь выливали во флакон, содержащий клетки, и проводили инкубацию на протяжении 4 часов при 5% CO₂, 37°C, 100 об/мин. Затем смесь культивировали с добавлением среды CD-CHO в объеме, равном объему культуры, и инкубировали при 8% CO₂, 37°C, 110 об/мин на протяжении 4 суток.

Полученный культуральный раствор пропускали через MabSelect SuRe (GE healthcare, 5 мл), уравнивая пропусканием уравнивающего буфера (50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 100 мМ NaCl), позволяя экспрессированному антителу связаться с колонкой. Затем, после элюирования раствором 50 мМ цитрата натрия (pH 3,4) и 100 мМ NaCl проводили нейтрализацию с использованием 1М трис-HCl (pH 9,0) таким образом, что конечный pH составлял 7,2. После этого проводили замену буферного раствора с использованием PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор, pH 7,4) и, когда степень чистоты была высокой, полученный раствор хранили при -20°C, а при необходимости дополнительной очистки хранили его при 4°C до последующей очистки.

Когда была необходима дополнительная очистка, ее проводили с использованием HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare, номер по каталогу 28-9893-36) с возможностью применения различных вариантов эксклюзионной хроматографии. После уравнивания уравнивающим буфером (1х забуференный фосфатом физиологический раствор, pH 7,4, Gibco, номер по каталогу 10010-023) образец, прошедший первичную очистку, загружали на колонку. Полученный образец, прошедший полную очистку, хранили в замороженном состоянии при -20°C.

14-6. Получение биспецифического антитела с антителом против альфа-синуклеина.

Антитело против IGF1R в форме scFv по настоящему изобретению получали связыванием вариативной области тяжелой цепи и вариативной области легкой цепи с использованием линкера (SEQ ID NO:411) и соединяли его с C-концом константной области тяжелой цепи полноразмерной IgG-формы антитела против альфа-синуклеина, описанного в следующей таблице, с использованием линкера (SEQ ID NO:412), получая биспецифическое антитело. В данном примере моновалентное антитело получали связыванием одной молекулы scFv-формы антитела против IGF1R на молекулу IgG-антитела против альфа-синуклеина, а бивалентное антитело получали связыванием двух молекул scFv-формы антитела против IGF1R на молекулу IgG-антитела против альфа-синуклеина, соответственно. Последовательности антитела против альфа-синуклеина, использованных для получения биспецифического антитела в данном примере, и примеры биспецифических антител, полученных в соответствии с настоящим изобретением, описаны в табл. 17. Биспецифические антитела, примеры которых приведены в табл. 17, были использованы для экспериментов в последующих примерах.

Пример 15. Анализ IGF1R-специфичной аффинности связывания с использованием антитела против IGF1R.

15-1. Анализ IGF1R-специфичной аффинности связывания с использованием антитела против IGF1R в форме минитела (ELISA).

Проводили ELISA-анализ для оценки аффинности связывания и зависимость от концентрации связывания клонов 996, 1226, 1564 и МКJP2 в форме минител, полученных в примере 14-1, с рекомбинантным IGF1R.

Конкретно, человеческий рекомбинантный IGF1R, являющийся мишенью, с которой связывается антитело, представляет собой внеклеточный домен (ECD) и был приобретен у R&D Systems (6630-GR/CF). Человеческий IGF1R разводили до 1 мкг/мл в PBS-буфере, вносили в 96-луночный планшет для ELISA (Nunc-Immuno Plates, NUNC, Рочестер, штат Нью-Йорк) в количестве 100 мкл на лунку, сорбировали, проводя взаимодействие при 4°C на протяжении 16 часов, и затем удаляли супернатант.

Добавляли PBS-буфер, содержащий 3%BSA (бычий сывороточный альбумин), 200 мкл на лунку, и проводили взаимодействие на протяжении 2 часов для блокировки неспецифического связывания.

Проводили 3-кратное разведение минител клонов 996, 1226, 1564 и МКJP2, полученных в примере 14-1, начиная с максимальной концентрации 20 нМ, с получением 12 точек, затем переносили по 100 мкл

в каждую лунку и оставляли при комнатной температуре на 1 час. После этого планшет промывали 4 раза PBS-буфером, содержащим 0,05% Tween 20, и проводили взаимодействие при комнатной температуре на протяжении часа, добавляя в каждую лунку по 100 мкл противочеловеческого антитела с HRP, распознававшего человеческий Fc минитела, в разведении 1:5000 в блокирующем буфере. После 4-кратной промывки с использованием 300 мкл PBS-T (Tween 20, 0,05%) проводили окрашивание с использованием ТМВ (тетраметилбензидин, Sigma, T0440). Ферментативную реакцию гасили серной кислотой, 0,5 моль/л, и оптическую плотность определяли и анализировали при 450 нм с использованием устройства для прочтения микропланшетов. Результаты эксперимента показаны на фиг. 1а.

Было подтверждено, что четыре клон минител связывались с человеческим рекомбинантным белком IGF1R зависимым от концентрации образом, и, конкретно, МКJP2 продемонстрировал наиболее высокую связывающую способность, и, после него, клоны 996 и 1564 продемонстрировали сходную силу связывания, а клон 1226 продемонстрировал несколько меньшую силу связывания.

15-2. ELISA-анализ межвидовой перекрестной реактивности антител к IGF1R.

Активность антитела 1564 против IGF1R, полученного методом, описанным в Примере 14-2, и антител против IGF1R, полученных в примере 11-3, по межвидовому перекрестному связыванию анализировали посредством ELISA-анализа. С этой целью сначала разводили антигены IGF1R человека, обезьяны, мыши и крысы до 1 мкг/мл, вносили по 100 мкл в каждую лунку и проводили взаимодействие при 4°C на протяжении 15 часов для их сорбции на дно планшета. После удаления супернатанта в каждую лунку вносили по 200 мкл PBS-буфера, содержавшего 3%BSA, для блокировки неспецифического связывания. Проводили 5-кратное разведение антител против IGF1R в PBSB (BSA, 3% в PBS) от максимальной концентрации 400 нМ, вносили их в каждую лунку и проводили взаимодействие при 37°C на протяжении 1 часа. Затем, после 5-кратной промывки PBS-буфером, антитело против человеческого Fab с HRP, распознающее Fab-часть связанного антитела, разводили 1:20000, вносили по 100 мкл в каждую лунку и проводили взаимодействие при 37°C на протяжении 1 часа. Полученный продукт промывали 5 раз PBS-буфером и проводили окрашивание с использованием ТМВ (тетраметилбензидин, Sigma, T0440), следуя методу изготовителя. Ферментативную реакцию гасили серной кислотой, 0,5 моль/л, и оптическую плотность измеряли при 450 нм с использованием устройства для прочтения микропланшетов (Molecular Devices). При включении в ELISA-анализ большого количества образцов использовали два планшета. Результаты эксперимента показаны в табл. 12 ниже.

Конкретно, в табл. 12 результатов ELISA биспецифичных антител к человеческому IGF1R результаты ELISA IgG 1564 и биспецифичных антител с человеческим IGF1R, мышинным IGF1R, крысиным IGF1R и IGF1R обезьяны показаны в табл. 12.

Результаты эксперимента, изложенные ниже, демонстрируют преимущество оценки эффективности с применением моделей у различных видов животных и показывают, что эффективность терапевтических агентов в моделях заболеваний у различных видов можно оценивать с использованием антител по настоящему изобретению.

Таблица 20

Результаты ELISA-анализа способности антител к связыванию с IGF1R различных видов

Эксперимент	Клон антитела	EC ₅₀ (нМ)
ELISA с человеческим IGF1R	ch11F11-1564	0,914
	ch11F11-48G5	1,21
	ch11F11-54H4	2,88
	ch11F11-60H6	10
	ch11F11-B11	7,13
ELISA с человеческим IGF1R	1564 IgG	0,0823
	ch11F11-1564	0,379
ELISA с мышинным IGF1R	ch11F11	N/A *
	ch11F11-1564	3,02

	ch11F11	N/A *
	ch11F11-48G5	6,2
	ch11F11-54H4	N/A
	ch11F11-60H6	18,6
	ch11F11-B11	148
ELISA с крысиным IGF1R	ch11F11	N/A *
	ch11F11-1564	1,05
	ch11F11-48G5	2,44
	ch11F11-54H4	14,2
	ch11F11-201**	N/A *
	ch11F11-1564	0,874
	ch11F11-60H6	38
ELISA с IGF1R обезьяны	ch11F11	N/A *
	ch11F11-1564	2,48
	ch11F11-48G5	6,69
	ch11F11-54H4	8,83
	ch11F11-201**	N/A *
	ch11F11-1564	2,21
	ch11F11-60H6	N/A
	ch11F11-B11	180

* Недоступно,

** scFv-форма биоаналога герцептина.

15-3. Анализ аффинности связывания аффинных вариантов с IGF1R (FACS).

Аффинность связывания аффинных вариантов, полученных в примере 12, оценивали посредством ELISA с ECD IGF1R, а аффинность связывания с MCF-7 анализировали посредством FACS.

В качестве анализа первичных клонов в табл. 21 показаны результаты ELISA-анализа соответствующих первично отобранных клонов в форме биспецифичных антител с ECD IGF1R, а в табл. 22 показаны результаты анализа аффинности связывания с клеточной линией MCF-7 посредством FACS.

Таблица 21

Результаты ELISA связывания первично отобранных клонов в форме биспецифичных антител с ECD IGF1R

Клон антитела	EC ₅₀ (нМ)
ch11F11-1564	0,442
ch11F11-A06	1,19
ch11F11-A07	1,2
ch11F11-B02	0,919
ch11F11-B09	1,08
ch11F11-1564	0,49
ch11F11-D03	0,666
ch11F11-E06	0,668
ch11F11-F06	0,467
ch11F11-H04(G)	0,67
Hu3A9-1564	0,144
Hu3A9-A02	0,13
Hu3A9-A07	0,125
Hu3A9-B10	0,156
Hu3A9-B01	0,145
Hu3A9-C04	0,107
Hu3A9-E09	0,159

Таблица 22

Результаты FACS-анализа связывания с клеточной линией MCF-7

Образцы	Среднее геометрическое
Только 2-е антитело	2,92
Исходное 1564	4,09
F06	5,02
A07	5,06
B02	4,54
B09	4,29
D03	4,09
E06	4,24
F06	6,33
C04	3,88

В результате, клон F06 был отобран как клон, обладающий наиболее высокой связывающей способностью при связывании с клетками по сравнению с исходным клоном (клон 1564) (созревание аффинности), а клон C04 был отобран как клон с наименее высокой связывающей способностью при связывании с клетками по сравнению с исходным клоном 1564 (снижение аффинности).

В качестве анализа вторичных клонов в табл. 23 показаны результаты ELISA связывания клонов, полученных вторично, в форме биспецифичных антител с ECD IGF1R.

Таблица 23

Результаты ELISA вторично отобранных клонов с ECD IGF1R

Клон антитела	EC ₅₀ (нМ)
Hu11F11(ver.2)-1564	0,259
Моновалентное ch11F11-1564	0,347
Hu11F11(ver.2)-C04	0,15
Hu11F11(ver.2)-F06	0,147
Hu11F11(ver.2)-1564	0,864
ch11F11-F06	0,857
Hu11F11(ver.2)-VH2	135
Hu11F11(ver.2)-VH5	0,366
Hu11F11(ver.2)-1564	0,157
Hu11F11(ver.2)-VH7	402
Hu11F11(ver.2)-VH9	6,06
Hu11F11(ver.2)-VH16	0,236
Hu11F11(ver.2)-1564	0,149
Hu11F11(ver.2)-VH32	121
Hu11F11(ver.2)-VH35	0,167
Hu11F11(ver.2)-VH27	N/A*

Клоны для анализа посредством FACS были отобраны, как показано в табл. 24, после того как из вторично полученных клонов были исключены клоны с существенно сниженной продуктивностью и ухудшенными физическими свойствами.

Таблица 24

Клоны для анализа с применением FACS-анализа

Категория связывания	аффинности	Клон антитела	Пояснение
Аффинность сходна с клоном 1564	связывания с исходным	C04	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		F06	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		VH5	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		VH16	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		VH35	FACS и анализ <i>in vivo</i>
Аффинность снижена в 50 раз	связывания	VH9	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		C12	Нежелательные физические свойства
Аффинность снижена в 50 раз или более	связывания	VH2	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		VH6	Нежелательные физические свойства
		VH7	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		VH27	Нежелательные физические свойства
		VH32	FACS и анализ <i>in vivo</i>

На фиг. 12с представлены результаты анализа связывания клонов с клеточной линией MCF-7 с применением FACS, и все проанализированные клоны обладали меньшей аффинностью связывания с MCF-7, чем исходный клон 1564. Эти результаты показывают, что клоны, продемонстрировавшие сниженную связывающую способность при ELISA, также продемонстрировали сниженную связывающую способность при FACS.

Были отобраны клоны антител F06, C04, VH2, VH5, VH7, VH9, VH16 и VH32, и аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи этих антител показаны в табл. 5 и 6 выше.

15-4. ВІАcore-анализ с человеческим IGF1R.

Анализировали способность антитела по настоящему изобретению к связыванию с человеческим IGF1R.

Степень связывания IgG-формы клона 1564 с человеческим IGF1R анализировали посредством SPR-анализа. Антитело anti-his против His-метки, связанной с ECD человеческого IGF1R как антигена, разводили до 20 мкг/мл в ацетатном буфере, pH 4,0, и затем иммобилизовали в референсном/аналитическом канале чипа CM4 до 10000 RU как целевого числа RU методом аминного сочетания. Во время захвата в качестве рабочего буфера использовали PBS и поддерживали скорость потока 30 мкл/мин. Во время ассоциации/диссоциации скорость потока составляла 40 мкл/мин, а в качестве рабочего буфера использовали PBS. Время ассоциации/диссоциации составляло 5 минут и 20 минут, соответственно. Анализ проводили в следующем порядке: 1 измерение исходных значений, активация (EDC NHS), внесение человеческого IGF1R, гашение (1 М этаноламин), 2 измерение исходных значений, ассоциация и диссоциация. Полученные результаты оценивали с применением бивалентной модели и анализировали с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (версия 1.0, серийный номер 04Y15X11-0149).

По результатам анализа было подтверждено, что K_D IgG-антитела 1564 составляла $2,5305 \times 10^{-9}$ нМ, а K_D IgG-антитела F06 - $4,7802 \times 10^{-7}$ нМ, и все они продемонстрировали высокую способность к связыванию с человеческим IGF1R. Результаты анализа показаны на фиг. 11b. В частности, при получении клона 1564 в форме IgG он продемонстрировал константу диссоциации $2,5305 \times 10^{-9}$ нМ применительно к человеческому IGF1R и позволил подтвердить отсутствие значимого изменения аффинности связывания в зависимости от формы антител.

Пример 16. Анализ способности антитела против IGF1R к связыванию с клеточной линией, экспрессирующей человеческий IGF1R, и клетками эндотелия головного мозга.

16-1. FACS-анализ на MCF-7.

Для подтверждения того, что клоны 996, 1226 и 1564 в форме минител, полученные в примере 14-1, связываются с эндогенным IGF1R на поверхности клеток, проводили анализ аффинности связывания с клеточными линиями, экспрессирующими человеческий IGF1R, и клетками эндотелия головного мозга с применением FACS. Степень связывания с MCF-7, известной как клеточная линия рака молочной железы, сверхэкспрессирующая IGF1R, анализировали посредством FACS.

Конкретно, каждое из трех минител разводили до 20 мкг/мл, в каждый образец вносили по $0,43 \times 10^6$ клеток линии MCF-7 и проводили взаимодействие при 4°C на протяжении 1 часа. После двукратной промывки PBS-буфером вносили человеческое антитело с FITC, разведенное 1: 500, и проводили взаимодействие при 4°C на протяжении 1 часа. После двукратной промывки PBS-буфером степень связывания минител против IGF1R измеряли с использованием прибора FACS Calibur. В качестве контроля использовали клетки MCF-7, обработанные только вторичными антителами. Результаты эксперимента показаны на фиг. 12a.

Аффинность связывания A02, A06, A07, B01, B02, B09, B10, C04, D03, E06, F06, H04(Gly), H04(Val), VH2, VH5, VH7, VH9, VH16, VH32 и VH35, полученных в примере 12 и примере 14-2, с MCF-7 анализировали таким же образом, как описано выше. В качестве исходных клонов сравнения использовали клон 1564, полученный методом, примененным в примере 14-2, а в качестве контролей использовали клетки MCF-7, обработанные только вторичными антителами. Результаты анализа показаны в табл. 22 и на фиг. 12c.

Результаты описанного выше эксперимента выражали как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) образца, и три минитела scFv, аффинные варианты биспецифичных антител и исходный клон (клон 1564) специфично связывались с эндогенным IGF1R, экспрессированным на поверхности клеток. Эти результаты демонстрируют, что клоны, полученные в описанных выше примерах, могут быть использованы по своему целевому назначению посредством их связывания с IGF1R в форме, фактически присутствующей в организме.

16-2. FACS-анализ на JMT-1 и BT474.

Минитела клонов 996, 1226 и 1564, полученные в примере 14-1, анализировали почти таким же образом, за исключением того, что вместо клеточной линии MCF-7, использованной в примере 16-1, использовали клеточные линии рака молочной железы JMT-1 и BT474. Связывание с эндогенным IGF1R на поверхности клеток было подтверждено морфологически. Результаты эксперимента показаны на фиг. 12a.

Результаты описанного выше эксперимента выражали как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) соответствующего образца, и было подтверждено, что три проанализированных минитела scFv специфично связывались с эндогенным IGF1R на поверхности различных клеточных линий, экспрессирующих IGF1R.

16-3. FACS-анализ клеток эндотелия головного мозга мыши.

Анализировали возможное связывание клона 1564 в форме биспецифичного антитела, полученного методом, примененным в примере 14-2, и в форме IgG, полученного методом, примененным в примере

14-3, с клетками эндотелия головного мозга bEND.3. В этой связи в качестве отрицательных контролей использовали группу обработки только вторичным антителом и группу обработки только терапевтическим антителом в форме IgG (CH11F11). FACS-анализ проводили таким же образом, как в примерах 16-1 и 16-2. Результаты анализа показаны на фиг. 12b.

Все проанализированные клоны продемонстрировали связывание с bEND.3, за исключением отрицательных контролей. Эти результаты подтверждают, что различные формы клона 1564 специфично связываются с IGF1R, экспрессированным на поверхности клеток эндотелия головного мозга.

Пример 17. Анализ внутриклеточной интернализации антитела против IGF1R.

17-1. Анализ интернализации MCF-7 - 1564, 996, 1226, MKJP2 (минитела).

Данный пример проводили для проверки того, проходят ли клоны 996, 1226, 1564 и MKJP2 в форме минител, полученные в примере 14-1, внутриклеточную интернализацию клеточной линией, экспрессирующей IGF1R, и проходят ли эти антитела, проникнув в клетки, через путь RMT, не подвергаясь деградации. Для того чтобы антитело против IGF1R можно было использовать в качестве переносчика для повышения способности к проникновению через ГЭБ, оно должно проходить интернализацию клетками эндотелия головного мозга, составляющими ГЭБ.

Внутриклеточную интернализацию антител по настоящему изобретению анализировали с использованием клеточной линии MCF-7, экспрессирующей IGF1R. Конкретно, после высева 30000 клеток линии MCF-7 в 8-луночное предметное стекло клетки культивировали на протяжении 1 суток. В каждую лунку с культивированными клетками вносили минитела клонов 996, 1226, 1564 и MKJP2, полученные в примере 14-1, в концентрации 5 мкг/мл при 4°C на 2 часа, проводили трехкратную промывку холодной средой DMEM и вносили антитело против человеческого Fc, конъюгированное с Alexa488, при 4°C на 1 час.

Для оценки интернализации комплексов антител планшет переносили в CO₂-инкубатор и инкубировали при 37°C на протяжении 30 минут. Культуру фиксировали, добавляя 100% метанол, и одновременно останавливали реакцию. После фиксации планшет промывали 3 раза с использованием PBS. На флуоресцентном микроскопе степень интернализации антитела визуализировали в области зеленого фильтра (Alexa488). При визуализации ядра внутри клеток окрашивали с использованием DAPI для подтверждения расположения каждой лунки. Результаты эксперимента показаны на фиг. 13а.

По результатам эксперимента было показано, что все четыре антитела, проанализированные в данном эксперименте с использованием клеточной линии MCF-7, хорошо проходили интернализацию. В частности, было обнаружено, что клоны MKJP2 и 1564 были подвержены интернализации в большей степени, чем другие клоны.

