

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21)

202390654

(13)

A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.31

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

(22) Дата подачи заявки
2016.07.12

(54) АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С СОРТИЛИНОМ И ПОДАВЛЯЮТ СВЯЗЫВАНИЕ ПРОГРАНУЛИНА

(31) 1512215.3

(32) 2015.07.13

(33) GB

(62) 201890038; 2016.07.12

(71) Заявитель:
Х. ЛУНДБЕКК А/С (DK)

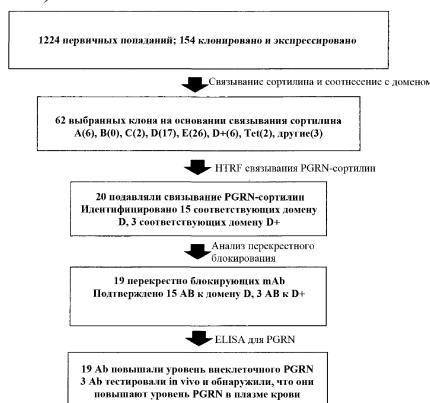
(72) Изобретатель:

Биилманн Ронн Ларс Кристиан,
Малик Ибрагим Джон, Ставенхаген
Джеффри Б., Кристенсен Сорен,
Игебьерг Ян (DK), Герритсен Арноут,
Ван Ден Бринк Эдвард, Паррен Пол,
Де Жон Роб (NL)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,
Угрюмов В.М., Джермакян Р.В. (RU)

(57) Изобретение относится к моноклональным антителам к сортилину, которые, как было обнаружено, являются применимыми при коррекции дефицитного уровня програнулина (PGRN). В частности, эти антитела можно применять при лечении лобно-височной деменции (FTD) и бокового амиотрофического склероза (ALS).



A2

202390654

202390654

A2

АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С СОРТИЛИНОМ И ПОДАВЛЯЮТ СВЯЗЫВАНИЕ ПРОГРАНУЛИНА

Область изобретения

[0001] Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам к сортилину, применимым в коррекции дефицитного уровня програнулина (PGRN). В частности эти антитела можно применять при лечении лобно-височной деменции (FTD) и бокового амиотрофического склероза (ALS). Кроме того, предполагается, что моноклональные антитела также могут быть применимы для лечения нейродегенеративных нарушений, таких как болезнь Альцгеймера (AD).

Ссылка на перечень последовательностей

[0002] Настоящая заявка содержит один или несколько перечней последовательностей в соответствии с 37 CFR 1.821 и далее, которые раскрыты на машиночитаемых носителях (название файла: 0993_ST25.txt, создан 22 июня 2016 года и имеет размер 144 кБ), при этом данный файл включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предпосылки изобретения

[0003] Сортилин представляет собой рецептор, который, как сообщалось, опосредует проапоптотические эффекты пронеуротрофинов и опосредует транспорт и сортировку нейротрофиновых рецепторов (Nykjaer et al, 2012, Trends Neurosci. 2012;35(4):261-70; Glerup et al, Handb Exp Pharmacol, 2014;220:165-89, Carlo et al, J Mol Med (Berl). 2014 Sep;92(9):905-11). Был идентифицирован ряд лигандов сортилина, в том числе нейротензин, расположение высокоафинного сайта связывания которого, как было определено с помощью рентгеновской кристаллографии, находится в молекуле сортилина в полости бета-пропеллера (Quistgaard et al, Nat Struct Mol Biol. 2009 Jan; 16(1):96-8; Quistgaard et al, Protein Sci. 2014, Sep;23(9):1291-300). Совсем недавно было показано, что сортилин функционирует как высокоафинный рецептор для фактора роста програнулина (PGRN, Hu et al. Neuron. 2010 Nov 18;68(4):654-67.

[0004] PGRN (проэпителин, предшественник гранулина-эпителина, фактор роста, происходящий из клеток РС, акрограния) представляет собой секретируемый гликозилированный белок с противовоспалительными и подобными нейротропам действиями (для недавнего обзора см. Nguyen, Trends

Endocrinol Metab. 2013 Dec;24(12):597-606). PGRN расщепляется протеолитическим путем до гранулинов, однако многое еще предстоит узнать о физиологической роли PGRN и гранулинов и идентичности их рецепторов. PGRN был вовлечен в несколько клеточных функций, в том числе регуляцию клеточного

5 цикла и подвижность клеток (He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 57:600-612 (2003); Monami, G., *et al.*, Cancer Res. (5(5):7103-7110 (2006)), заживление ран, воспаление (Zhu, J., *et al.*, Cell 777:867-878 (2002)), индуцирование синтеза факторов роста, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) (Tangkeangsinsin, W. & Serrero, G, Carcinogenesis 25:1587-1592 (2004)), и онкогенез (He, Z. & Bateman, A., J. Mol.

10 Med. 81:600-612 (2003), Monami, G., *et al.*, Cancer Res (5(5):7103-7110 (2006); Serrero, G., Biochem Biophys. Res. Commun. 505-409-413 (2003), Lu, R & Serrero, G., Proc. Natl Acad Sci U.S.A 98 142-147 (2001); Liao, L M., *et al.*, Cancer Res. 60:1353-1360 (2000)). Сообщалось, что PGRN связывается с рецептором TNF (Tang W *et al.*, Science 2011, 332(6028):478-84), однако другие авторы ставят под

15 сомнение это наблюдение (Chen *et al.*, J Neurosci. 2013, 33(21):9202-9213).

[0005] Связывание PGRN с сортилином было картировано в сайте нейротензина, и сообщалось, что оно опосредуется исключительно за счет С-концевого домена PGRN (Zheng *et al.* PLoS One. 2011;6(6):e21023; Lee *et al.* Hum Mol Genet. 2013) подобным к нейротензину образом, и, соответственно, было

20 показано, что нейротензин блокирует взаимодействие сортилина с PGRN и другими лигандами. После связывания сортилин опосредует выведение PGRN лизосомами и за счет этого регулирует уровни внеклеточного PGRN (Hu *et al.* 2010). Таким образом, было показано, что нокдаун или сверхэкспрессия сортилина регулирует уровни внеклеточного PGRN в культуре клеток

25 (Carrasquillo *et al.* Am J Hum Genet. 2010 Dec 10;87(6):890-7) и у мышей, при этом сообщалось, что дефицит сортилина повышает уровни PGRN и восстанавливает уровни PGRN в плазме крови и головном мозге у PGRN+/- мышей (Hu *et al.* 2010). Интересно отметить, что однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в гене сортилина был ассоциирован с пониженными уровнями PGRN в плазме крови и

30 повышенными уровнями мПНК сортилина (Carrasquillo *et al.* Am J Hum Genet. 2010 Dec 10;87(6):890-7). Эти наблюдения дают основание предположить, что сортилин является ключевым регулятором внеклеточного PGRN.

[0006] Была найдена связь PGRN с лобно-височной деменцией (FTD), прогрессирующей формой деменции, характеризующейся изменениями в поведении и способности понимания значения слов, а также лобно-височной лобарной дегенерацией (FTLD) и наличием включений в нейронах, включающих в себя включения TAR-ДНК-связывающего белка 43 (TDP-43) или тау-белка (Baker et al, 2006, Nature. 2006 Aug 24;442(7105):916-9; Cruts et al, Nature 442: 920-924 (2006); Am J Hum Genet. 2010 Dec 10;87(6):890-7, M et al, Trends in Genetics 24: 186-194 (2008)). В большинстве случаев спорадической и наследственной формы FTD наблюдается патология TDP-43 (~50%), подобная встречающейся при ALS, и некоторые авторы считают, что FTD-TDP43 и ALS являются заболеваниями одного спектра (Ito D Neurology. 2011 Oct 25;77(17):1636-43; Boxer AL et al, Alzheimers Dement. 2013 Mar;9(2):176-88; Rademakers et al, Nat Rev Neurol. 2012 August; 8(8): 423-434) вследствие одинаковых патологических процессов и генетических факторов, а также некоторого совпадения в симптоматике. Для FTD не существует никаких вариантов симптом-модифицирующей терапии. У некоторой части страдающих лобно-височной деменцией пациентов с патологией TDP-43 наблюдаются мутации в гене гранулина (GRN), обеспечивающие потерю функции, что приводит к гипонедостаточности PGRN. На сегодняшний день 69 разных мутаций в гене гранулина, все из которых приводят к пониженным уровням PGRN и/или функции, были ассоциированы с FTD, и полагают, что повышение уровня внеклеточного PGRN в плазме крови и головном мозге будет противодействовать болезненному процессу.