17-2. Анализ интернализации MCF-7-C04, F06, VH5, VH16, VH35, VH9, VH2, VH7, VH32.

Связывание вариантов 1564, обладающих измененной способностью к связыванию с IGF1R, с IGF1R на поверхности клеток анализировали посредством FACS-анализа с использованием клеточной линии MCF-7, экспрессирующей IGF1R. 2×10^5 клеток MCF-7 обрабатывали биспецифичным антителом, полученным с использованием scFv-антитела против IGF1R, в концентрации 10 мкг/мл на протяжении 30 минут. После промывки PBS-буфером, содержащим 1%BSA, вносили вторичное антитело, связанное с FITC, для выявления человеческих антител на 1 час. После промывки PBS-буфером FACS-анализ позволил подтвердить внеклеточное связывание и интернализацию различных вариантов с измененной аффинностью связывания.

Как показано в табл. 25, было обнаружено, что биспецифичное антитело, содержащее антитело 1564 к IGF1R, при 37°C демонстрирует большую интернализацию и большую интенсивность, чем в условиях охлаждения. Эти результаты показывают, что варианты 1564 хорошо связываются с клетками и проходят интернализацию клетками зависимым от связывания образом.

Таблица 25

Образец	Среднее геометрическое
	Интернализация при 37°C
Без обработки	1,88
Только 2-е антитело	2,86
hu3A9 WT	3,4
hu3A9x1564 WT	7,72
hu11F11 WT	3,18
hu11F11x1564 WT	7,34
hu3A9x1564_C04	7,23

hu3A9x1564_F06	19,8
hu11F11x1564_VH5	6,1
hu11F11x1564_VH16	5,83
hu11F11x1564_VH35	7,28
hu11F11x1564_VH9	5,01
hu11F11x1564_VH2	3,19
hu11F11x1564_VH7	3,84
hu11F11x1564_VH32	3,24

17-3. Анализ интернализации клетками эндотелия головного мозга человека.

Проверяли, проходят ли бивалентная форма и моновалентная форма клона 1564, полученные в примерах 14-2 и 14-4, интернализацию первичными эндотелиальными клетками микрососудов головного мозга человека (НМБЕС). В качестве отрицательного контроля использовали терапевтическое антитело IgG (11F11).

НМБЕС (Cell Systems, номер по каталогу ACBRI376) высевали в 12-луночный планшет до 90% смыкания монослоя с последующим внесением анализируемого антитела. На следующий день после фиксации 4% параформальдегидом и промывки с использованием PBS проводили блокировку и пермеабиллизацию с использованием раствора, содержавшего 3% BSA и TritonX, на протяжении 50 минут. После промывки PBS антитело против человеческого Fc (козье противочеловеческое антитело) инкубировали на протяжении 2 часов и 30 минут, проводили промывку с использованием PBS и вносили вторичное антитело против соответствующего первичного антитела на 1 час. После промывки PBS клетки окрашивали красителем Hoechst на протяжении 10 минут в концентрации 1:1000 для окрашивания ядер. Результаты анализировали в условиях LSM 780 NLO EC Plan-Neofluar 100X /1.3 Oil на конфокальном микроскопе. Результаты эксперимента показаны на фиг. 13b.

Бивалентная форма и моновалентная форма клона 1564 продемонстрировали большую нейтрализацию, чем терапевтическое антитело отрицательного контроля (11F11). Эти результаты показывают, что антитело против IGF1R, описанное выше, может эффективно обеспечивать интернализацию терапевтического антитела клетками эндотелия головного мозга, составляющими ГЭБ, в различных формах биспецифичных антител, содержащих связанное с ним терапевтическое антитело, увеличивая посредством этого способность терапевтического антитела к проникновению через ГЭБ.

17-4. Анализ дальнейших превращений антител в клетках эндотелия головного мозга человека.

Если антитело интернализуется и колокализуется с лизосомальным маркером внутри клетки, то такое антитело не может проходить через ГЭБ из-за его разрушения в клетках эндотелия головного мозга. В отличие от этого, если антитело колокализуется с ранней эндосомой, ассоциированной с экзоцитозом, или известным маркером, ассоциированным с прохождением через ГЭБ, то ожидают, что это антитело пересекает ГЭБ посредством рецептор-опосредованного транцитоза, то есть проходит интернализацию клетками эндотелия головного мозга и затем существует в головном мозге.

После такой же обработки НМБЕС бивалентной формой 1564 из антител, проанализированных в примере 17-2, анализировали, какой клеточный компонент этих клеток колокализуется с этими антителами. Тем не менее, козьими противочеловеческими антителами, выявляющими обработанные антитела после блокировки и пермеабиллизации, обрабатывали одновременно каждое из следующих антител:

антитело против катепсина D: лизосомальный маркер;

антитело против кавеолина-1: маркер кавеолин-опосредованного транцитоза (предположительно являющегося основным механизмом прохождения через ГЭБ);

антитело против EEA1: маркер ранних эндосом.

Остальные методы были такими же, как в примере 17-2, но для маркеров использовали соответствующие вторичные антитела.

Результаты анализа показаны на фиг. 13c. Клон 1564 в форме биспецифичного антитела не колокализировался с катепсином D, но колокализировался с кавеолином-1 и EEA1 в клеточной мембране и клетках. Эти результаты показывают, что после интернализации клона 1564 он мог проходить через ГЭБ по пути RMT, минуя механизмы внутриклеточной деградации.

Пример 18. Анализ влияния антитела против IGF1R на передачу сигналов через IGF1R.

18-1. Анализ пролиферации клеточной линии MCF-7 при использовании IGF1R.

Возможное влияние антитела против IGF1R по настоящему изобретению на связывание IGF1R (рецептора IGF1) с его лигандом анализировали по эффективности пролиферации клеток под действием IGF1.

Проводили 5-кратное разведение минител клонов 996, 1226, 1564 и МКJP2, полученных в примере 14-1, от 400 нМ, соответственно, с получением разведенных образцов и затем к 25 мкл каждого разведе-

денного образца добавляли по 25 мкл 20 нг/мл IGF1. Клетки линии MCF-7, экспрессирующие IGF1R, культивировали, пассировали, удаляя среду в день эксперимента, и в каждую лунку 96-луночного планшета, в который вносили IGF1 и анализируемое антитело, добавляли по 20000 клеток (что соответствовало 50 мкл).

После 3 суток инкубации при подходящих температуре и влажности вносили 10 мкл реагента ССК-8 для оценки степени роста клеток и проводили инкубацию в CO₂-инкубаторе на протяжении 4-5 часов. Затем планшет вынимали и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм с использованием спектрофотометра.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 14А.

По результатам эксперимента было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению не ингибировало пролиферацию клеток MCF-7, вызванную передачей сигналов IGF1 через IGF1R. Антитело против IGF1R (Imclone), использованное в качестве контрольной группы, ингибировало пролиферацию клеток MCF-7, обусловленную передачей сигналов IGF1 через IGF1R, зависимым от вносимой концентрации образом. Поэтому антитело по настоящему изобретению является антителом, обладающим способностью к связыванию с IGF1R, экспрессированным на эндотелиальных клетках, составляющих ГЭБ, и к проникновению через ГЭБ, но не ингибирует передачу сигналов IGF1 в организме. Таким образом, было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению может быть использовано в качестве переносчика через ГЭБ.

18-2. Анализ ингибирования компонентов передачи сигналов через IGF1R в клеточной линии MCF-7.

Когда связывание IGF1 с клетками, экспрессирующими IGF1R, приводило к передаче сигнала в эти клетки, антитело против IGF1R по настоящему изобретению анализировали для определения связывания IGF1 с его рецептором и последующих компонентов передачи сигнала. То есть, антителом против IGF1R обрабатывали клеточные линии MCF-7, экспрессирующие IGF1R, и затем анализировали общий IGF1R, фосфорилированный IGF1R, общий Akt как последующий фактор IGF1R и количество фосфорилированного Akt в клетках.

После культивирования клеток MCF-7 культуральную среду заменяли бессывороточной культуральной средой за 20 часов до обработки антителом против IGF1R. Клетки линии MCF-7 обрабатывали минителами клонов 996, 1226, 1564 и МКJP2, полученными в примере 4-1, в концентрации 100 нМ, соответственно, и через 1 час вносили 200 нг/мл IGF1. Через 20 минут клетки промывали с использованием PBS и затем лизировали M-PER с добавлением смеси ингибиторов протеаз и фосфатаз. После измерения концентрации белка с использованием набора для ВСА-анализа 12,5 мкг белка вносили в гель для электрофореза (SDS-PAGE) и затем переносили на PVDF-мембрану. Блокировку проводили при комнатной температуре с легким покачиванием на протяжении 1 часа с использованием PBST (0,1% Tween 20), содержащего 5% BSA, и затем проводили обработку первичным антителом против IGF1R или Akt с медленным покачиванием при 4°C в течение ночи. В качестве контроля внесения использовали антитело к бета-актину. После промывки проводили обработку вторичным антителом с медленным покачиванием при комнатной температуре на протяжении 1 часа с последующей промывкой. Добавляли ECL-раствор и сигналы наблюдали с использованием ImageQuant LAS 4000. Результаты эксперимента показаны на фиг. 14b.

По результатам эксперимента было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению не влияло на общий IGF1R, фосфорилированный IGF1R, общий Akt как последующий фактор IGF1R и количество фосфорилированного Akt в клетках.

18-3. Анализ ингибирования компонентов передачи сигналов через IGF1R в клетках эндотелия головного мозга мыши.

Когда связывание IGF1 с клетками, экспрессирующими IGF1R, приводило к передаче сигнала в эти клетки, антитело против IGF1R по настоящему изобретению анализировали для определения связывания IGF1 с его рецептором и последующих компонентов передачи сигнала. То есть, клетки линии bEND3, экспрессирующие IGF1R, обрабатывали 11F11-1564, 3A9-1564 CH11F11 и ch3A9, отдельными антителами против альфа-синуклеина, описанными в публикации патента Кореи № 2018-0081465, полученными способом, примененным в примере 14-2, и затем анализировали общий IGF1R, фосфорилированный IGF1R, общий Akt как последующий фактор IGF1R и количество фосфорилированного Akt в клетках.

Во время инкубации клеток bEND3 культуральную среду заменяли бессывороточной культуральной средой за 20 часов до обработки антителом против IGF1R. Клетки линии bEND3 обрабатывали биспецифичными антителами клонов 1564 и МКJP2, полученными в примере 14-2, в концентрации 100 нМ и через 1 час вносили 200 нг/мл IGF1. Через 20 минут клетки промывали с использованием PBS и затем лизировали M-PER с добавлением смеси ингибиторов протеаз и фосфатаз. После измерения концентрации белка с использованием набора для ВСА-анализа 12,5 мкг белка вносили в гель для электрофореза (SDS-PAGE) и затем переносили на PVDF-мембрану. Блокировку проводили при комнатной температуре с легким покачиванием на протяжении 1 часа с использованием PBST (0,1% Tween 20), содержащего 5% BSA, и затем проводили обработку первичным антителом против IGF1R или Akt с медленным пока-

чиванием при 4°C в течение ночи. В качестве контроля внесения использовали антитело к бета-актину. После промывки проводили обработку вторичным антителом с медленным покачиванием при комнатной температуре на протяжении 1 часа с последующей промывкой. Добавляли ECL-раствор и сигналы на блюдали с использованием ImageQuant LAS 4000. Результаты эксперимента показаны на фиг. 14с.

По результатам эксперимента было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению не влияло на общий IGF1R, фосфорилированный IGF1R, общий Akt как последующий фактор IGF1R и количество фосфорилированного Akt в клетках.

Пример 19. Анализ нетоксичности антитела против IGF1R.

19-1. Анализ ADCC антитела к IGF1R в форме IgG.

Антитело против IGF1R в форме IgG по примеру 14-3 анализировали для определения того, приводило ли оно к гибели клеток посредством IGF1R-зависимого связывания с поверхностью клеток, экспрессирующих IGF1R. То есть, набор для репортерного биологического анализа ADCC использовали для анализа активации натуральных клеток-киллеров (NK-клеток) и нежелательного влияния на клетки, экспрессирующие IGF1R, при связывании клон 1564 антитела против IGF1R с клеточными линиями, экспрессирующими IGF1R.

После инкубации клеток MCF-7, сверхэкспрессирующих IGF1R, и клеток SKBR3 с низким уровнем экспрессии IGF1R в каждую лунку 96-луночного планшета вносили по 5000 клеток за 20 часов до обработки антителом. После культивирования клеток проводили замену среды на RPMI 1640, содержащую 4% сыворотки с низким содержанием IgG, и в каждую лунку вносили клон 1564 в форме IgG в 8-кратном разведении, начиная со 133,3 нМ. В каждую лунку вносили стабилизированные ADCC-эффекторные клетки, инкубировали их на протяжении 6 часов и затем оставляли при комнатной температуре приблизительно на 10 минут. После внесения подготовленного реагента для люциферазного анализа Bio-Glo в каждую лунку измеряли степень люминесценции с использованием оборудования PHERAstarFS, BMG LABTECH, анализируя степень индукции ADCC. Результаты эксперимента показаны на фиг. 15а.

По результатам эксперимента было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению, в частности клон 1564, связывалось с клетками MCF-7, представляющими собой клеточную линию, сверхэкспрессирующую IGF1R, и клетками SKBR3 с низким уровнем экспрессии IGF1R, но не индуцировало ADCC эффекторными клетками.

19-2. Анализ уровня IGF1R в головном мозге после многократного введения антитела против IGF1R.

Антитела, используемые в качестве переносчиков через ГЭБ, связываются с рецепторами-мишенями на клетках эндотелия головного мозга, увеличивая проникающую способность терапевтических антител, но не должны изменять уровень соответствующих рецепторов. Понижающая регуляция рецепторов-мишеней может влиять на их роль в головном мозге, вызывая побочные эффекты.

Анализировали, влияет ли многократное введение антитела против IGF1R по настоящему изобретению на уровни IGF1R в головном мозге. Согласно примеру 14-6, мышам со смоделированной болезнью Паркинсона проводили многократное введение биспецифичного антитела в бивалентной форме, где клон 1564 был связан с терапевтическим антителом для лечения болезни Паркинсона, терапевтического антитела для лечения болезни Паркинсона самого по себе и IgG отрицательного контроля один раз в неделю на протяжении 3 месяцев и затем уровни IGF1R в ткани головного мозга анализировали вестерн-блоттингом.

После перфузии ткани головного мозга трех мышей в каждой группе с использованием PBS и ее гомогенизации 10 мкг лизата вносили в 4-12% бис-трис-гель, проводили электрофорез и перенос на PVDF-мембрану. В остальном метод был таким же, как в примере 19-1.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 15b. Биспецифичное антитело, в состав которого входил клон 1564, продемонстрировало уровень IGF1R, сходный с группами введения терапевтического антитела для лечения болезни Паркинсона самого по себе и IgG. Эти результаты показывают, что клон 1564 не приводит к серьезным изменениям уровня IGF1R в головном мозге даже после его многократного введения, и поэтому ожидается, что у данного антитела будет мало побочных эффектов при его использовании в качестве переносчика через ГЭБ.

19-3. Анализ распределения антитела в головном мозге после введения антитела против IGF1R.

Переносчик через ГЭБ связывается с рецептором на поверхности клетки эндотелия головного мозга и доставляет терапевтическое антитело в головной мозг, но с рецептором на поверхности нормальной клетки головного мозга должно связываться небольшое количество антитела. Если с нормальными клетками, экспрессирующими антиген в головном мозге, будет связываться большое количество переносчика через ГЭБ, до мишени будет доходить небольшое количество терапевтического антитела, связанного с переносчиком.

Для анализа распределения антитела против IGF1R по настоящему изобретению в головном мозге распределение антитела против IGF1R анализировали иммунным окрашиванием головного мозга животных, использованных в *in vivo* эксперименте, проведенном в примере 21-2. Крыс SD, которым вводили бивалентную форму клон 1564, перфузировали физиологическим раствором посредством транскардиальной перфузии. Левое полушарие фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине на про-

тяжении 24 часов. Головной мозг промывали с использованием 1X PBS и замораживали на 24 часа в растворе, содержащем 30% сахарозы. Головной мозг замораживали в OCT и хранили при -80°C до приготовления срезов. Получали фронтальные срезы толщиной 25 мкм и помещали их в 1x PBS, содержащий 0,1% азида натрия, в 24-луночной чашке Петри. Ткани блокировали и пермеабилizировали инкубацией с бессывороточным белковым блоком Dako (X0909, DAKO), содержащим 0,3% Tween-20, в свободном режиме при комнатной температуре на протяжении 1 часа. Первичное антитело обрабатывали биотинилированным антителом к человеческому Fc (BA3080, Vector Labs) в отношении 1:50 и инкубировали в течение ночи при 4°C . После трехкратной промывки с использованием TBS антитело против клеток эндотелия обрабатывали RECA-1 (ab9774, AbCam) в отношении 1:2000 или антителом к нейронам NeuN (MAV377, Millipore) в отношении 1:250 на протяжении 2 часов. После промывки проводили связывание с Alexa488 и обработку вторичным антителом для каждого антитела на протяжении 45 минут. После промывки срезы помещали на предметное стекло и окрашивали ядра, добавляя среду для заключения флуоресцентных микропрепаратов ProLong Gold, содержащую DAPI, или Dako, содержащую Hoechst 33258. Кору головного мозга и гиппокамп анализировали на конфокальном микроскопе при подходящей длине волны флуоресценции. Результаты анализа показаны на фиг. 15с.

Полученные результаты показывают, что биспецифичное антитело, связанное с клоном 1564, не связывалось с нормальными нейронами, но специфично связывалось с клетками эндотелия головного мозга. Поэтому ожидается, что у антитела против IGF1R по настоящему изобретению будет мало побочных эффектов благодаря тому, что оно лишь увеличивает способность терапевтического антитела к проникновению через ГЭБ без связывания с нормальными клетками головного мозга, и будет приводить к повышению терапевтической эффективности терапевтического антитела.

Пример 20. Анализ способности антитела против IGF1R к проникновению через ГЭБ *in vitro*.

20-1. Анализ способности бивалентного антитела к проникновению через ГЭБ в модели ГЭБ, имеющей происхождение от sv-ARBEC.

Антитела, полученные в примерах 11 и 12, использовали для получения биспецифичного антитела в примере 14-2 и затем анализировали способность полученного биспецифичного антитела к проникновению через ГЭБ *in vitro* в модели ГЭБ на основе sv-ARBEC. sv-ARBEC высевали одним слоем на проницаемую мембрану и целостность ГЭБ-системы оценивали заранее исходя из сопротивления (TEER) и степени прохождения сахарозы через ГЭБ-систему. При этом sv-ARBEC обрабатывали культуральной средой для астроцитов крысы (RAS-CM), которая, как известно, способствует обеспечению целостности такой системы. Через 90 минут после нанесения анализируемых антител 1564, 48G5, 54H4, 60H6 и B11 в форме биспецифичных антител на мембрану количество антител в нижней камере анализировали масс-спектрометром. Для масс-спектрометрии анализировали и затем использовали сигнатурные пептиды из Fc и scFv каждого антитела. При этом в качестве отрицательных контролей использовали терапевтическое антитело для лечения болезни Паркинсона (11F11) само по себе и биспецифичное антитело, где с этим терапевтическим антителом была связана scFv-форма биоаналога ГерцептинаTM. Калибровочные пределы системы определяли, пропуская антитело A20.1 (полученное Национальным научно-исследовательским советом), которое, как известно, не проникает через ГЭБ. Значения, полученные при масс-спектрометрии, заносили в формулы, известные из ранее опубликованной литературы, получая Rapp-значение, которое отражало степень способности к проникновению через ГЭБ *in vitro*.

Результаты анализа показаны на фиг. 16а. Проанализированные антитела, за исключением B11, продемонстрировали более высокую способность к проникновению через ГЭБ, чем отрицательный контроль. В частности, клон 1564 продемонстрировал более высокую способность к проникновению через ГЭБ, чем остальные клоны. Эти результаты показывают, что клоны 1564, 48G5, 54H4, 60H6 и биспецифичные антитела, связанные с клонами 1564, 48G5, 54H4, 60H6, могут иметь более высокую способность к проникновению через ГЭБ *in vivo*, чем одиночное антитело.

20-2. Анализ способности моновалентного антитела к проникновению через ГЭБ в модели ГЭБ, имеющей происхождение от sv-ARBEC.