[0007] Также была найдена связь мутаций PGRN с болезнью Альцгеймера (AD) (Sheng et al., 2014, Gene. 2014 Jun 1;542(2):141-5; Brouwers et al., 2008, Neurology. 2008 Aug 26;71(9):656-64), что дает основание предположить, что дефицит PGRN может играть важную роль в патогенезе AD. Кроме того, в мышиных моделях AD были отмечены нейропротекторные эффекты PGRN (Minami et al, 2014, Nat Med. 2014 Oct;20(10):1157-64), которые подкрепляют мнение, что повышенные уровни PGRN могут быть полезными при AD и, вероятно, других нейродегенеративных состояниях.

[0008] В настоящей заявке описано получение и идентификация антител к сортилину человека, которые могут регулировать PGRN в клеточных моделях и

на мышах. Такие антитела, на удивление, связываются с областью в сортилине, которая отдалена от ранее сообщаемого сайта связывания програнулина, так называемого сайта нейротензина, и при этом способны подавлять взаимодействие сортилин-PGRN и за счет этого повышать уровень внеклеточного PGRN.

- 5 [0009] Авторы настоящего изобретения определили шесть областей связывания сортилина и неожиданно идентифицировали, что наиболее эффективные антитела связывают определенную область (“область D”). Поскольку PGRN обладает нейропротекторным и противовоспалительным эффектами, полученные авторами настоящего изобретения результаты
- 10 указывают, что такие антитела, нацеливающиеся на сортилин, вероятно, обладают благоприятным эффектом при лечении ряда нейродегенеративных нарушений, в том числе FTD/FTLD. У некоторой части данных пациентов имеется мутация в гене, кодирующем PGRN, которая приводит к гаплонедостаточности. Следовательно, антитела к сортилину, вероятно, обладают подобными
- 15 терапевтическими преимуществами для пациентов, страдающих другими протеинопатиями TDP-43 и заболеваниями, при которых уровни PGRN могут влиять на функцию TDP43 и патологию, в том числе ALS и AD.

Краткое описание изобретения

- [0010] Авторы настоящего изобретения получили моноклональные антитела,
- 20 которые способны подавлять связывание PGRN с сортилином и которые, на удивление, связываются с новой областью сортилина, названной “областью D”, определенной в **SEQ ID NO:170**. Несколько антител, идентифицированных авторами настоящего изобретения, характеризуются свойствами, подобными таковым у антител к области D, и экспериментальные данные указывают, что их
- 25 связывание также происходит в области D, и такие антитела в данном документе упоминаются как антитела к D⁺. Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к таким антителам, к композициям и/или наборам, содержащим такие антитела, а также к связанным с ними способам и путям применения.
- 30 [0011] Настоящее изобретение также относится к способу предупреждения или лечения заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента, включающему введение эффективной дозы антитела

или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с областью D сортилина. Такие заболевания включают среди прочих FTD, ALS и протеинопатии TDP43, как, например, AD.

Краткое описание графических материалов

- 5 [0012] На **фигуре 1** представлен общий обзор касательно соотношения областей антител человека на основании связывания области сортилина, эффекта в отношении связывания PGRN и уровней PGRN и в отношении перекрестного блокирования между антителами.
- [0013] Антитела, связывающие сортилин, отбирали и соотносили с областями
- 10 А-Е на основании связывания с конструкциями, полученными перетасовкой, в которых последовательность соответствовала последовательности сортилина иглобрюхов в пределах выбранных областей белка (**пример 1, фигура 2**).
- [0014] Отбирали 20 антител, которые подавляли связывание сортилин-PGRN (что измеряли с помощью анализа HTRF) (см. **пример 10, фигуру 5 и фигуру 6**).
- 15 Из этих антител 15 представляли собой антитела к области D, тогда как 3 представляли собой антитела к D+ (**фигура 6**). Последующий анализ перекрестного блокирования подтвердил 18 антител к области D и D+ (антитела к D+ характеризовались другим профилем связывания с конструкциями, полученными перетасовкой, по сравнению с антителами к области D). Тем не
- 20 менее, антитела к D+ не могут быть с точностью отнесены к областям связывания А-Е, как изложено выше, однако они имеют общие функциональные характеристики (в клеточных анализах и т. д.), подобные таковым у антител к области D, при этом все перекрестно блокировали друг друга, подтверждая то, что они взаимодействовали с одной и той же областью сортилина (**пример 9, фигура**
- 25 **7**). При тестировании антител к сортилину из классов соответствия другим областям в анализе HTRF по связыванию сортилина-PGRN только два из 41 антитела проявляли подавляющий эффект. Одно из этих двух антител перекрестно блокировало D и D+, однако оно характеризовалось нетипичным профилем связывания с конструкцией, полученной перетасовкой (подобно D, за
- 30 исключением того, что оно связывало область hB01-05), тогда как другое антитело перекрестно не блокировало с другими антителами, которые подавляют