В такой же модели, как в примере 20-1, анализировали способность моновалентных, полученных согласно примеру 14-4, и бивалентных антител, полученных согласно примеру 14-2, к проникновению через ГЭБ *in vitro*. Бивалентное антитело и моновалентное антитело, полученные с использованием клонна 1564, и терапевтическое антитело для лечения болезни Паркинсона (3A9) в качестве отрицательного контроля пропускали через sv-ARBEC ГЭБ-систему и затем анализировали количество прошедших через нее антител. Результаты анализа показаны на фиг. 16b.

Бивалентная форма и моновалентная форма клонна 1564 продемонстрировали более высокую способность к проникновению через ГЭБ *in vitro*, чем антитело 3 A9 само по себе, и, в частности, способность бивалентной формы к проникновению через ГЭБ была выше, чем у моновалентной формы. Эти результаты показывают, что клон 1564 может усиливать способность терапевтических антител, связанных с ним в различных формах, к проникновению через ГЭБ *in vitro*.

20-3. Анализ способности антитела против IGF1R к проникновению через ГЭБ в модели ГЭБ, имеющей происхождение от человеческих iPSC.

Модель ГЭБ, имеющая происхождение от человеческих стволовых клеток, демонстрирует более высокое сопротивление (TEER), чем ГЭБ-системы, имеющие происхождение от клеток крысы или мыши, и экспрессирует все из различных маркеров, обнаруженных в ГЭБ. Поэтому проницаемость ГЭБ в модели, имеющей происхождение от человеческих стволовых клеток, ниже, чем у ГЭБ, имеющего происхождение от клеток животных, и данная модель хорошо воспроизводит ГЭБ человека.

Векторы, такие как эписомные векторы oriP/EBNA1, кодирующие OCT4, SOX2, с-Мус, KLF4, NANOG и LIN28, вводили в клетки, имеющие происхождение от человеческой амниотической жидкости (AF-iPSC), и репрограммированные на iPSC. Полученные колонии обрабатывали KODMEM/F12, KOSR, glutamax, NEAA и бета-меркаптоэтанолом с получением клеток эндотелия в прединдифференцированном состоянии и затем обрабатывали бессывороточной дифференцировочной средой для эндотелия, 1% PDS и 20 нг/мл bFGF для дифференцировки с получением клеток эндотелия головного мозга. Забор клеток амниотической жидкости и подготовка ГЭБ-системы с использованием этих клеток были проведены Национальным научно-исследовательским советом. После подтверждения целостности системы по показателю сопротивления и показателю прохождения сахарозы антитело против IGF1R анализировали на предмет его способности к проникновению через ГЭБ в форме биспецифичного антитела в виде комбинации терапевтического антитела для лечения болезни Паркинсона с scFv-формой антитела против IGF1R. Анализируемые антитела представляли собой бивалентную форму клона 1564, моновалентную форму клона 1564, бивалентную форму клона F06 и бивалентную форму клона C04. В качестве отрицательного контроля использовали терапевтическое антитело 11F11 для лечения болезни Паркинсона. Антитела, прошедшие через ГЭБ-систему анализировали таким же образом, как в примере 20-1.

Результаты анализа показаны на фиг. 16с. Все проанализированные клоны продемонстрировали более высокую способность к проникновению через ГЭБ, чем группа отрицательного контроля. В частности, бивалентное F06 и бивалентное C04 продемонстрировали способность к проникновению через ГЭБ, до 15 раз выше, чем у одиночного антитела. Полученные результаты показывают, что антитела против IGF1R по настоящему изобретению эффективно проходят через ГЭБ-систему человеческого происхождения по сравнению с одиночным антителом.

Пример 21. Анализ способности антитела против IGF1R к проникновению через ГЭБ *in vivo* (анализ колокализации).

21-1. Колокализация минител с сосудами головного мозга.

Для подтверждения распределения антител против IGF1R по настоящему изобретению по сосудам головного мозга *in vivo* проводили следующий эксперимент.

Конкретно, PBS-буфер или 10 мг/кг контрольного IgG и минител клонов 996, 1226 и 1564, полученных в примере 14-1, вводили в хвостовую вену самцов мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель, соответственно. Через 4 часа проводили интракардиальную перфузию головного мозга мыши достаточным количеством 0,9% раствора NaCl и 4% параформальдегида. Выделяли фиксированный головной мозг, приготавливали срезы толщиной 20 мкм и проводили одновременное окрашивание антителом против мышечного CD31 как сосудистого маркера и антителом против человеческого Fc для подтверждения колокализации сосудов головного мозга и анализируемого IGF1R. Для визуализации CD31 и человеческого Fc под флуоресцентным микроскопом использовали вторичное антитело, конъюгированное с Alexa 488, для CD31, вторичное антитело, конъюгированное с Alexa 594, для человеческого Fc.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 17а.

По результатам эксперимента было подтверждено, что антитела по настоящему изобретению, не блокирующие связывание с лигандом, обладали отличной способностью к проникновению через ГЭБ. В результате окрашивания тканей головного мозга сосудистыми маркерами (антитело против CD31, верхний ряд) и человеческими антителами (антитело против человеческого Fc, нижний ряд) методом анализа степени колокализации антитела с кровеносными сосудами головного мозга посредством иммунного окрашивания (Neugon (2016) Yu-Zuchero et al.) антитела по настоящему изобретению, не блокирующие связывание с лигандом, продемонстрировали более высокую степень колокализации, чем IgG контрольной группы.

21-2. Анализ способности биспецифичного антитела к проникновению через ГЭБ *in vivo*.

Была предпринята попытка подтвердить способность антитела против IGF1R по настоящему изобретению к проникновению через ГЭБ *in vivo* у нормальных крыс. PBS-буфер или 10 мг/кг контрольного IgG и терапевтическое антитело для лечения болезни Паркинсона (11F11) или бивалентное биспецифичное антитело (11F11-1564), содержащее клон 1564, связанный с терапевтическим антителом, вводили в хвостовую вену крыс SD, соответственно. Через 24 часа количество антител в СМЖ и головном мозге анализировали масс-спектрометрией. Масс-спектрометрию проводили тем же методом, что в примере 20-1.

Биспецифичное антитело, с которым был связан клон 1564, продемонстрировало более высокую способность к проникновению в СМЖ и головной мозг, чем терапевтическое антитело без антитела против IGF1R, и его эффективность была подтверждена как при дозе 10 мг/кг, так и при дозе 30 мг/кг. При

дозе 30 мг/кг биспецифичное антитело продемонстрировало способность к проникновению в головной мозг, приблизительно до 4,5 раз превосходящую соответствующую способность одиночного антитела.

Клон 1564 получали в бивалентной форме и моновалентной форме согласно Примерам 14-2 и 14-4, и затем вводили в дозе 30 мг/кг или 60 мг/кг таким же образом, как описано выше, и через 24 часа анализировали количество антител в СМЖ и головном мозге. Эти два типа биспецифичных антител, связанных с клоном 1564, продемонстрировали более высокую способность к проникновению в СМЖ и головной мозг, чем одиночные антитела. В частности, бивалентная форма продемонстрировала способность к проникновению через ГЭБ в головной мозг, до 5 раз более высокую, чем моновалентная форма.

Результаты, представленные на фиг. 17b, демонстрируют, что клон 1564 повышает способность терапевтического антитела к проникновению через ГЭБ в организме даже при связывании с терапевтическим антителом в различных формах.

Ожидалось, что аффинные варианты клона 1564, полученные согласно примеру 2, будут улучшать ФК в сыворотке по сравнению с исходным клоном. Таким образом, ожидалось, что способность к проникновению через ГЭБ будет улучшена благодаря более продолжительному присутствию антитела в сыворотке и постоянному поддержанию входящего потока через ГЭБ. Через 0, 24 и 48 часов после внутривенного введения аффинных вариантов, полученных в бивалентной форме согласно примеру 14-2 или в моновалентной форме согласно примеру 14-4, крысам SD в дозе 30 мг/кг проводили забор крови из глазной вены. Анализируемые антитела разделяли на два эксперимента в соответствии с остоном терапевтического антитела. Биспецифичные антитела соответствующих вариантов, использованные в эксперименте, показаны в табл. 26 ниже.

Таблица 26

Биспецифичские антитела, используемые для
in vivo анализа ГЭБ-проникающей способности

Клоны с химерным остовом	Клоны с гуманизированным остовом
Бивалентное Ch11f11-1564	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-1564
Моновалентное Ch11f11-1564	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH5
Моновалентное Ch11f11-C04	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH16
Бивалентное Ch11f11-F06	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH35
Моновалентное Ch11f11-F0f	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH9
**	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH2
**	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH7
**	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH32

Уровни антител в крови анализировали посредством ELISA. После сорбции козьего антитела против человеческого Fc на 96-луночный планшет, вносили подходящее количество разведенного образца и затем проводили выявление антителом против человеческого Fab, конъюгированного с HRP. Результаты анализа показаны на фиг. 17d.

В результате, в первой анализируемой группе моновалентная форма 1564, моновалентная форма F06 и моновалентная форма C04 продемонстрировали более продолжительную ФК в сыворотке, чем бивалентная форма исходного клона 1564. Во второй анализируемой группе бивалентные формы VH2, VH5, VH7, VH9, VH16 и VH32, за исключением VH35, продемонстрировали лучшую ФК в сыворотке по сравнению с бивалентной формой 1564.

Для анализа способности к проникновению через ГЭБ в этих группах через 48 часов у крыс проводили забор СМЖ и анализировали ее тем же методом ELISA. Результаты анализа показаны на фиг. 17e.

В первой анализируемой группе моновалентная форма 1564, моновалентная форма F06 и моновалентная форма C04, продемонстрировавшие лучшую ФК в сыворотке, продемонстрировали более высокие уровни антител в СМЖ по сравнению с бивалентной формой исходного 1564. Во второй анализируемой группе бивалентные формы VH2, VH5, VH7, VH9, VH16 и VH32, также продемонстрировавшие лучшую ФК в сыворотке, продемонстрировали более высокие уровни антител в СМЖ по сравнению с бивалентной формой исходного 1564. VH35 продемонстрировал менее продолжительную ФК в сыворотке и низкий уровень антитела в СМЖ по сравнению с бивалентной формой исходного 1564.

Результаты, представленные на фиг. 17d и 17e, показывают, что ФК в сыворотке является важным фактором для способности антитела к проникновению через ГЭБ благодаря непрерывному входящему потоку антитела через ГЭБ и что биспецифичные антитела, имеющие переносчик через ГЭБ и лучшую ФК в сыворотке, имеют более высокую способность к проникновению через ГЭБ. В частности, в случае моновалентной формы F06 с максимальным уровнем антитела в СМЖ ее способность к проникновению через ГЭБ была приблизительно в 5 раз выше, чем у бивалентной формы исходного 1564. В Примерах 18-2 и 18-3, поскольку способность бивалентного антитела 1564 к проникновению в СМЖ была прибли-

зительно в 3 раза выше, чем у одиночного антитела, ожидалось, что способность моновалентной формы F06 к проникновению через ГЭБ будет приблизительно до 15 раз выше, чем у одиночного антитела.

Пример 22. Деаминация антитела к IGF1R.

Реакция деаминации обозначает, например, атаку пептидной связи между двумя сторонами аспарагина с образованием симметричного сукцинимидного промежуточного продукта, который, в результате гидролиза, трансформируется в аспарагиновую кислоту или изоаспарагиновую кислоту. Поскольку реакция деаминации может влиять на непрерывную активность белка, проводили замену одних аминокислот легкой цепи и тяжелой цепи на другие аминокислоты для предотвращения деаминации и для обеспечения долгосрочной стабильности.

Для подтверждения сайта деаминации, определенного компьютерным анализом, антитело 1564 к IGF1R оставляли при 40°C и оценивали степень деаминации. В результате, было подтверждено, что от 4,6 до 47,3% реакций деаминации происходят в CDR2 и CDR3 легкой цепи и CDR2 тяжелой цепи, как показано на фиг. 18а. Для предотвращения деаминации проводили замену аминокислот в каждом сайте, как показано на фиг. 18b, и анализировали изменения способности к связыванию с белком IGF1R в зависимости от каждой аминокислотной замены. Отбирали мутанты, демонстрирующие такую же аффинность связывания, как 1564 дикого типа, и было подтверждено, что способность этих мутантов, имевших по 3 или 4 мутации, была такой же, как у 1564 дикого типа. Введение этих мутаций означает, что состав буфера и условия хранения позволяют длительное время поддерживать аффинность связывания и стабильную форму. Результаты анализа показаны в табл. 27.

Таблица 27

Экспериментальная классификация	Клон антитела	EC ₅₀ (нМ)	Значение насыщения
Первый	1564(WT)	2,15	1,1
	N95aH	2,63	1,08
	N95aR	2,3	1,17
	N95aK	2,07	1,18
Второй	1564(WT)	2,66	0,977
	N95aD	2,07	0,896
	N54D	2,89	0,933
	N54Q	2,2	0,885
Третий	1564(WT)	6,87	0,863
	N51D	7,35	0,932

Пример 23. Картирование эпитопов антител против IGF1R.

23-1. ELISA-анализ антитела против IGF1R, термически обработанного белка IGF1R и нативного белка IGF1R.

В данном примере была предпринята попытка определить какой эпитоп распознает антитело против IGF1R: линейный или конформационный. ELISA проводили с использованием бивалентных биспецифичных антител 1564, 48G5, 54H4, 60H6 и B11 и белка ECD нативного человеческого IGF1R или протертого белка (термически обработанного IGF1R). ELISA проводили так же, как показано в примере 15. Результаты анализа показаны в табл. 28.

Таблица 28

Название клона	EC ₅₀ (нМ) в отношении нативного IGF1R	EC ₅₀ в отношении термически обработанного IGF1R (нМ)
ch11F11-1564	0,914	N/A*
ch11F11-48G5	1,21	N/A
ch11F11-54H4	2,88	N/A
ch11F11-60H6	10	N/A
ch11F11-B11	7,13	410

* N/A - Недоступно.

Клоны продемонстрировали связывание с белком ECD нативного человеческого IGF1R, сходное с отмеченным в примере 15, но не связывались с белком ECD термически обработанного человеческого IGF1R, третичная структура которого была разрушена нагреванием. Это означает, что антитело против IGF1R по настоящему изобретению связывается с конформационным эпитопом, но не с линейным эпитопом.

23-2. Картирование эпитопов антитела против IGF1R.

Для анализа конформационного эпитопа клона 1564 проводили аланиновое сканирование, как описано ниже. Клетки OGFAR3, являющиеся линией клеток рака яичника с подтвержденной низкой экспрессией IGF1R, модифицировали для экспрессии библиотеки IGF1R, где с N-концом была слита метка eGFP, а C-концевой киназный домен был удален. Библиотека IGF1R содержит мутации, где остатки, расположенные на поверхности IGF1R, заменены аланином. Полученной библиотекой трансфицировали клетки OVCAR3. Клетки, в которых была определена экспрессия IGF1R, обрабатывали антителом 1564 и затем проводили их флуоресцентное мечение обработкой вторичным антителом, меченным DyLight650. Меченные клетки классифицировали по наличию или отсутствию экспрессии IGF1R, экспрессии IGF1R и наличию или отсутствию связывания с 1564 и проводили глубокое секвенирование РНК с применением методики IlluminaHiSeq для анализа частоты каждой аланиновой мутации в соответствующей группе клеток. Соответствующую частоту нормализовали по результату, полученному для клеток, экспрессировавших IGF1R дикого типа, и затем рассчитывали относительную частоту для отбора тех мутаций, число которых уменьшалось в группе клеток, меченных 1564. Исходя из этих наблюдений, было обнаружено, что эпитоп клона 1564 был расположен в домене FN2, а принадлежащие к нему остатки представляли собой Y775, P776, F778, R650, S791 и L798. Полученные результаты и последовательности, распознаваемые клоном 1564, показаны на фиг. 19. С учетом отсутствия данных об участии этих остатков в связывании с IGF1 в опубликованной ранее литературе эти результаты правдоподобно описывают свойства клона 1564, использованного в примере 23-1.

Пример 24. Сравнение аффинности связывания одиночного антитела и биспецифичного антитела с антигеном.

24-1. Аффинность связывания одиночного антитела и биспецифичного антитела с антигеном альфа-синуклеина.

Когда scFv-форма антитела к IGF1R была связана с антителом типа IgG к альфа-синуклеину, анализировали влияние такого связывания на аффинность связывания антитела к альфа-синуклеину.

Агрегаты альфа-синуклеина сорбировали на 96-луночный планшет в концентрации 1 мкг/мл на протяжении 18 часов и после промывки проводили обработку каждым антителом в 5-кратном разведении, начиная с 400 нМ. Связанные антитела связывали с антителом против человеческого Fc с HRP и затем проводили окрашивание раствором ТМВ, измеряя степень связывания антител.

Как показано на фиг. 20a, было подтверждено, что аффинность связывания одиночного антитела и биспецифичного антитела с агрегатами альфа-синуклеина была одинаковой.

24-2. Аффинность связывания одиночного антитела и биспецифичного антитела с антигеном IGF1R.

Для сравнения степени связывания одиночного антитела к альфа-синуклеину и биспецифичного антитела с антигеном IGF1R проводили эксперимент таким же образом, как в примере 22.

Как показано на фиг. 20b, было подтверждено хорошее зависимое от концентрации связывание биспецифичного антитела, имевшего scFv-форму антитела против IGF1R, однако одиночное антитело без области антитела к IGF1R не продемонстрировало связывания.

24-3. Анализ связывающей способности гуманизованного антитела к альфа-синуклеину.

Разницу в аффинности связывания биспецифичного химерного антитела и биспецифичного гуманизованного антитела анализировали, проводя эксперимент таким же образом, как в примере 24-1.

Как показано на фиг. 20c, биспецифичные гуманизованные антитела имели аффинность связывания с агрегатами альфа-синуклеина на уровне, сходном с биспецифичным химерным антителом, и было подтверждено, что моновалентное биспецифичное антитело с одним scFv к IGF1R также демонстрировало аффинность связывания на уровне, сходном с химерными антителами.

По результатам анализа аффинности связывания биспецифичного химерного антитела и биспецифичного гуманизованного антитела с IGF1R посредством проведения эксперимента таким же образом, как в примере 24-2, все биспецифичные антитела продемонстрировали одинаковую аффинность связывания, однако одиночное антитело без scFv к IGF1R не продемонстрировало связывания, как показано на фиг. 20d.

Эти результаты показывают, что при гуманизации антитела с заменой области мышинного антитела, действующей в организме человека как иммуноген, антитело имеет такую же активность без изменения аффинности связывания с агрегатами альфа-синуклеина и IGF1R.

24-4. Сравнение фагоцитоза при использовании одиночного антитела и биспецифичного антитела.

Фагоцитоз относится к активности по удалению внеклеточных веществ при участии различных рецепторов макрофагов. Различные белковые агрегаты индуцируют иммунный ответ или воспалительную реакцию, что оказывает неблагоприятное влияние на организм человека. В частности, известно, что при введении антитела для удаления агрегатов альфа-синуклеина он опосредован взаимодействием Fc-области антитела и FcγR на поверхности клеток. По этой причине проводили сравнение фагоцитарной активности при использовании одиночного антитела и биспецифичного антитела, связанного с scFv к IGF1R.

Для сравнения фагоцитоза при использовании одиночного антитела и биспецифичного антитела использовали микроглиальные клетки BV-2 мышинного происхождения. Клетки BV-2 культивировали в

среде RPMI1640, получали в концентрации 2×10^6 клеток/мл и вносили в количестве 100 мкл в 96-луночные планшеты с U-образным дном. 10 мкг/мл агрегатов альфа-синуклеина и 25 мкг/мл антител разводили в среде RPMI1640, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 20 минут. Клетки BV-2 обрабатывали смесью агрегатов альфа-синуклеина и антител и оставляли на 15 минут. Агрегаты альфа-синуклеина удаляли из супернатанта центрифугированием при 1200 об/мин и проводили трехкратную промывку PBS-буфером (pH 7,4) для удаления агрегатов или антител, связанных с поверхностью клеток. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом и промывали PBS-буфером. Для подтверждения фагоцитоза агрегатов и антител клетками добавляли 0,5% Triton X-100 для разрушения клеточных мембран, проводили промывку PBS-буфером и обработку антителом против всех форм альфа-синуклеина на протяжении 1 часа. Связанное антитело против всех форм альфа-синуклеина обрабатывали противокроличьим антителом с Alexa 488 на протяжении 1 часа и затем проникновение агрегатов в макрофагальные клетки подтверждали FACS-анализом.

Как показано на фиг. 20e, было подтверждено, что нормальный человеческий IgG не влиял на макрофаги, а при обработке антителом к альфа-синуклеину фагоцитоз агрегатов альфа-синуклеина был усилен. При сравнении одиночного антитела и биспецифичного антитела были подтверждены сходный уровень фагоцитоза и отсутствие влияния scFv-формы антитела к IGF1R, связанной с C-концом IgG, на активность антитела к альфа-синуклеину.

Пример 25. Оценка эффективности биспецифичного антитела.

В соответствии с примером 14-6 получали бивалентное биспецифичное антитело, содержащее химерное антитело 11F11 и scFv клона 1564, и полученное биспецифичное антитело и одиночное антитело к альфа-синуклеину анализировали на предмет их эффективности *in vivo* у трансгенных мышей, сверхэкспрессировавших человеческий альфа-синуклеин (mThy-1, человеческий α -синуклеин, Калифорнийский университет в Сан-Диего). 2,5 мг/кг одиночного антитела или человеческого IgG или то же молярное количество бивалентных биспецифичных антител вводили внутривенно один раз в неделю на протяжении 3 месяцев. Использовали по пять мышей на группу и в качестве контроля использовали не трансгенных животных из того же помета. Затем проводили перфузию следующим образом.

По завершении последнего введения животных анестезировали хлоралгидратом в соответствии с требованиями по гуманному обращению с животными и затем проводили перфузию 0,9% физиологическим раствором для анализа патологических изменений в головном мозге. Затем одну половину (сагиттальный срез) перфузированного головного мозга хранили в 4% параформальдегиде (pH 7,4, 4°C) в фосфатном буфере до момента анализа, а другую половину сразу замораживали (-70°C).

Патоморфологический анализ проводили следующим образом. Из половины головного мозга, фиксированной в параформальдегиде, получали непрерывные срезы толщиной 40 мкм методом свободноплавающих срезов с использованием виброметра. Для подтверждения уровня экспрессии альфа-синуклеина в головном мозге в каждой группе введения срезы, включавшие кору, гиппокамп и полосатое тело, инкубировали с антителами против альфа-синуклеина (антитело к p129 α -syn, маркер агрегатов, Abcam, ab59264, или антитела к полноразмерному альфа-синуклеину) при 4°C в течение ночи. Альтернативно, срезы анализировали на предмет GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок) (AB5804, Millipore) для анализа степени активности астроцитов или инкубировали с антителом к IL-1 β (ab9722, Abcam) для анализа степени нейровоспаления, соответственно. Альтернативно, проводили обработку антителом против NeuN (Chemicon, #MAB377) для анализа степени гибели нейронов в гиппокампе. После инкубации с первичным антителом проводили обработку козьим антителом против кроличьего IgG, связанным с биотином (1:100, Vector Laboratories), и авидином D с пероксидазой хрена (1:200, ABC Elite, Vector Laboratories) и выявление диаминобензидином (DAB). Проводили микроскопию каждого иммуногистохимически окрашенного среза в светлом поле, измеряя оптическую плотность. Полученные результаты показаны на фиг. 21a-21e.

25-1. Анализ способности химерного антитела и биспецифичного антитела к уменьшению количества альфа-синуклеина.

На фиг. 21a показаны результаты окрашивания и оценки коры и гиппокампа в ткани головного мозга мышей с использованием антитела к p-129 α -syn после введения мышам антител для оценки способности химерного антитела 11F11 и бивалентного биспецифичного антитела, содержащего клон 1564 и химерное антитело 11F11, к устранению агрегатов альфа-синуклеина в модели на (трансгенных) мышях, сверхэкспрессирующих человеческий альфа-синуклеин. p-129 α -syn представляет собой форму, фосфорилированную по 129-му остатку, являясь маркером агрегатов, и представлен темно-коричневыми пятнами или агрегатами в окрашенной ткани.

Согласно фиг. 21a, группа введения IgG продемонстрировала более высокую степень окрашивания p-129 α -syn, чем нетрансгенная контрольная группа (# -однофакторный ANOVA, $p < 0.003$). В противоположность этому, в группе введения одиночных антител или биспецифичных антител степень окрашивания p-129 α -syn или агрегатов была существенно снижена. В частности, в гиппокампе степень этого снижения в группе введения биспецифичных антител была больше, чем в группе химерного антитела 11F11 (* - однофакторный ANOVA, $p < 0.003$). На фиг. 21b показаны результаты такого же экспери-

мента, как на фиг. 21а, за исключением окрашивания антителом к полноразмерному альфа-синуклеину в качестве маркера. Выявление всего альфа-синуклеина указывает на то, что антитело по настоящему изобретению обладает способностью к устранению альфа-синуклеина самого по себе и ингибировать его передачу от клетки к клетке. В других аспектах это можно также интерпретировать как ингибирование образования агрегатов из мономеров или удаление всех мономеров. Введение одиночных антител и биспецифичных антител уменьшает степень повышения человеческого альфа-синуклеина у трансгенных мышей по сравнению с группой введения IgG. В частности, в гиппокампе биспецифичные антитела были эффективнее одиночных антител.

Полученные результаты показывают, что химерное антитело 11F11 и биспецифичное антитело эффективно снижают уровни альфа-синуклеина и его агрегатов в моделях болезни Паркинсона на животных даже в низкой дозе 2,5 мг/кг. В частности, биспецифичное антитело превосходит одиночное антитело, позволяя предположить, что биспецифичное антитело может достигать головного мозга в большем количестве, чем одиночное антитело, и обеспечивать более эффективное лечение заболевания, благодаря большей способности к проникновению через ГЭБ. 25-2. Анализ способности химерного антитела и специфичного антитела к уменьшению астроглиоза и снижению уровня воспалительных цитокинов.

Глиоз является неспецифической реакцией, которая возникает в глиальных клетках в ответ на повреждение центральной нервной системы и запускается повреждением ГЭБ или такими веществами, как TGF-бета и интерлейкин. В типичных случаях он включает астроглиоз, и в качестве его маркера используют белок GFAP. Поэтому анализировали эффект уменьшения астроцитоза и высвобождения воспалительных цитокинов, запускающих астроцитоз, при введении химерного антитела 11F11 и биспецифичного антитела, содержащего клон 1564 и указанное химерное антитело. Результаты анализа показаны на фиг. 21с и 21d.

На фиг. 21с показаны результаты окрашивания и оценки ткани головного мозга мышей с использованием GFAP (астроглиоз) в качестве маркера после введения антител для оценки способности химерного антитела 11F11 и биспецифичного антитела, содержащего клон 1564 и указанное химерное антитело, полученных в одном примере настоящего изобретения, к уменьшению астроглиоза *in vivo*. Одиночное антитело и биспецифичное антитело ингибировали астроглиоз по сравнению с контрольной группой IgG. В частности, было подтверждено, что в полосатом теле эффективность биспецифичного антитела была выше эффективности одиночного антитела.

На фиг. 21d показаны результаты окрашивания и оценки ткани головного мозга мышей с использованием антитела к IL-1-бета в качестве маркера после введения антител для оценки способности химерного антитела 11F11 и биспецифичного антитела, содержащего клон 1564 и указанное химерное антитело, полученных в одном примере настоящего изобретения, к снижению воспалительных цитокинов *in vivo*. IL-1-бета вызывает воспаление, приводя к гибели и воспалительному ответу различных нейронов. В гиппокампе крыс, которым вводили антитела по настоящему изобретению, IL-1-бета был снижен в группах введения одиночных антител и биспецифичных антител по сравнению с контрольной группой IgG, и, в частности, у биспецифичного антитела способность к такому снижению была значительно выше, чем у одиночного антитела (##- однофакторный ANOVA, $p < 0.005$; * - однофакторный ANOVA, $p < 0.05$).

Как показано в графических материалах, было продемонстрировано, что антитело по настоящему изобретению уменьшает астроглиоз и высвобождение воспалительного цитокина IL-1-бета, запускающего астроглиоз, по сравнению с контролем.

25-3. Анализ способности химерного антитела и биспецифичного антитела к уменьшению нейродегенерации.

В опубликованной ранее литературе подтверждено, что гибель клеток головного мозга происходит из-за нейротоксичности и воспалительного ответа на альфа-синуклеин. Анализировали способность одиночных антител и биспецифичных антител по настоящему изобретению к ингибированию гибели клеток головного мозга, вызванной альфа-синуклеином, *in vivo*.

В результате окрашивания NeuN, являющимся маркером нейронов коры и гиппокампа, было обнаружено, что как одиночное антитело, так и биспецифичное антитело снижали степень гибели клеток головного мозга по сравнению с контрольной группой IgG. В частности, было подтверждено, что в коре биспецифичное антитело обладало большей способностью к ингибированию гибели клеток головного мозга, чем одиночное антитело. Полученные результаты показаны на фиг. 21е.

Пример 26. Увеличение периода полувыведения конструированием Fc и повышение способности к проникновению через ГЭБ благодаря увеличенному периоду полувыведения.

FcRn является важным рецептором на мембране клеток, который увеличивает период полувыведения, улавливая и направляя антитело внутрь клеток, ингибируя распад антитела, происходящий во время его циркуляции в кровеносных сосудах. Способность к проникновению через ГЭБ также важна для транцитозной активности антитела, но хорошо известно, что транцитозная активность антитела важна при его способности к проникновению через ГЭБ, однако антитела проходят через ГЭБ в зависимости от концентрации антител в кровеносных сосудах. По этой причине для увеличения периода полувыведения биспецифичного антитела получали биспецифичные антитела, повышая аффинность связывания с FcRn

заменой метионина (Met) на лейцин (Leu) в 428-м аминокислотном положении Fc-области. В результате сравнения периода полувыведения при введении биспецифичного антитела дикого типа и биспецифичного антитела M428L в концентрации 10 мг/кг трансгенным мышам, экспрессировавшим человеческий FcRn, было подтверждено увеличение периода полувыведения приблизительно на 50%, как показано на фиг. 22. Для подтверждения увеличения периода полувыведения анализировали ФК-профили при введении биспецифичного антитела дикого типа, бивалентного биспецифичного антитела M428L и моновалентного биспецифичного антитела M428L обезьянам. В случае биспецифичного антитела дикого типа, как показано на фиг. 22а, его концентрация в крови быстро снижалась после 168 часов, в то время как биспецифичные антитела M428L с высокой аффинностью связывания с FcRn сохраняли более высокую концентрацию в крови по сравнению с диким типом. Было подтверждено, что у биспецифичного антитела M428L период полувыведения был приблизительно на 1,5 суток больше, чем у биспецифичного антитела дикого типа. В частности, применительно к клиренсу, наилучший клиренс имело моновалентное биспецифичное антитело M428L, а биспецифичное антитело дикого типа продемонстрировало самый быстрый клиренс (фиг. 22b).

Для подтверждения улучшенного прохождения через ГЭБ благодаря эффекту увеличения периода полувыведения через 24 часа после введения антител проводили забор СМЖ и анализировали количество антител в СМЖ. После сорбции 100 нг/мл IGF1R в охлажденном состоянии на протяжении 18 часов вносили СМЖ, выявляя антитела, связывавшиеся с IGF1R. Как видно на фиг. 22с, были подтверждены прохождение большого количества биспецифичных антител, присутствовавших в большом количестве в крови, через ГЭБ и отличная способность моновалентного биспецифичного антитела M428L к проникновению через ГЭБ, более высокая по сравнению с бивалентным биспецифичным антителом M428L.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифичное антитело против α -syn/против IGF1R, содержащее:
 - а) антитело против альфа-синуклеина (α -syn) или его антигенсвязывающий фрагмент и
 - б) антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:
 - 1) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую SEQ ID NO:1, H-CDR2, содержащую SEQ ID NO:13, и H-CDR3, содержащую SEQ ID NO:52, и
 - 2) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащую SEQ ID NO:98, L-CDR2, содержащую SEQ ID NO:117, и L-CDR3, содержащую SEQ ID NO:152.
2. Биспецифичное антитело по п.1, где:
 - а) VH антитела против IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента содержит каркасную область (H-FR1) 1, содержащую SEQ ID NO:81, H-FR2, содержащую SEQ ID NO:86, H-FR3, содержащую SEQ ID NO:88, и H-FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:92, или
 - б) VL антитела против IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента содержит каркасную область (L-FR) 1, содержащую SEQ ID NO:162, L-FR2, содержащую SEQ ID NO:165, L-FR3, содержащую SEQ ID NO:166, и L-FR4, содержащую SEQ ID NO:170.
3. Биспецифичное антитело по п.1, где VH и VL антитела против IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента содержат SEQ ID NO:222 и 341 соответственно.
4. Биспецифичное антитело против α -syn/против IGF1R, содержащее:
 - а) антитело против альфа-синуклеина (α -syn) или его антигенсвязывающий фрагмент и
 - б) антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:
 - 1) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую SEQ ID NO:1, H-CDR2, содержащую SEQ ID NO:12, и H-CDR3, содержащую SEQ ID NO:52, и
 - 2) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащую SEQ ID NO:98, L-CDR2, содержащую SEQ ID NO:116, и L-CDR3, содержащую SEQ ID NO:135.

5. Биспецифичное антитело по п.4, где:
- VH антитела против IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента содержит каркасную область (H-FR) 1, содержащую SEQ ID NO:81, H-FR2, содержащую SEQ ID NO:86, H-FR3, содержащую SEQ ID NO:88, и H-FR4, содержащую SEQ ID NO:92, или
 - VL антитела против IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента содержит каркасную область (L-FR) 1, содержащую SEQ ID NO:162, L-FR2, содержащую SEQ ID NO:165, L-FR3, содержащую SEQ ID NO:167, и L-FR4, содержащую SEQ ID NO:170.
6. Биспецифичное антитело по п.4, где VH и VL антитела против IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента содержат SEQ ID NO:177 и 296 соответственно.
7. Биспецифичное антитело против α -syn/против IGF1R, содержащее:
- антитело против альфа-синуклеина (α -syn) или его антигенсвязывающий фрагмент и
 - антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:
 - вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую SEQ ID NO:1, H-CDR2, содержащую SEQ ID NO:12, и H-CDR3, содержащую SEQ ID NO:52, и
 - вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащую SEQ ID NO:98, L-CDR2, содержащую SEQ ID NO:116, и L-CDR3, содержащую SEQ ID NO:151.
8. Биспецифичное антитело по п.7, где:
- VH антитела против IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента содержит каркасную область (H-FR) 1, содержащую SEQ ID NO:81, H-FR2, содержащую SEQ ID NO:86, H-FR3, расположенную между H-CDR2 и H-CDR3, содержащую SEQ ID NO:88, и H-FR4, содержащую SEQ ID NO:92, или
 - VL антитела против IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента содержит каркасную область (L-FR) 1, содержащую SEQ ID NO:162, L-FR2, содержащую SEQ ID NO:165, L-FR3, содержащую SEQ ID NO:167, и L-FR4, содержащую SEQ ID NO:170.
9. Биспецифичное антитело по п.7, где VH и VL антитела против IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента содержат SEQ ID NO:219 и 338 соответственно.
10. Биспецифичное антитело по любому из пп.1-9, где антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с белком IGF1R млекопитающих, включая IGF1R человека, IGF1R обезьяны, IGF1R крысы и IGF1R мыши.
11. Биспецифичное антитело по любому из пп.1-10, где сайт связывания антитела против IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента содержит по меньшей мере одно из V397, W434, D435, Y460, C488, L641, R650, Y775, P776, F778, E779, S791, L798, H808, E809 и L813 в белке, содержащем SEQ ID NO:410.
12. Биспецифичное антитело по п.11, где антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с одним сайтом связывания, выбранным из сайтов связывания 1-3 в белке, содержащем SEQ ID NO:410, где
- сайт связывания 1 содержит по меньшей мере одно из R650, Y775, P776, F778, E779, S791 и L798,
 - сайт связывания 2 содержит по меньшей мере одно из L641, H808, E809 и L813, и
 - сайт связывания 3 содержит по меньшей мере одно из V397, W434, D435, Y460 и C488.
13. Биспецифичное антитело по любому из пп.1-12, где антигенсвязывающий фрагмент антитела против IGF1R представляет собой scFv.
14. Биспецифичное антитело по п.13, содержащее scFv против IGF1R, содержащий, от N-конца к C-концу, SEQ ID NO:341, SEQ ID NO:411 и SEQ ID NO:222.
15. Биспецифичное антитело по любому из пп.1-14, где антитело против α -syn или его антигенсвязывающий фрагмент содержит
- H-CDR1, содержащую SEQ ID NO:434,
 - H-CDR2, содержащую SEQ ID NO:435 или 436,
 - H-CDR3, содержащую SEQ ID NO:438,
 - L-CDR1, содержащую SEQ ID NO:443,
 - L-CDR2, содержащую SEQ ID NO:444, и

L-CDR3, содержащую SEQ ID NO:445.

16. Биспецифичное антитело по п.15, где указанное антитело против α -syn или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

а) VH, содержащую

H-FR1, содержащую SEQ ID NO:450,

H-FR2, содержащую SEQ ID NO:451 или 452,

H-FR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:455 и 461-464, и

H-FR4, содержащую SEQ ID NO:466 или 467;

б) VL, содержащую

L-FR1, содержащую SEQ ID NO:490 или 491,

L-FR2, содержащую SEQ ID NO:492 или 494,

L-FR3, содержащую SEQ ID NO:498 или 500, и

L-FR4, содержащую SEQ ID NO:501 или 503; или

в) (а) и (б).

17. Биспецифичное антитело по п.15, где антитело против α -syn или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:525 и 531-534, и VL, содержащую SEQ ID NO:546 или 548.

18. Биспецифичное антитело по п.15, где антитело против α -syn или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:560-564, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:566 или 567.

19. Биспецифичное антитело по любому из пп.1-18, где антитело против α -syn или его антигенсвязывающий фрагмент соединено с антителом против IGF1R или его антигенсвязывающим фрагментом через линкер, возможно где линкер представляет собой пептидный линкер, содержащий SEQ ID NO:411 или 412.

20. Биспецифичное антитело по любому из пп.1-19, которое является моновалентным к IGF1R и содержит фрагмент антитела против IGF1R, соединенный с С-концом тяжелой цепи антитела против α -syn, возможно где две тяжелые цепи антитела против α -syn содержат мутации "выступ во впадину".

21. Биспецифичное антитело по п.20, содержащее первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, содержащие SEQ ID NO:614 и 589 соответственно; и две идентичные легкие цепи, содержащие SEQ ID NO:566. α

22. Биспецифичное антитело по любому из пп.1-21, где антитело против α -syn или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с агрегатом α -syn с константой диссоциации (K_D) от $0,1 \times 10^{-10}$ М до 2×10^{-10} М.

23. Биспецифичное антитело по любому из пп.1-22, где антитело против α -syn представляет собой изотип IgA, IgD, IgE, IgG или IgM.

24. Биспецифичное антитело по п.23, где антитело против α -syn представляет собой подтип изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

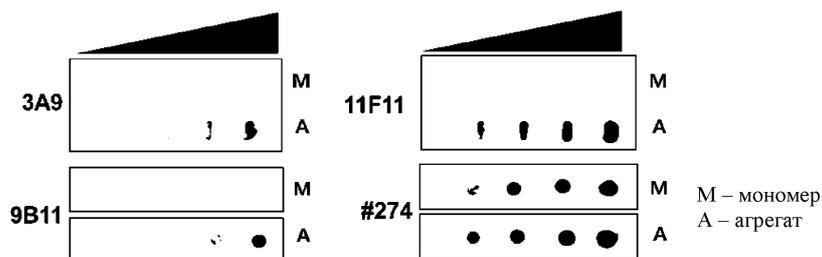
25. Биспецифичное антитело по п.24, где указанное антитело содержит мутацию M428L в Fc-области.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичное антитело по любому из пп.1-25 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

27. Нуклеиновокислотная молекула, кодирующая биспецифичное антитело по любому из пп.1-25.

28. Способ лечения или предупреждения α -синуклеинопатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту биспецифичного антитела по любому из пп.1-25.

29. Способ по п.28, где α -синуклеинопатия выбрана из болезни Паркинсона, деменции при болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви, сочетания болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона, мультисистемной атрофии.