связывание PGRN-сортилин, подтверждая таким образом утверждение, что оно связывается с другой областью сортилина.

[0015] Эти наблюдения показывают, что антитела, связывающиеся с участком в сортилине, определенным как область D, обладают потенциалом в отношении подавления связывания сортилин-PGRN.

[0016] 19 перекрестно блокирующих антител, из которых 18 представляли собой антитела к области D и D⁺, повышали уровень внеклеточного PGRN в клеточном анализе (**пример 13, фигура 10 и фигура 11**). Три из этих антител тестировали *in vivo* и обнаружили, что они повышают уровень PGRN в плазме крови (**фигура 13, пример 15**).

[0017] Блоки на **фигуре 1** иллюстрируют стадии отбора антител. А-Е означают области, к которым относили соответствующие антитела, связывающие сортилин, на основании конструкций, полученных перетасовкой, как описано в **примере 1** и **SEQ ID NO:171-179**. “Другое” относится к антителу, которое нельзя соотнести ни с одной областью и которое может связываться в пределах граничной поверхности между областями А и В. Tet относится к антителам, связывающим также сортилин иглобрюхов.

[0018] В дополнение к показанным антителам человека получали и характеризовали подобным образом набор антител мыши к сортилину человека. Два из этих антител относили к области D, и было показано, что их перекрестно блокируют с антителами человека к области D и D⁺, что они подавляют связывание сортилин-PGRN и повышают уровень внеклеточного PGRN (см. **фигуру 4**).

[0019] На **фигуре 2** показано соотнесение антител с областями на основании связывания с конструкциями сортилина, полученными перетасовкой.

[0020] На **панели А** показана иллюстрация в линейном виде конструкций, полученных перетасовкой, применяемых для соотнесения антител с областями, как описано в **примере 1**. Конструкции сортилина, полученные перетасовкой, получали на основании последовательности сортилина человека (**SEQ ID NO:169**) (отрезки показаны серым цветом), в которой аминокислотные остатки заменяли на соответствующую аминокислоту из последовательности сортилина иглобрюхов (показана черным цветом) (**SEQ ID NO:173**) (**примеры 1-3**).

[0021] На **панели В** показана предсказанная структура конструкций, полученных перетасовкой, проиллюстрированных в линейном виде на панели А. Остатки темного цвета указывают на остатки, измененные на соответствующие последовательности иглобрюхов в конструкциях, полученных перетасовкой.

5 [0022] На **панели С** проиллюстрирован профиль связывания антител, отнесенных к классам соответствия области D и области E соответственно. Знак “+” указывает на связывание с указанной конструкцией, полученной перетасовкой, а знак “-” указывает на отсутствие связывания. На основании профиля связывания с разными конструкциями, полученными перетасовкой, антитела соотносили с областями. Классы соответствия областям полученных антител обозначены А-Е. Что касается проиллюстрированных антител к областям D и E, оба связывали человеческие последовательности (полностью серые), на что указывает “+”, и ни одно не связывало последовательность иглобрюхов (полностью черные), на что указывает “-”, тогда как антитело к области E связывало конструкцию hB45678, полученную перетасовкой, при этом антитело к области D не связывало ее в результате локализации области связывания, как проиллюстрировано на панели А. Что касается антител к области D, наблюдали связывание со следующими областями, полученными перетасовкой: hsort, hB06-10, B12390. Антитела не связывались с hB01-05, B45678, tet. Что касается антител к D+, наблюдали связывание со следующими областями, полученными перетасовкой: hsort, B12390. Антитела не связывались с hB01-05, hB06-10, B45678, tet. Профиль связывания F был подобным профилю связывания D, за исключением того, что для антител к D+ не наблюдали связывания с hB06-10.