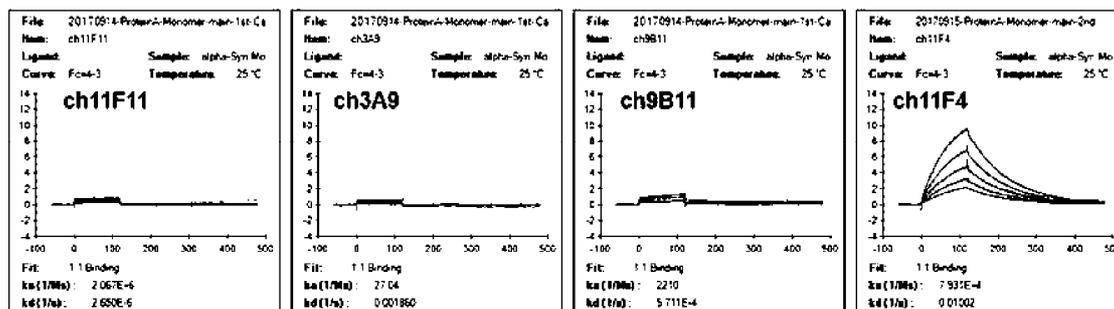


Фиг. 1

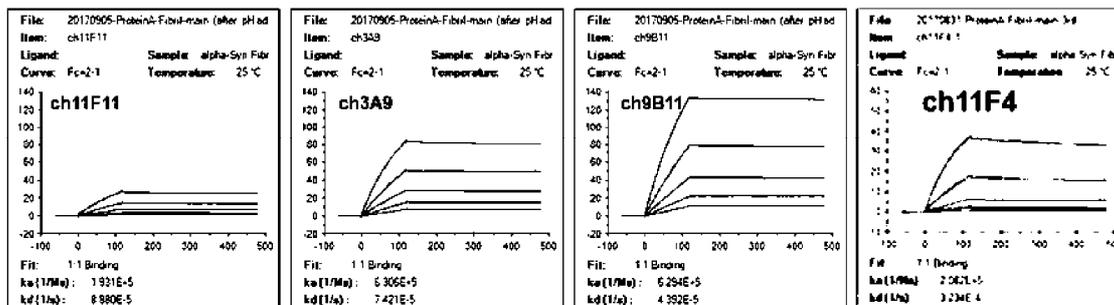
Клоны	EC ₅₀ (нг/мл)		EC ₅₀ (нМ)	
	Мономеры	Фибриллы	Мономеры	Фибриллы
3A9	–	319,4	–	2,129
9B11	–	184,9	–	1,233
11F11	–	326,5	–	2,177

Фиг. 2

Сенсограммы с мономерами



Сенсограммы с фибриллами

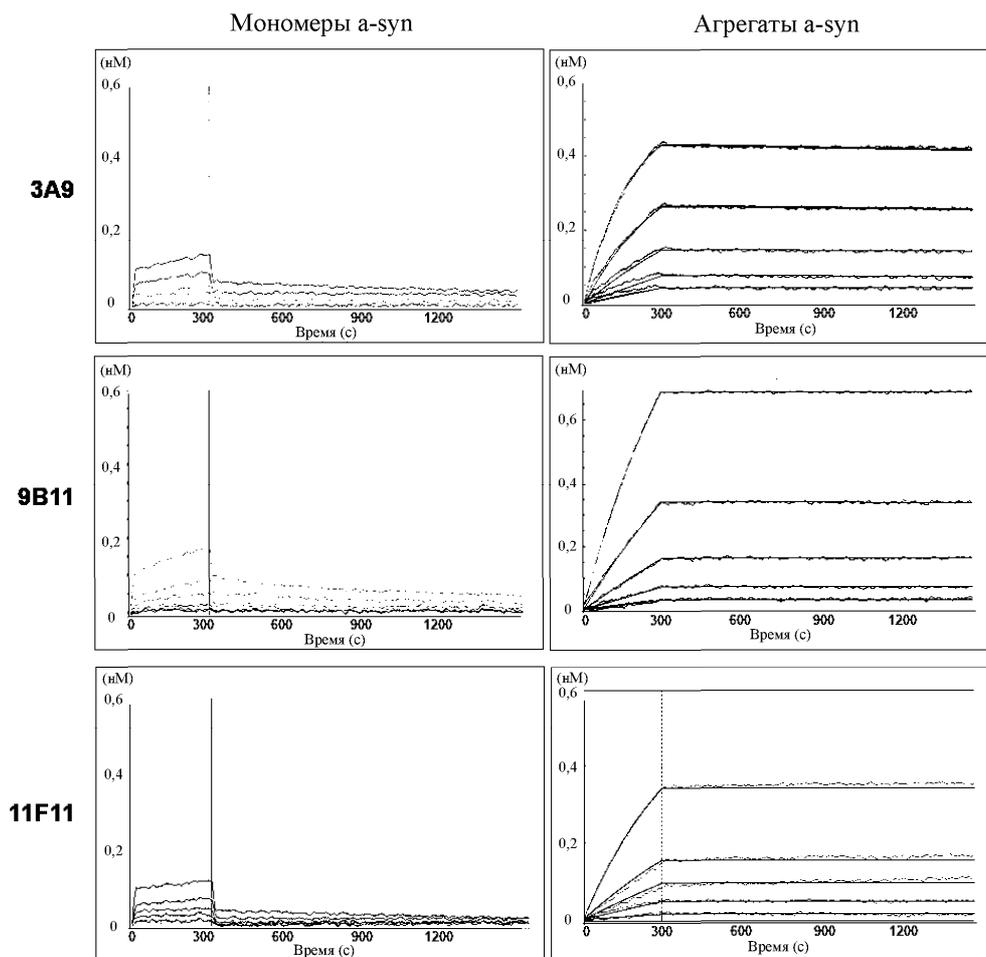


Фиг. 3а

Клоны	K _D (M, x 10 ⁻⁹)	
	Мономеры	Фибриллы
3A9	–	1,320
9B11	–	0,904
11F11	–	2,873

«–» — проанализировано, но недоступно

Фиг. 3b

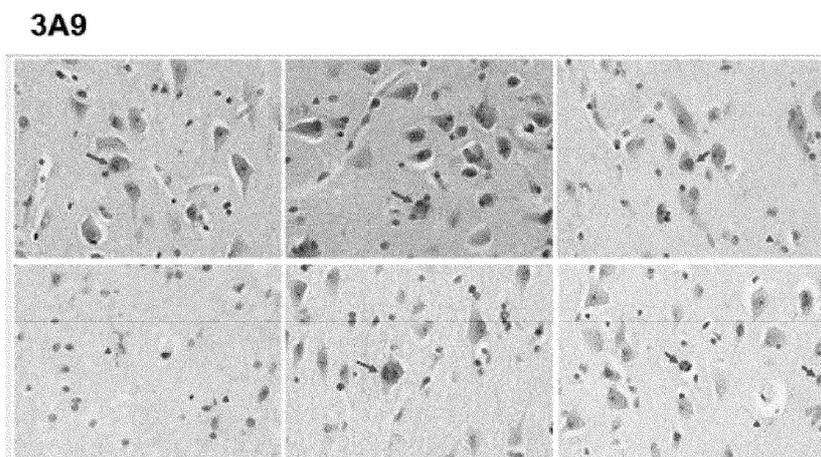


Фиг. 4а

Клоны	$K_D (10^{-10} \text{ M})$	
	Мономеры	Фибриллы
3A9	—	0,13
9B11	—	0,018
11F11	—	0,16

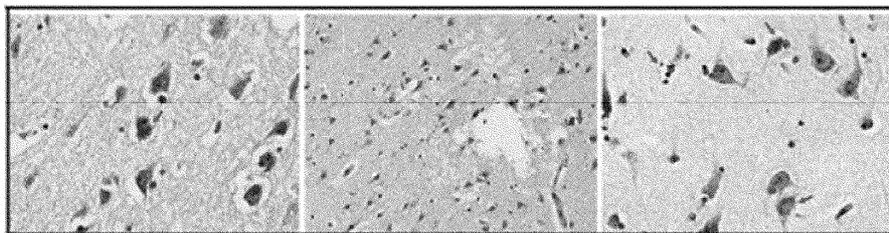
«—» — проанализировано, но недоступно

Фиг. 4b



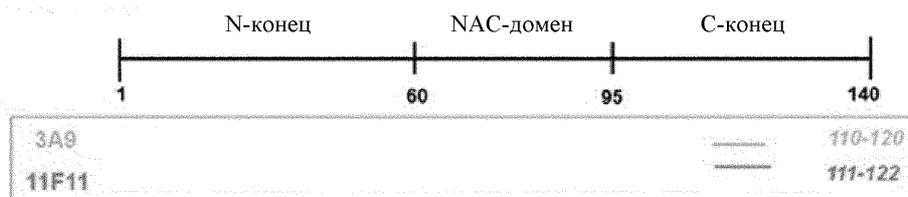
Фиг. 5а

11F11



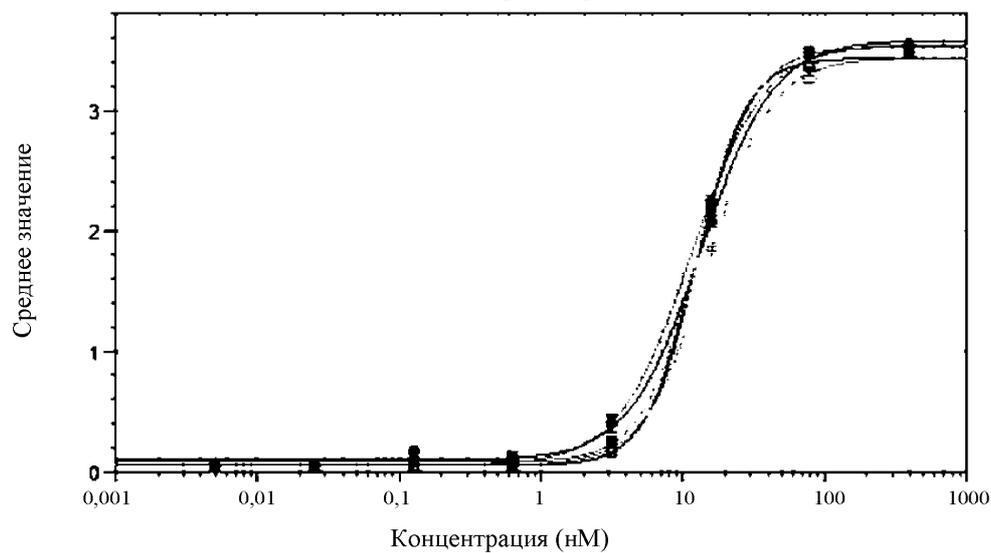
Фиг. 5b

Альфа-синуклеин



Фиг. 6

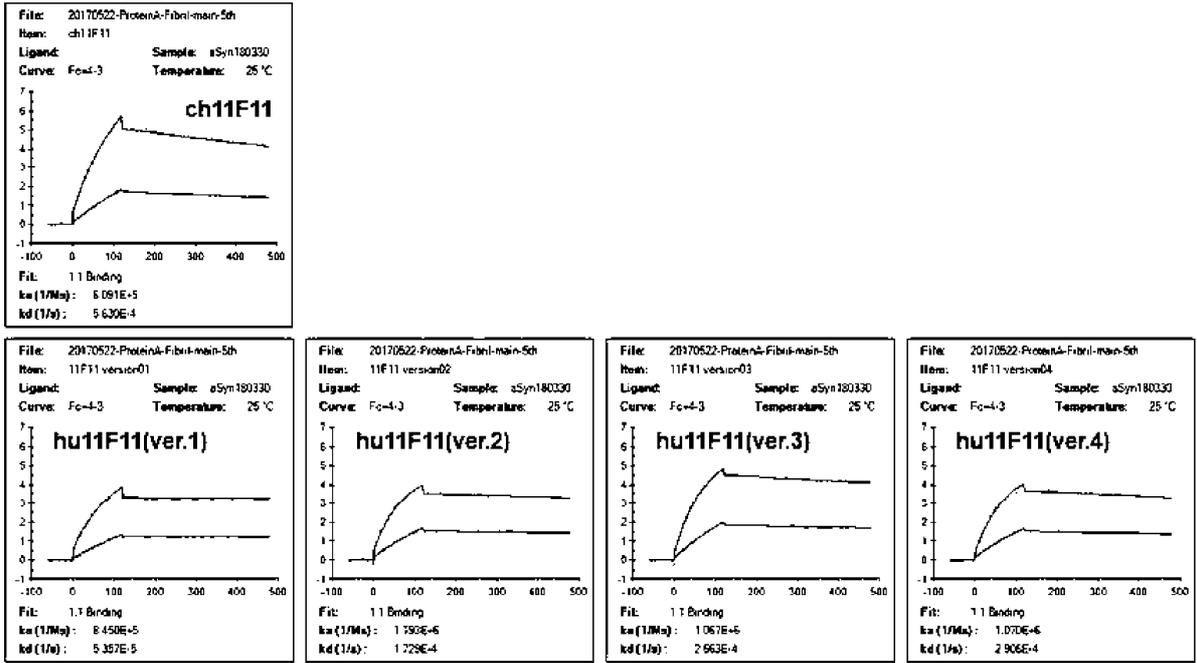
Стандартная кривая



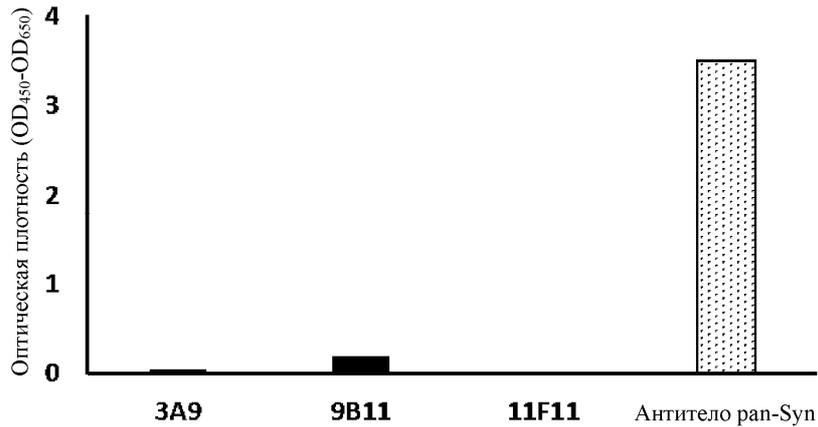
4-P Fit: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$:

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
○ Plot#1 (ch11F11(-RD)) Концентрация vs среднее зн-е	0.0493	2.44	12.5	3.43	1
△ Plot#3 (hu11F11(ver.1)) Концентрация vs среднее зн-е	0.0532	1.69	11.5	3.55	1
□ Plot#4 (hu11F11(ver.2)) Концентрация vs среднее зн-е	0.047	1.96	15.1	3.43	1
● Plot#5 (hu11F11(ver.3)) Концентрация vs среднее зн-е	0.0958	1.71	13.4	3.58	0.999
■ Plot#6 (hu11F11(ver.4)) Концентрация vs среднее зн-е	0.0791	2.18	12.9	3.52	1

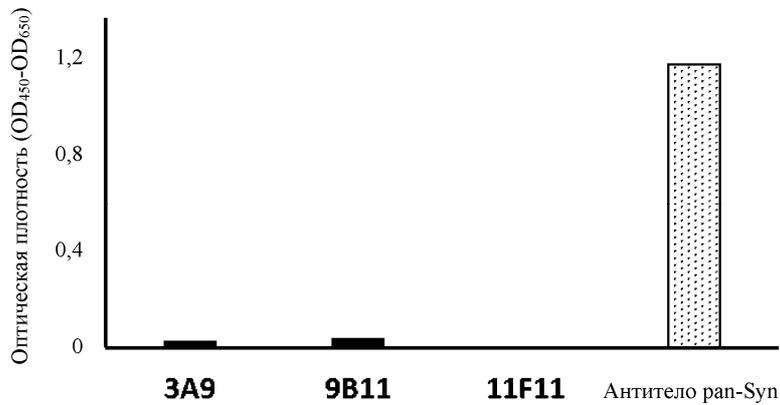
Фиг. 7



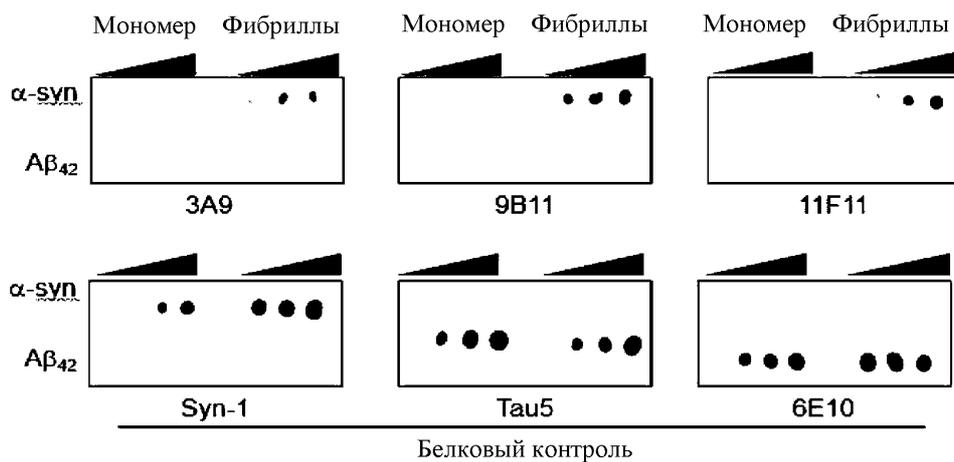
Фиг. 8



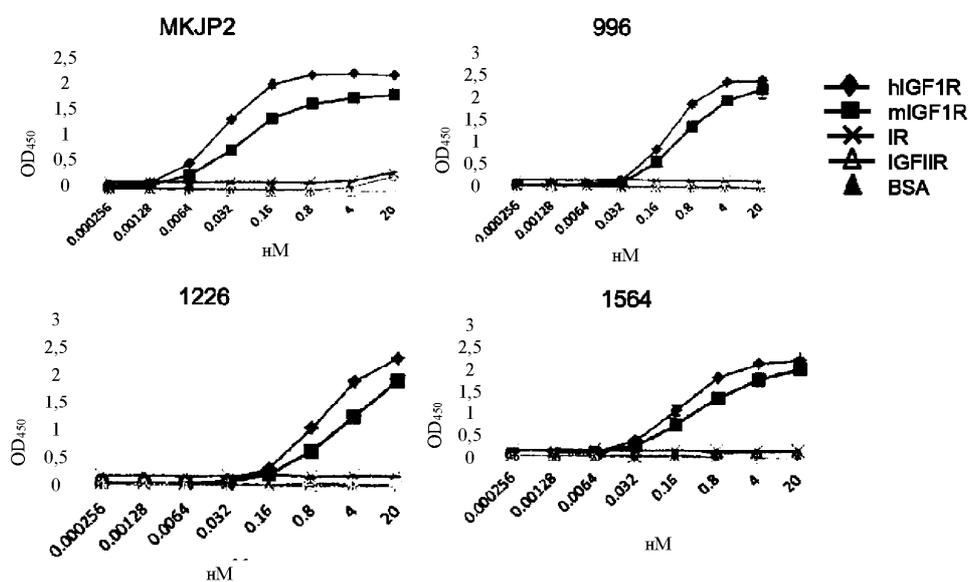
Фиг. 9a



Фиг. 9b

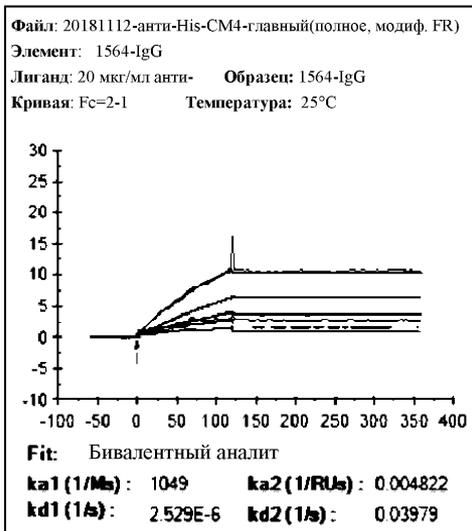
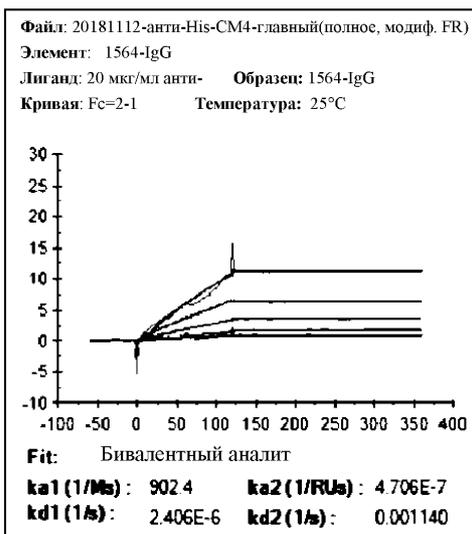


Фиг. 10

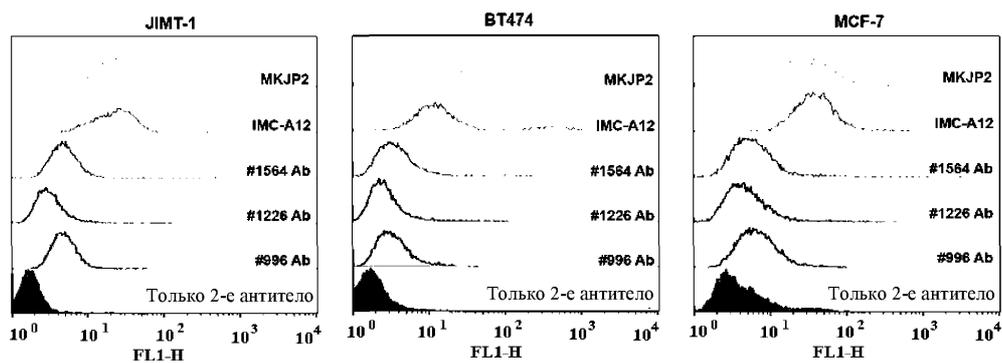


Фиг. 11а

1564 IgG



Фиг. 11b

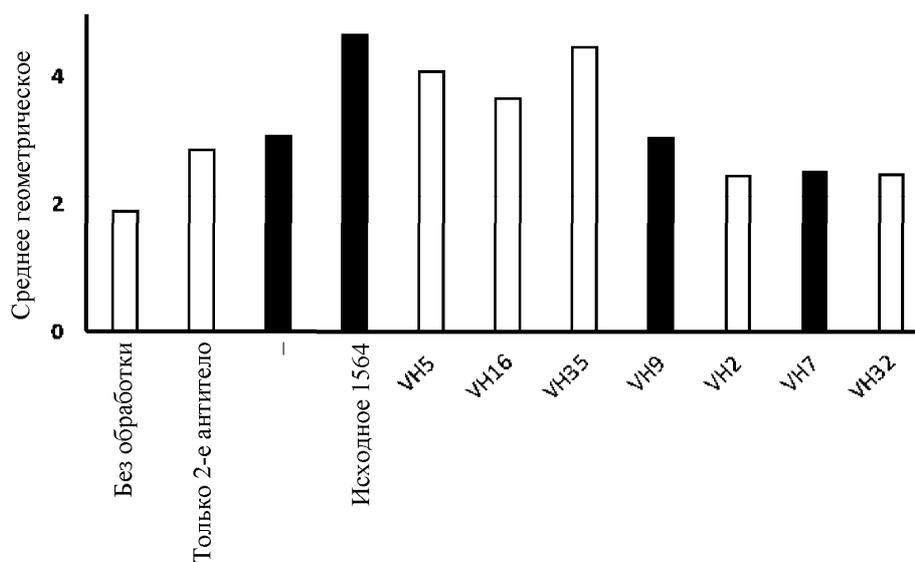


Название образца	MFI		
	JIMT-1	BT474	MCF7
Без обработки	1,36	1,8	2,51
Только 2-е антитело	1,89	1,93	4,53
#996 Ab	5,03	3,51	7,07
#1226 Ab	3,50	3,01	5,60
#1564 Ab	5,16	3,95	6,34
IMC-A12	22,99	18,34	40,08
MKJP2	20,67	16,43	26,67

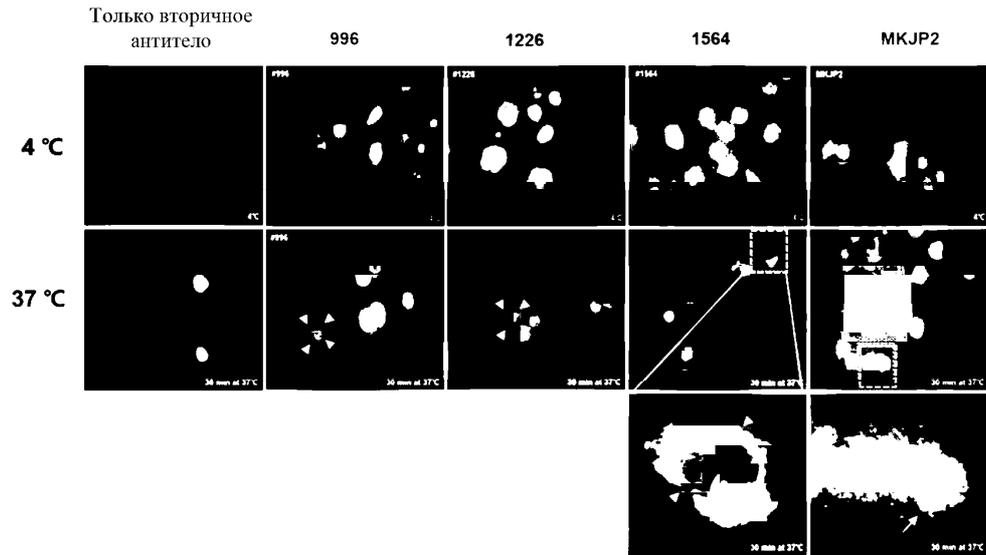
Фиг. 12a

Образцы	MFI
Только вторичное антитело	3,20
ch11F11	3,26
ch11F11-1564	4,37
1564 IgG	7,55

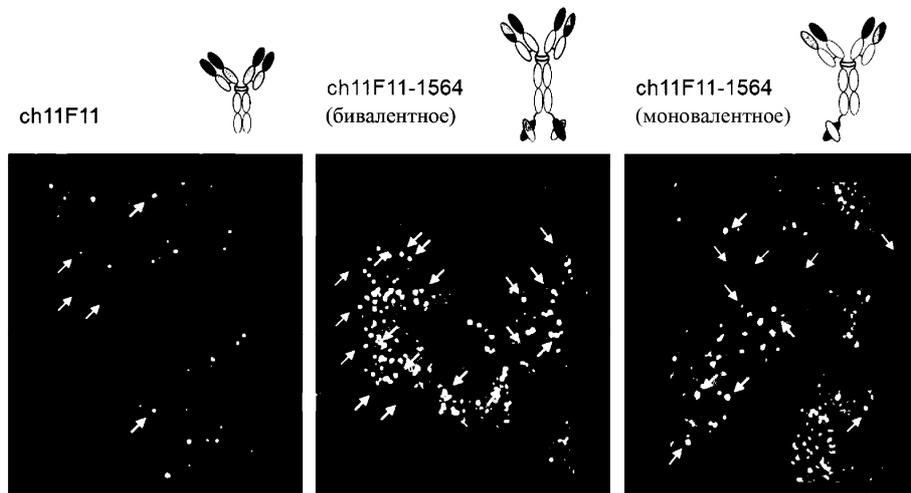
Фиг. 12b



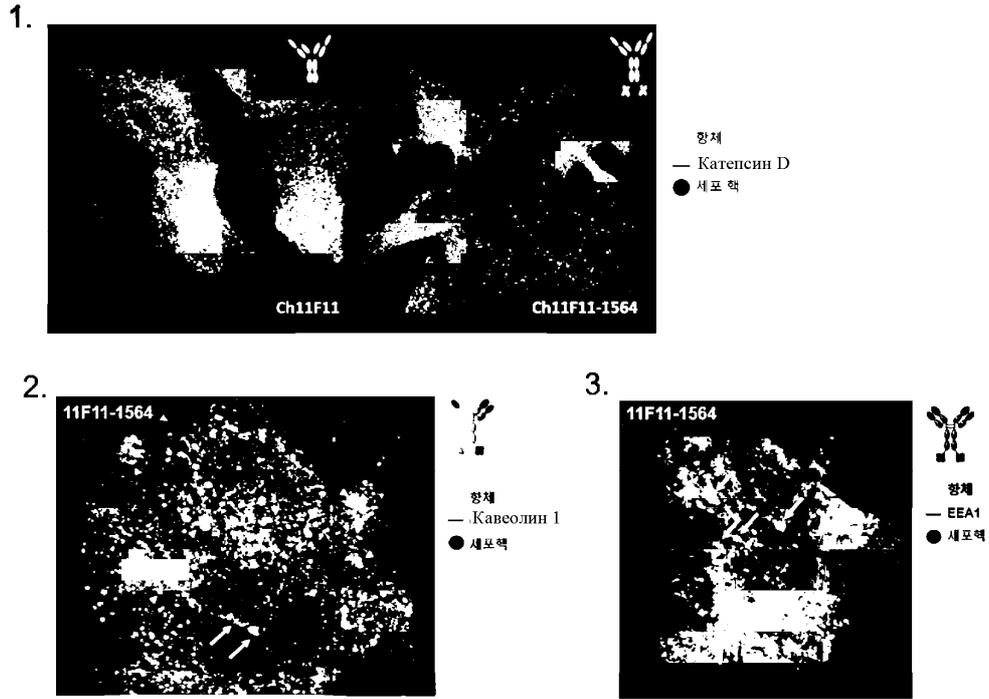
Фиг. 12c



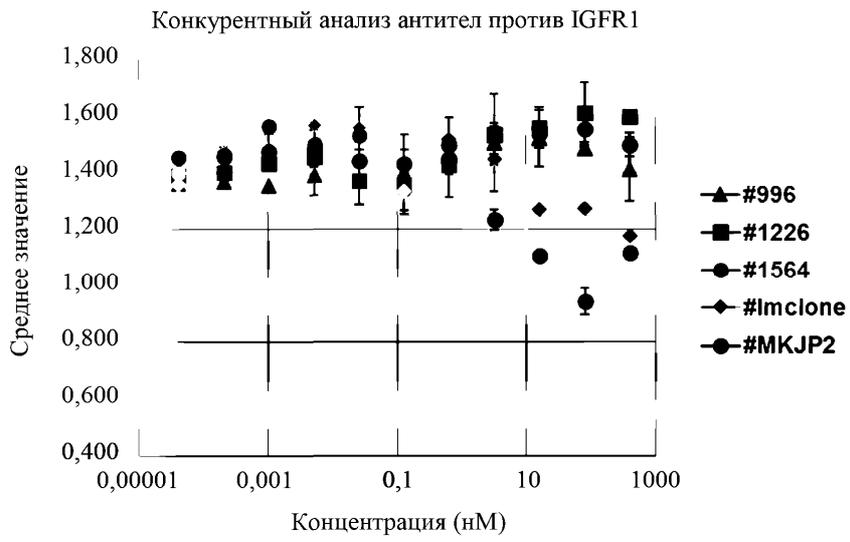
Фиг. 13а



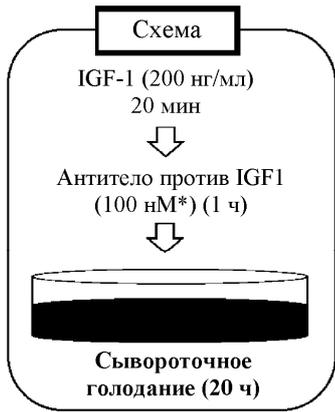
Фиг. 13б



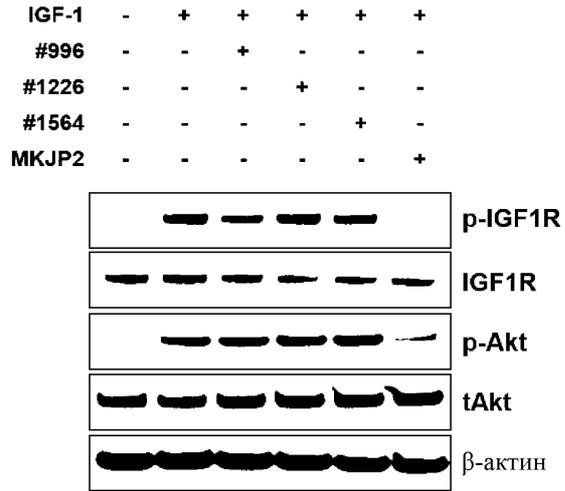
Фиг. 13с



Фиг. 14а



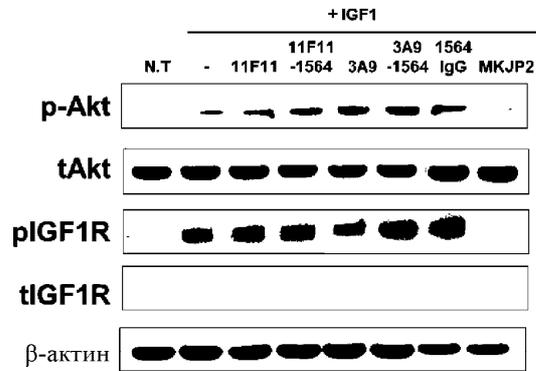
*Концентрация антител (100нМ):
#996, #1226, #1564 (scFv-Fc, 10 мкг/мл),
МКЖР2 (IgG, 15 мкг/мл)



Фиг. 14b



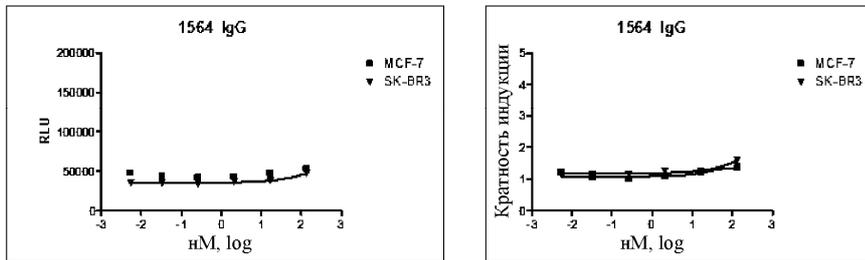
*Концентрация антител (100нМ):
IgG (15 мкг/мл), IgG-scFv (20 мкг/мл)



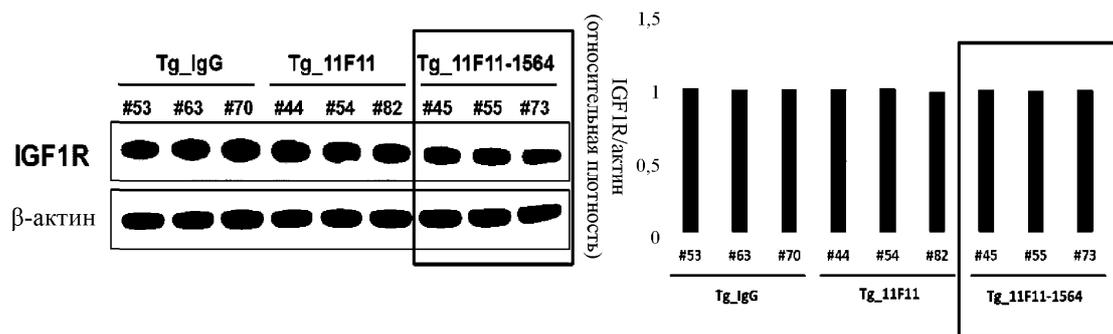
Фиг. 14c

Остов ch11F11, ch3A9

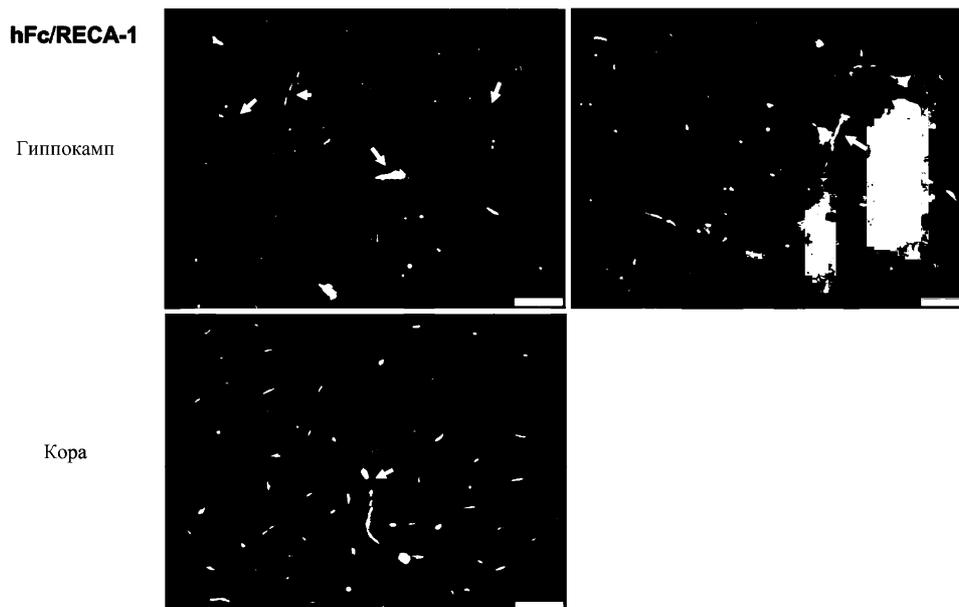
- MCF-7: высокая экспрессия IGF1R
- SK-BR3: экспрессия IGF1R