10
15
20

[0023] Антитела не связывались с белком сортилином, полностью происходящим от иглобрюхов, за исключением двух. Два антитела, способные связываться с последовательностью иглобрюхов, обозначены “tet”. “Другое” относится к антителу, которое нельзя соотнести ни с одной областью.

25

[0024] На **фигуре 3** показаны показатели аффинности связывания для антител человека к области D и D+. Показатели аффинности связывания с конструкциями сортилина, полученными перетасовкой, получены с помощью интерферометрии биослоя с применением Octet 384RED, как описано в **примере 8** (EC50, нг/мл). Отсутствие затенения указывает на значение EC50, составляющее 0,1-10 нг/мл,

30

затенение светло-серым цветом указывает на значение EC50, составляющее >10 нг/мл, и затенение серым цветом указывает на отсутствие связывания (NB). Соотнесение с областями, основанное на профилях связывания, проиллюстрировано на **фигуре 2**. Конструкции, полученные перетасовкой, проиллюстрированы на **фигуре 2**, и последовательности приведены в **SEQ ID NO:171-179**. mAb = моноклональное антитело.

[0025] На **фигуре 4** показаны показатели аффинности связывания антител мыши к сортилину человека с конструкциями, полученными перетасовкой, полученные с помощью интерферометрии биослоя с применением Octet 384RED, как описано в **примере 8** (EC50, нг/мл). Отсутствие затенения указывает на связывание, а затенение серым цветом указывает на отсутствие связывания (NB). Соотнесение с областями, основанное на профилях связывания, проиллюстрировано на **фигуре 2**.

[0026] На **фигуре 5** показан эффект антитела к сортилину в отношении связывания сортилина с PGRN. Моноклональное антитело 45 человека (humAb) к области D сортилина (закрашенные кружочки) предотвращало связывание PGRN с сортилином в отличие от контрольного антитела к области E сортилина (закрашенные треугольники) и контроля IgG, IgG1-b12 (незакрашенные треугольники), которые не препятствовали связыванию. Связывание антител определяли путем измерения смещения связывания PGRN с сортилином с помощью гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) (**пример 10**). Оценку зависимости доза-ответ для антител выполняли при десяти концентрациях, охватывающих диапазон от 50 пМ до 1 мкМ, по кривым, построенных при 3-кратном разведении. Значения концентрации полумаксимального подавления (IC50) рассчитывали с помощью нелинейной регрессии с использованием сигмоидальной кривой концентрация-ответ (с переменной крутизной) в XLfit 4 (IDBS, Великобритания).

[0027] На **фигуре 6** представлено краткое описание эффекта антител в отношении связывания сортилин-PGRN, определенного с помощью анализа методом гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF), как показано на **фигуре 5**. В общей сложности тестировали 62 антитела - при этом было обнаружено, что 15 антител к области D и 3 антитела к D+ подавляют

связывание сортилин-PGRN, а также определяли значения IC50. Для двух дополнительных антител (к E и другим областям) наблюдали подавляющий эффект. Все остальные антитела показали отрицательный результат в тесте. * эффект антитела был слишком слабым для подбора кривой зависимости доза-ответ. 6% подавление при 1 мкМ. ** эффект контрольного (контр.) антитела был слишком слабым для подбора кривой зависимости доза-ответ. 37% подавление при 1 мкМ.

[0028] Эти наблюдения показывают, что антитела к сортилину, характеризованные по их отнесению к области D или D+, подавляют непосредственное связывание сортилина с PGRN и способны подавлять связывание сортилин-PGRN.

[0029] На **фигуре 7** показано перекрестное блокирование между антителами. Все из антител человека и антител мыши тестировали в одном эксперименте, в котором каждое антитело связывалось с сортилином человека дикого типа (WT) (**фигура 7**). Затем все остальные антитела тестировали в отношении связывания с предварительно образованным комплексом сортилин:антитело (**пример 9**). Все из выбранных 15 антител человека к области D и 3 антител человека к D+ (на основании их эффекта в анализе HTRF, проводимом в отношении PGRN-сортилин (**фигура 5** и **фигура 6**) и двух антител мыши к области D подавляли связывание друг друга с сортилином человека WT.