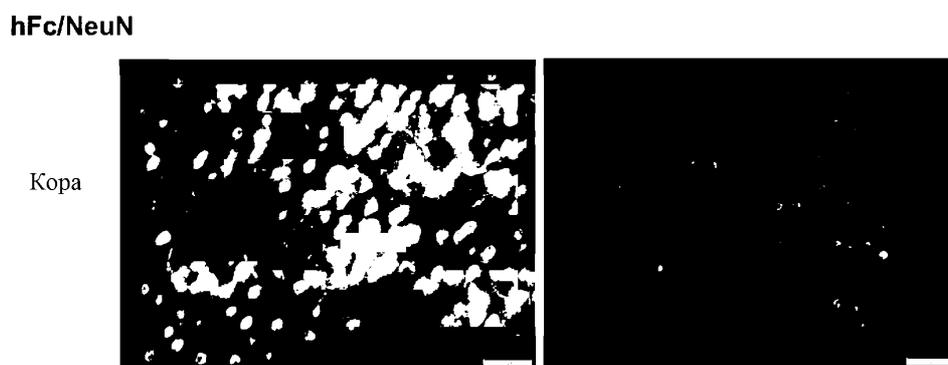
Фиг. 15a



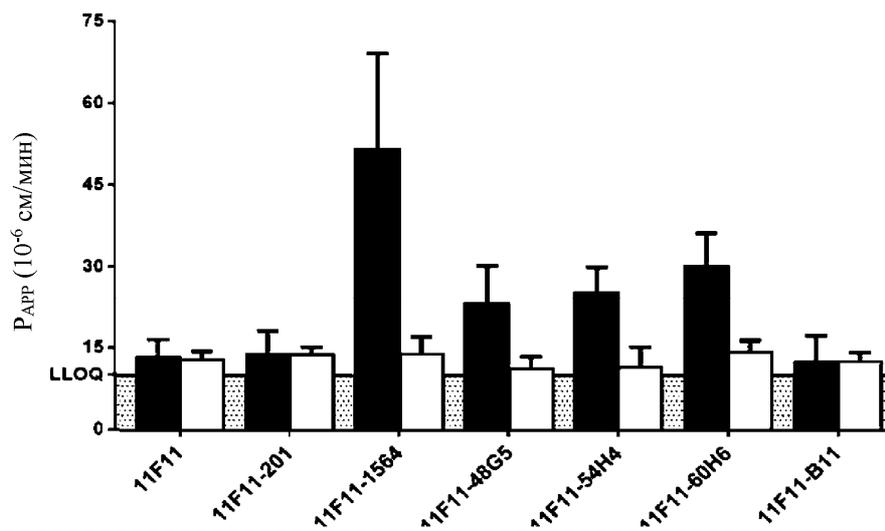
Фиг. 15b



Фиг. 15с-1

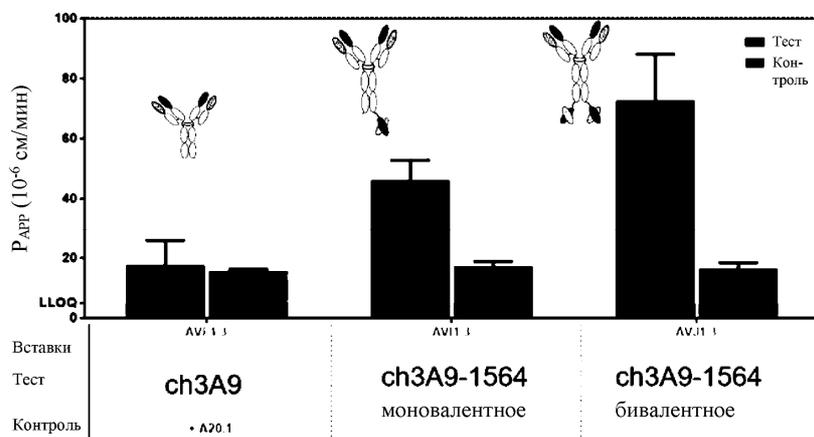


Фиг. 15с-2

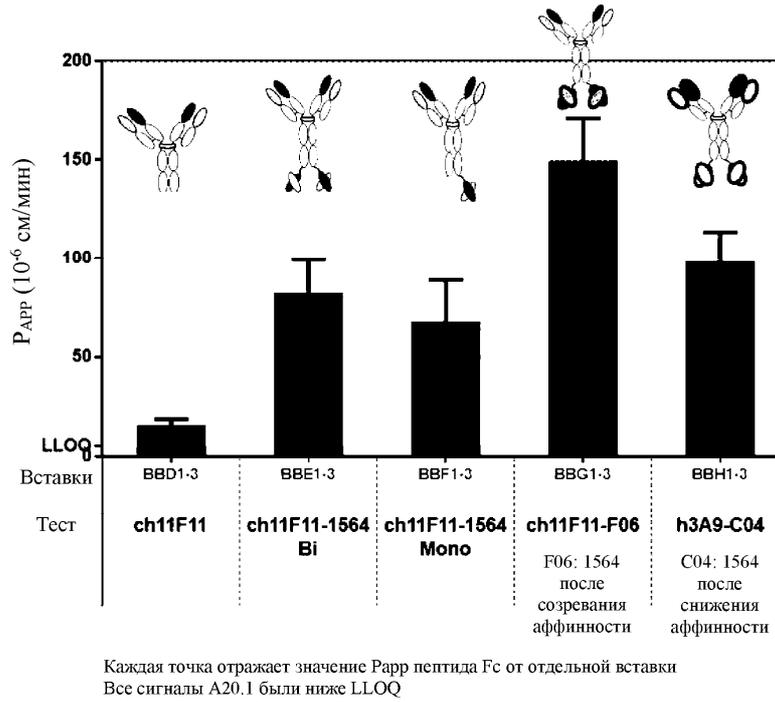


*201: Биоаналог Герцептина

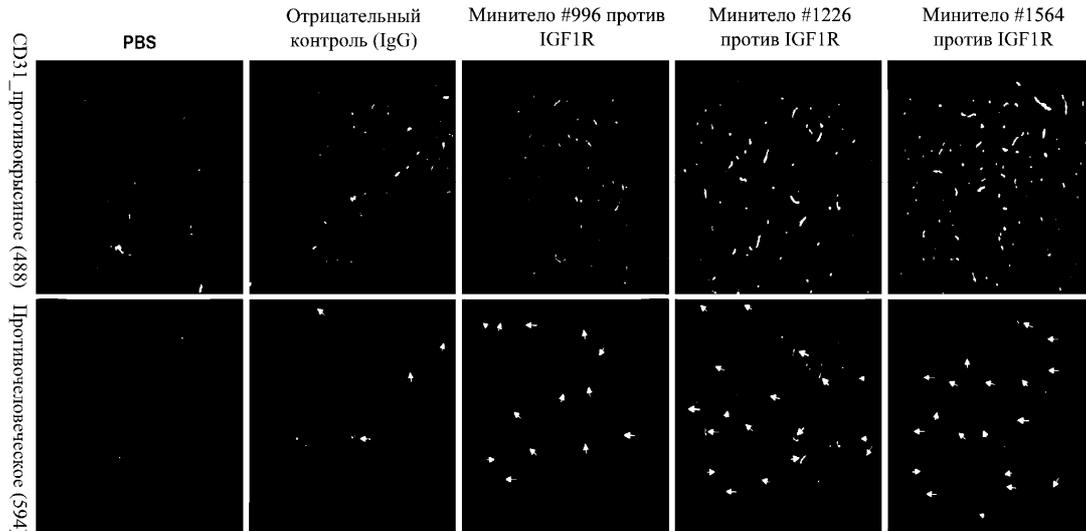
Фиг. 16а



Фиг. 16б

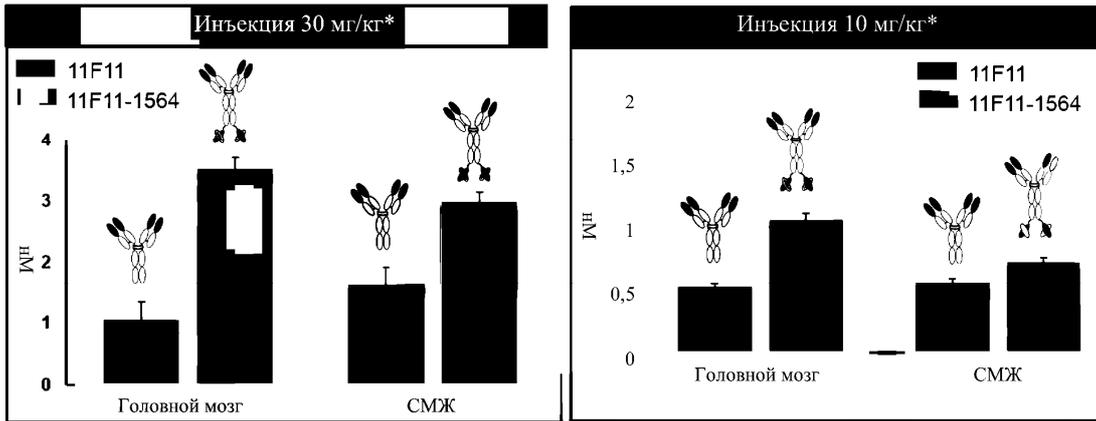


Фиг. 16с

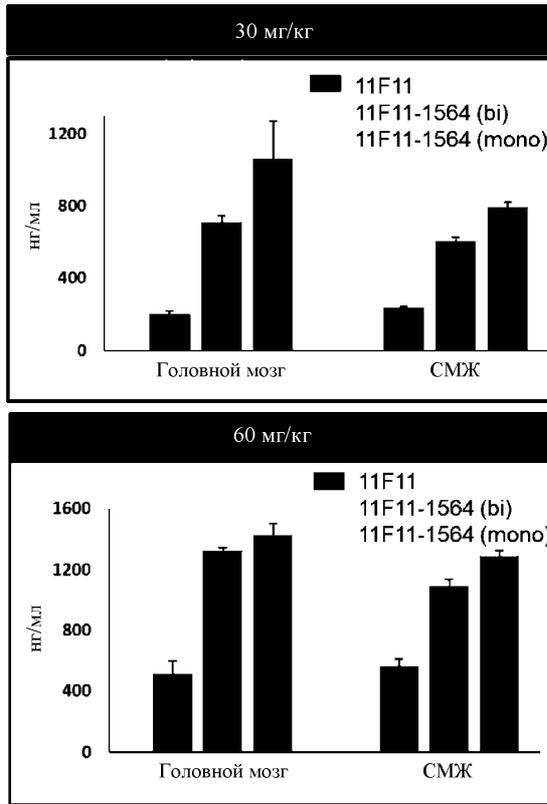


Фиксированные срезы головного мозга; CD31: маркер сосудов (зеленый); маркер антител (красный)

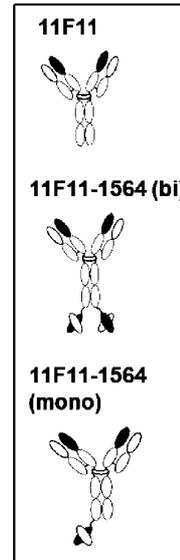
Фиг. 17а

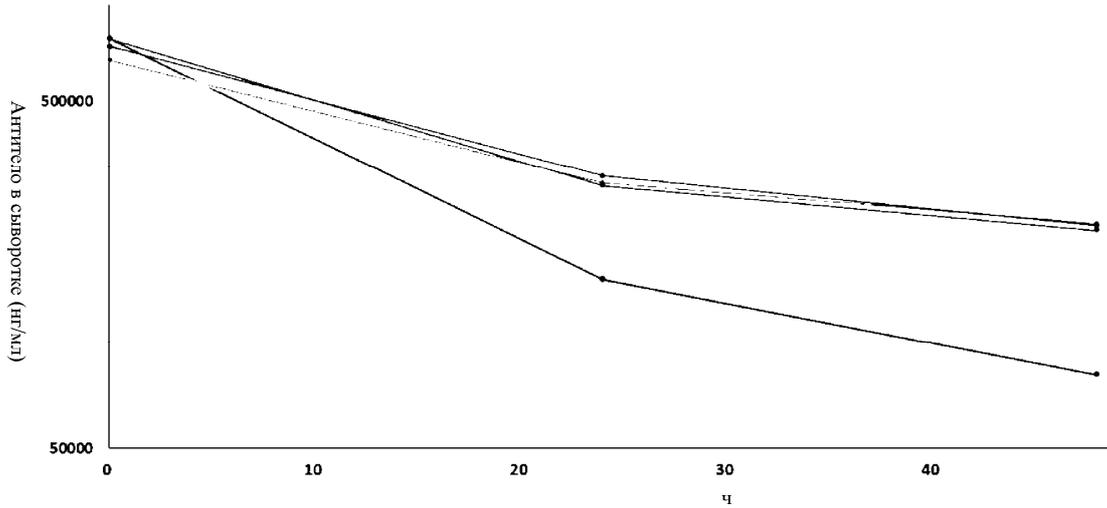


Фиг. 17b



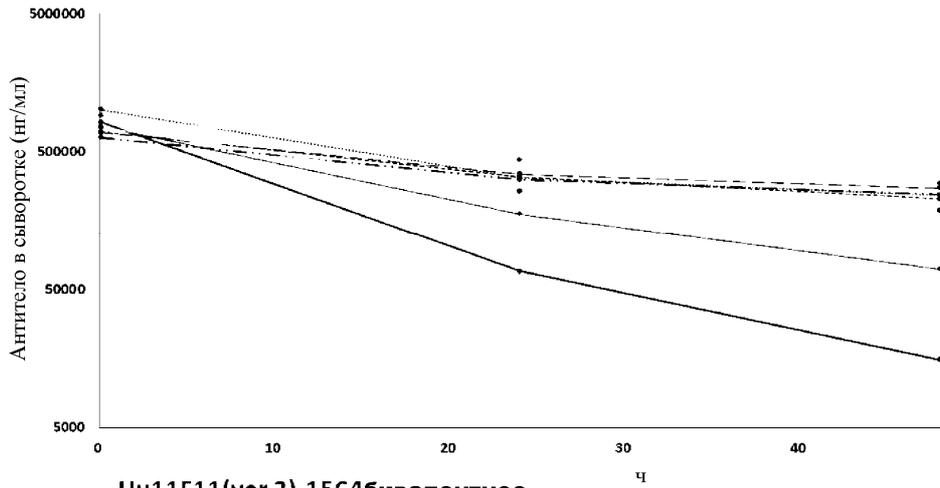
Фиг. 17с





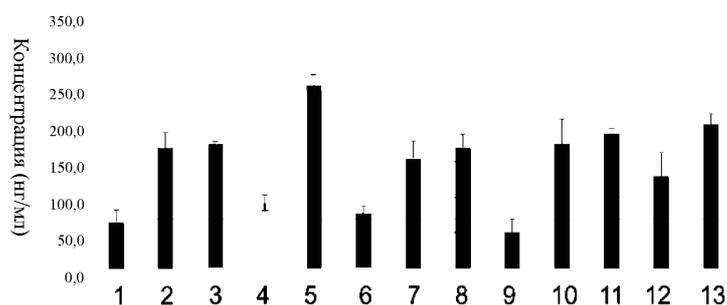
ch11F11-1564 бивалентное
 ch11F11-1564 моновалентное
 ch11F11-C04 моновалентное
 ch11F11-F06 бивалентное
 ch11F11-F06 моновалентное

Фиг. 17d-1



Nu11F11(ver.2)-1564 бивалентное
 Nu11F11(ver.2)-VH5 бивалентное
 Nu11F11(ver.2)-VH16 бивалентное
 Nu11F11(ver.2)-VH35 бивалентное
 Nu11F11(ver.2)-VH9 бивалентное
 Nu11F11(ver.2)-VH2 бивалентное
 бивалентное
 Nu11F11(ver.2)-VH32 бивалентное

Фиг. 17d-2



Клоны	
1	ch11F11-1564 бивалентное
2	ch11F11-1564 моновалентное
3	ch11F11-C04 моновалентное
4	ch11F11-F06 бивалентное
5	ch11F11-F06 моновалентное
6	hu11F11(ver.2)-1564 бивалент
7	hu11F11(ver.2)-VH5 бивалент
8	hu11F11(ver.2)-VH16 бивалент
9	hu11F11(ver.2)-VH35 бивалент
10	hu11F11(ver.2)-VH9 бивалент
11	hu11F11(ver.2)-VH2 бивалент
12	hu11F11(ver.2)-VH7 бивалент
13	hu11F11(ver.2)-VH32 бивалент

Фиг. 17е

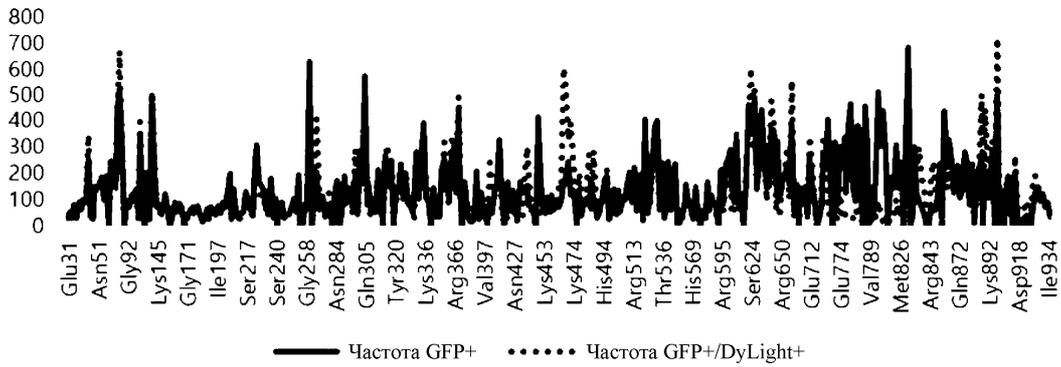
Антитело 1564	Сайт	Температура (4°C)	Модификация	% содержания
LCDR1	scFv (483-511)	4	Без модификаций	99,2
			Дезамидирование	0,8
LCDR1	scFv (483-511)	40	Без модификаций	99,0
			Дезамидирование	1,0
LCDR2	scFv (512-527)	4	Без модификаций	84,7
			Дезамидирование	15,3
LCDR2	scFv (512-527)	40	Без модификаций	83,1
			Дезамидирование	16,9
LCDR3	scFv (546-571)	4	Без модификаций	95,4
			Дезамидирование	4,6
LCDR3	scFv (546-571)	40	Без модификаций	90,2
			Дезамидирование	9,8
HCDR2	scFv (639-660)	4	Без модификаций	55,8
			Дезамидирование	44,2
HCDR2	scFv (639-660)	40	Без модификаций	52,7
			Дезамидирование	47,3
Каркасная область 1564	scFv (672-682)	4	Без модификаций	95,6
			Дезамидирование	4,4
Каркасная область 1564	scFv (672-682)	40	Без модификаций	95,7
			Дезамидирование	4,3

Фиг. 18а

CDR (остаток, пептид)	Мутанты
LCDR2 (N51, LLIYANSN)	N51D
LCDR3 (остаток N95a, GAWDDSLNG)	N95aK
	N95aH
	N95aR
	N95aD
HCDR2 (N54, AISYDNGNT)	N54D
	N54Q

Фиг. 18b

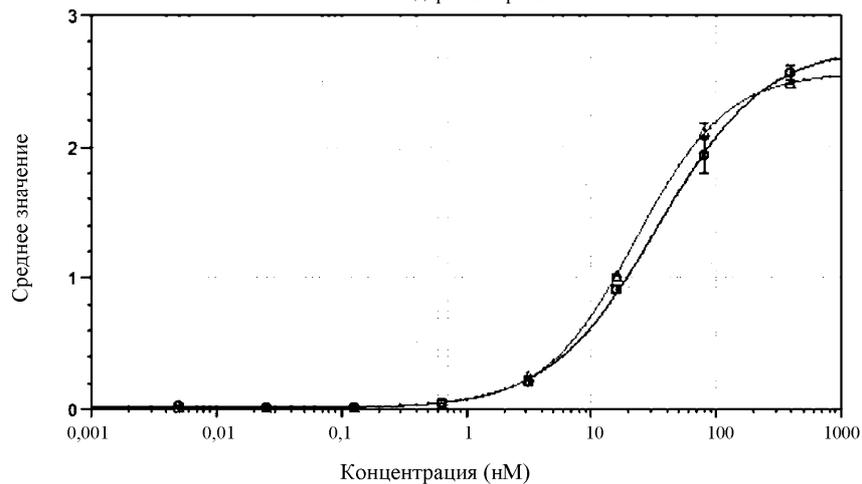
Частота вариантов IGF1R



Связывающая область клона 1564	
Внутри FN2	Y775, P776, F778, R650, S791, L798 и Glu779

Фиг. 19

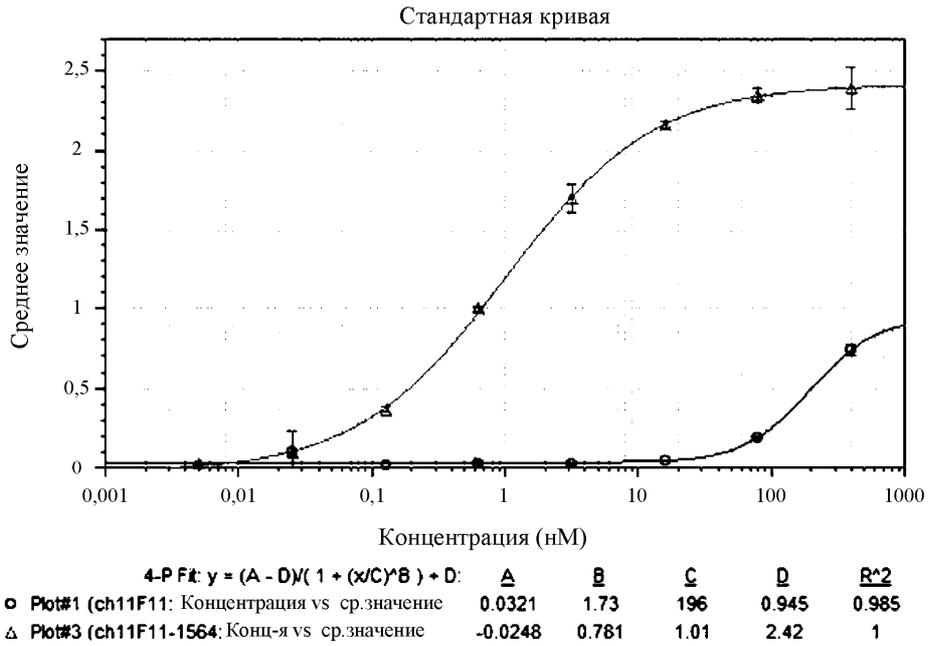
Стандартная кривая



4-P Fit: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$:					
	A	B	C	D	R ²
○ Plot#1 (ch111F11; Концентрация vs ср. значение)	0.00522	1.02	33.8	2.77	1
△ Plot#3 (ch111F11-1564; Конц-я vs ср. значение)	0.0159	1.2	22.7	2.57	1

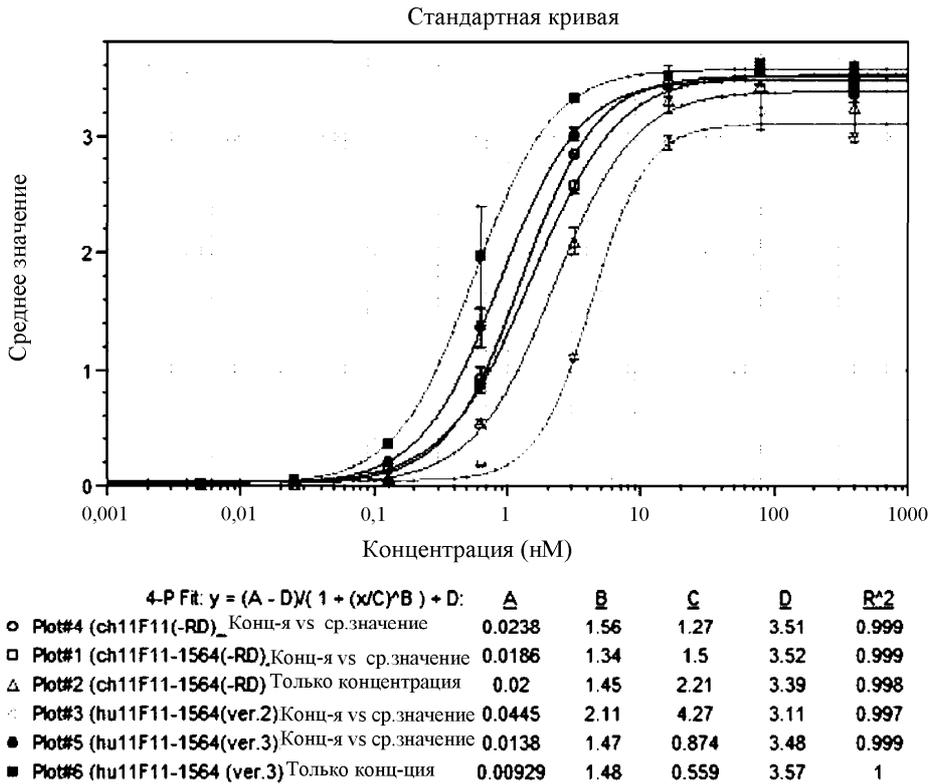
Опция подгонки по кривой – Фиксированное значение массы

Фиг. 20a



Опция подгонки по кривой – Фиксированное значение массы

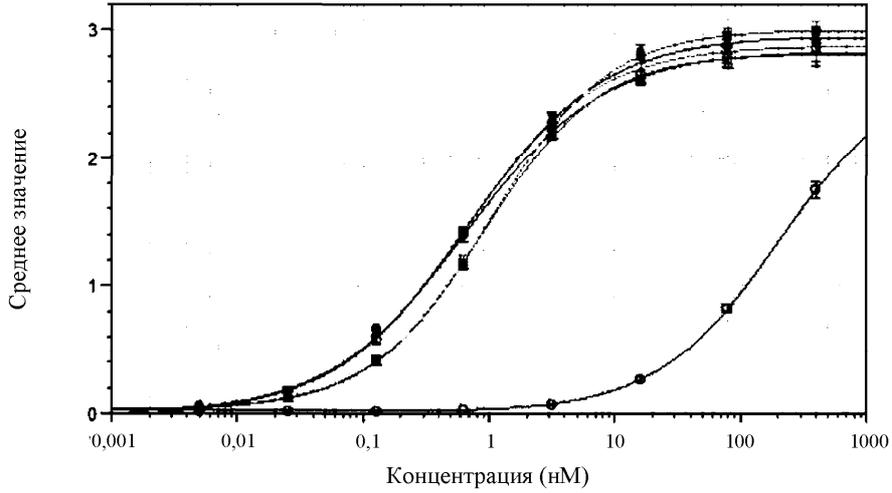
Фиг. 20b



Опция подгонки по кривой – Фиксированное значение массы

Фиг. 20c

Стандартная кривая

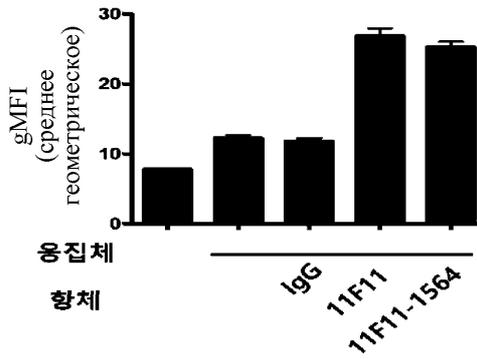


4-P Fit: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$:

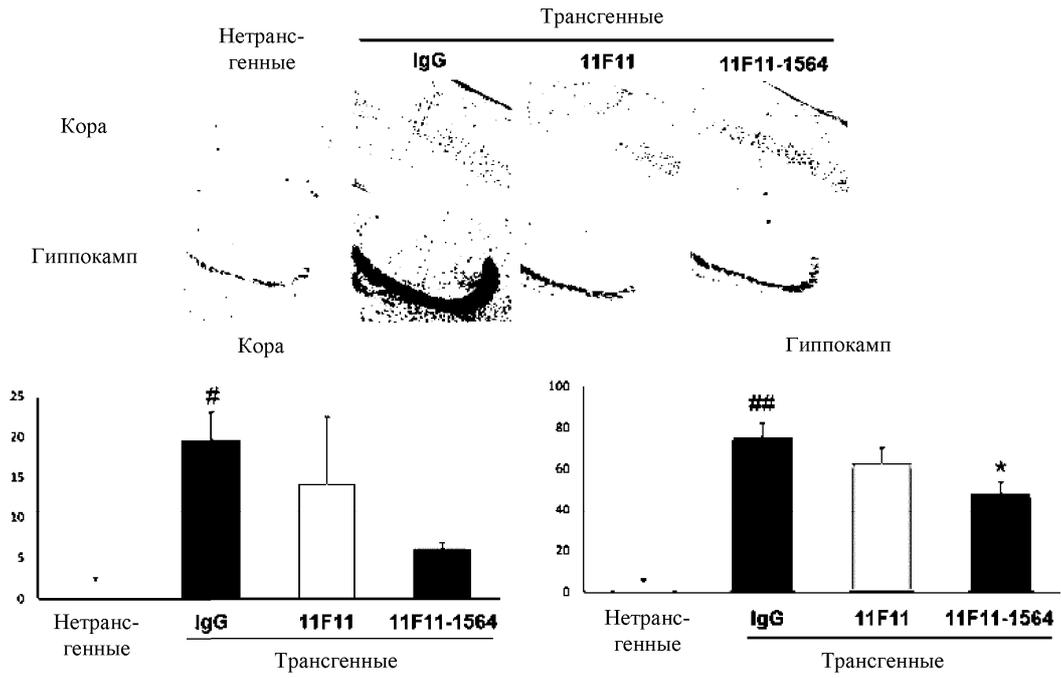
	A	B	C	D	R ²
□ Plot#4 (ch11F11(-RD)_Конц-я vs ср. значение)	0.013	0.898	201	2.68	1
□ Plot#1 (ch11F11-1564(-RD)_Конц-я vs ср. значение)	-0.0288	0.789	0.644	2.84	1
△ Plot#2 (ch11F11-1564(-RD)_Только концентрация)	0.029	0.942	0.904	2.82	0.999
Plot#3 (hu11F11-1564(ver.2)_Конц-я vs ср. знач-е)	-0.00338	0.84	0.649	2.88	1
● Plot#5 (hu11F11-1564(ver.3)_Конц-я vs ср. знач-е)	-0.00109	0.812	0.687	2.96	0.999
■ Plot#6 (hu11F11-1564 (ver.3)_Только концентрация)	0.0203	0.929	1.02	3.01	1

Опция подгонки по кривой – Фиксированное значение массы

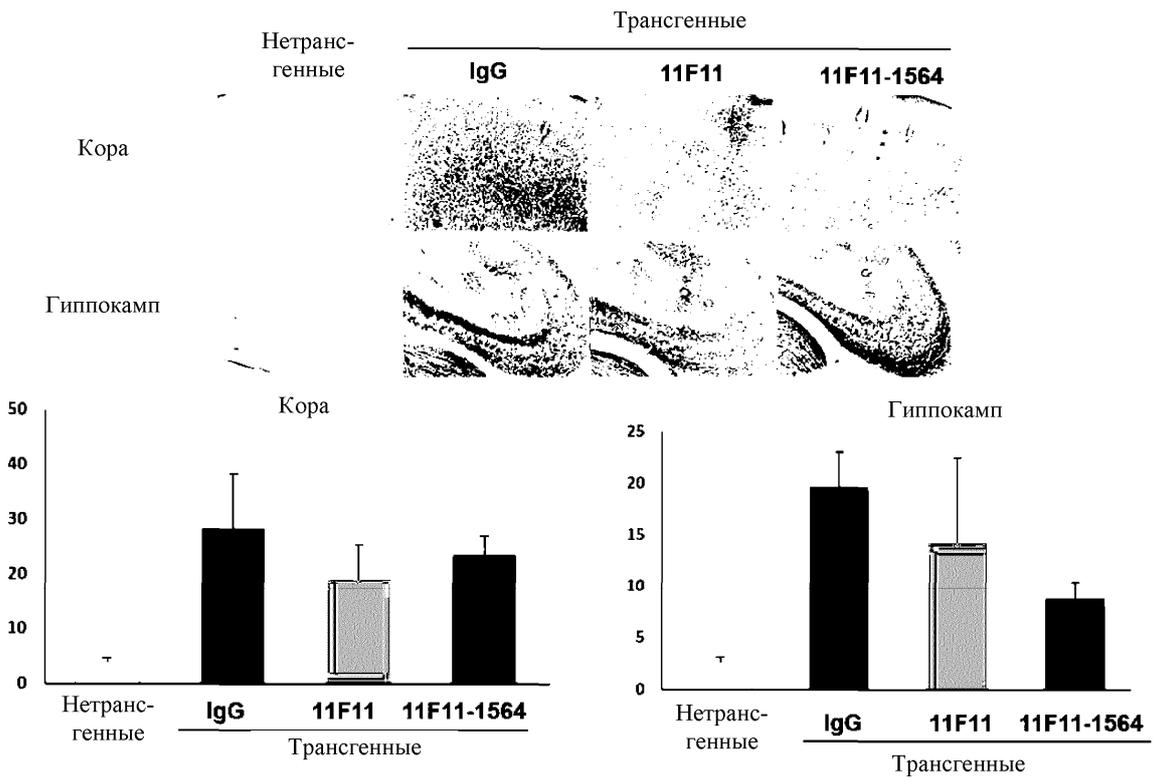
Фиг. 20d



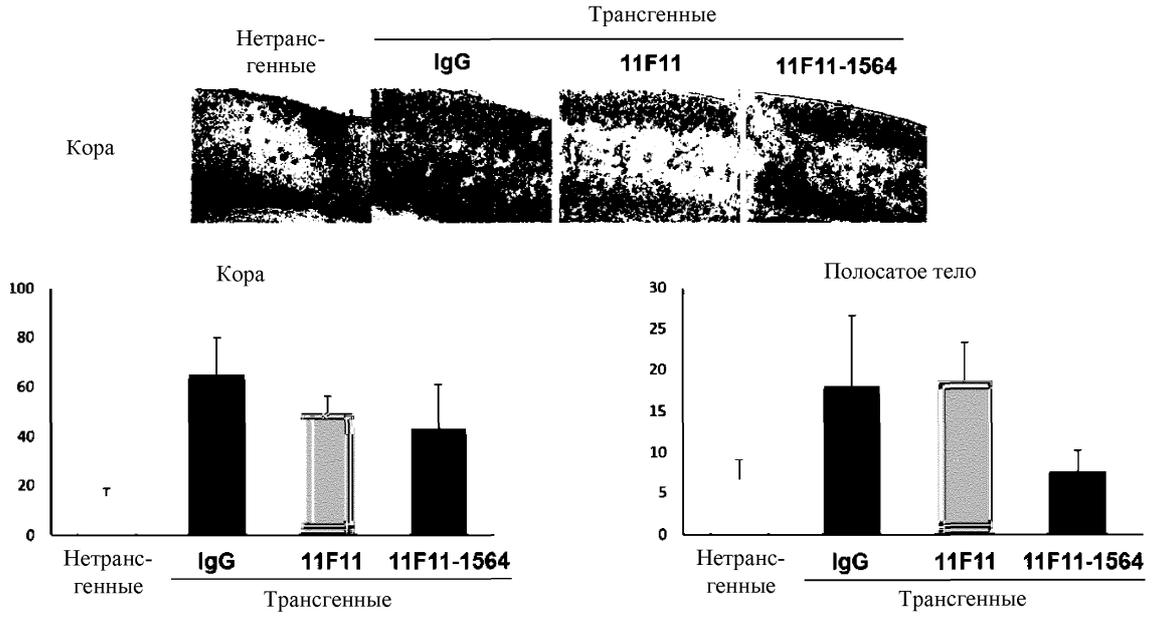
Фиг. 20e



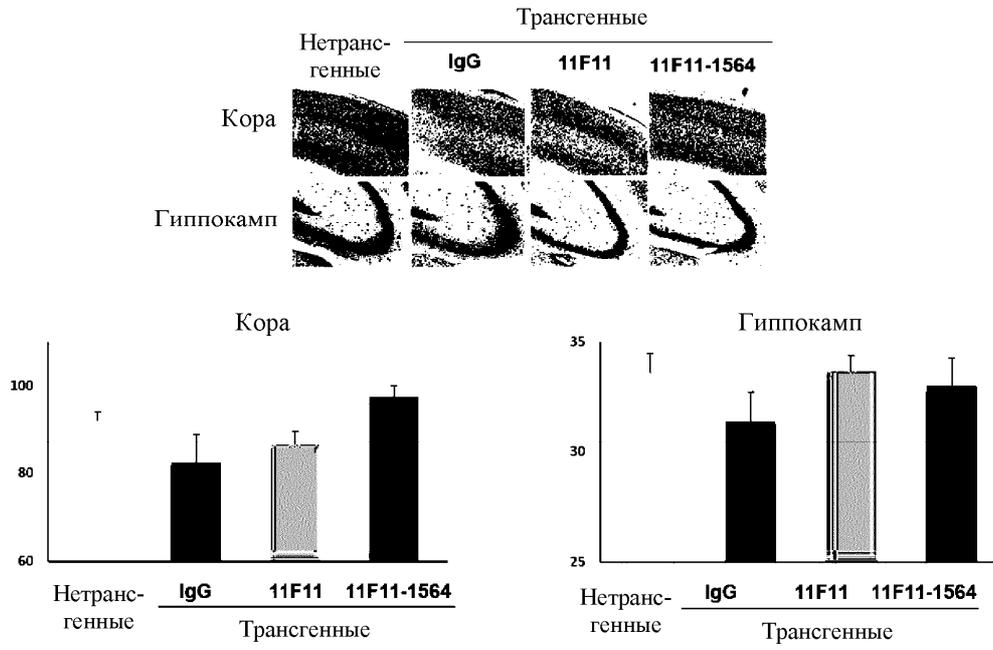
Фиг. 21а



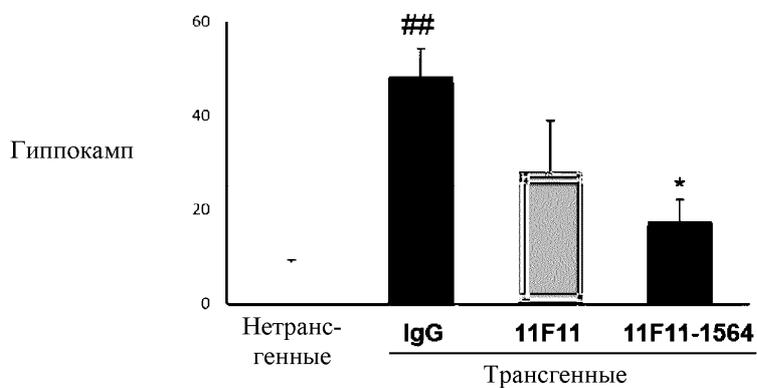
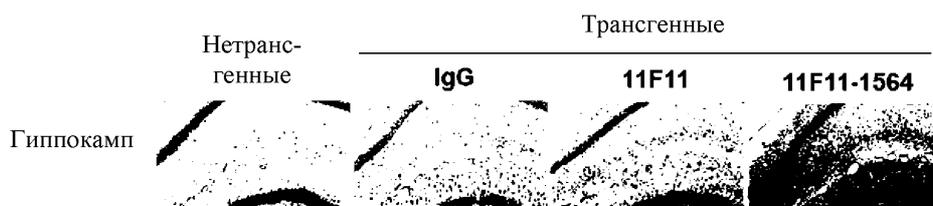
Фиг. 21б



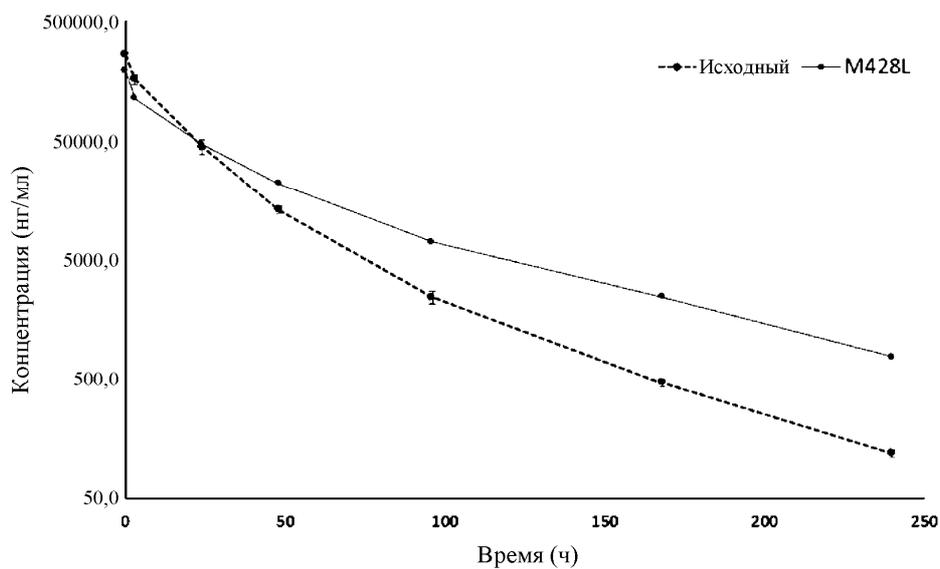
Фиг. 21c



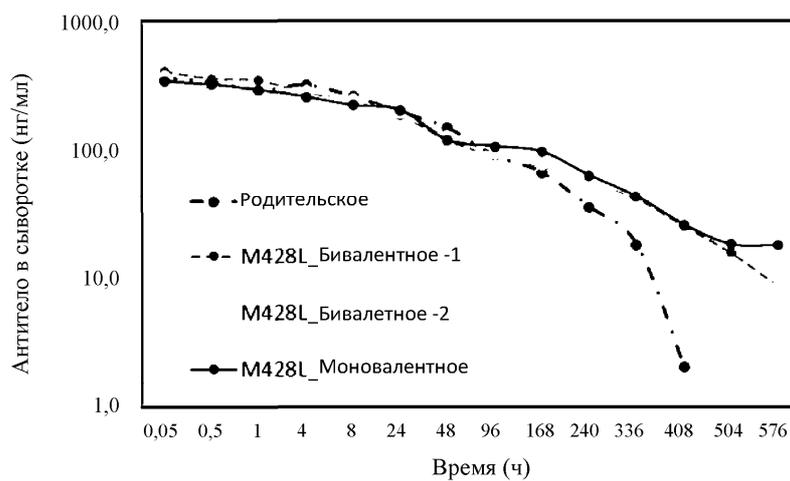
Фиг. 21d



Фиг. 21е

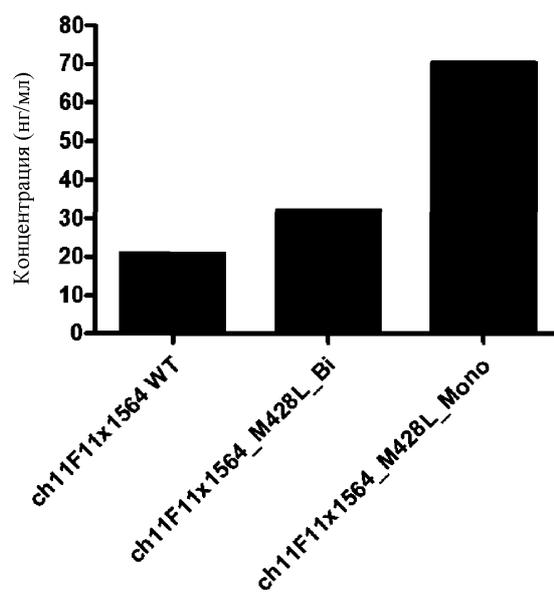


Фиг. 22а



	Период полувыведения (сутки)	Клиренс (мл/ч/кг)
Исходное	3,6	0,438
M428L_Бивалентное	5,1	0,37
M428L_Моновалентное	4,9	0,3155

Фиг. 22b

Образцы
Фиг. 22с