[0030] Антитела перекрестно не блокировали с антителами, сконструированными к классам соответствия другим областям (как проиллюстрировано для антител, распознающих область A, область E и сортилин иглобрюхов, перечисленных в таблице как AbA1-x, AbE1-x и Abtet соответственно), за исключением одного перекрестно блокирующего антитела к области A, одно антитело с неизвестным соотношением с областью ("другое"), и при этом их частично блокировало антитело к D+ 548. Эти данные подтверждают, что все антитела к области D и D+, способные подавлять связывание сортилин-PGRN в анализе HTRF, взаимодействовали с одной и той же областью сортилина.

[0031] Перекрестное блокирование между антителами к одной и той же или разным областям сортилина (области, определенные на основании связывания с конструкциями, полученными перетасовкой, как проиллюстрировано на **фигуре**

2) определяли путем анализа препятствия связыванию антитела-сортилина. Связывание антител с сортилином-ECD-His определяли с помощью интерферометрии биослоя с применением Octet 384RED (**пример 9**). В левом столбце указаны первичные (иммобилизованные) антитела, а в верхнем ряду
5 указаны вторичные антитела (антитела, тестируемые в отношении иммобилизованных антител). Связывание как первичных, так и вторичных антител с сортилином-ECD-His будет приводить к значению ответа более 0,1 и указывать, что оба антитела связались с разными областями белка. Значение отклика менее 0,1 показывает отсутствие связывания вторичного антитела и
10 эффективное перекрестное блокирование иммобилизованным (первичным) антителом, свидетельствуя о том, что оба антитела связываются с одной и той же областью сортилина.

[0032] На **фигуре 8** показан эффект антител к области D и D+ сортилина в отношении связывания с сортилином селективного лиганда AF38469,
15 являющегося малой молекулой. Было показано, что сайт связывания AF38469 аналогичен сайту связывания нейротензина, и его характеризовали с помощью рентгеновской кристаллографии (Schröder *et al.* Bioorg Med Chem Lett. 2014 Jan 1;24(1):177-80). Сообщалось, что PGRN связывается с одним и тем же сайтом (Lee *et al.* Hum Mol Genet. 2013) антител 45 и 68, связывающихся с областью D и D+ соответственно, не подавляя связывание AF38469 с сортилином. Эти данные
20 свидетельствуют о том, что эти антитела имеют сайт связывания сортилина, отличный от сайта связывания AF38469. Следовательно, антитела 45 и 68 подавляют связывание PGRN-сортилин за счет сайта связывания, отличного от предполагаемого ранее сайта связывания PGRN в сортилине.

[0033] **Фигура 9.** Эффект антител 45 и 68 в отношении связывания и эндоцитоза PGRN клетками (**пример 12**). Антитела 45 и 68 подавляли связывание и/или эндоцитоз PGRN клетками, сверхэкспрессирующими сортилин. Добавление нейротензина (NT, 10 мкМ) подобным образом снижало связывание или
25 эндоцитоз PGRN, что отражалось в сниженной интенсивности флуоресценции, при этом как и ожидалось изотипическое контрольное антитело B12 не влияло на
30 уровни флуоресценции PGRN.

[0034] Тестируемые антитела (100 нМ) добавляли к клеткам S18 за 30 мин. перед добавлением рекомбинантного PGRN на 4 ч. Затем клетки фиксировали, окрашивали для выявления PGRN и анализировали с помощью Cellomics. Флуоресценцию PGRN измеряли в виде средней флуоресценции из расчета на одну клетку. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SD. Данные анализировали с помощью однофакторного Anova с последующим анализом с использованием критерия Даннета, при этом все группы сравнивали с PGRN. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

[0035] **Фигура 10.** Уровни внеклеточного PGRN, определенные с помощью ELISA в средах от культур сверхэкспрессирующих сортилин клеток HEK (S18). Антитела к области D (45, 811) и D+ (68) сортилина повышали уровни PGRN и подобный эффект наблюдали для лиганда сортилина нейротензина, тогда как контрольное антитело B12 не оказывало эффекта. Эти наблюдения указывают, что антитела к области D и D+ сортилина были способны подавлять опосредованное сортилином выведение PGRN, повышая за счет этого уровень внеклеточного PGRN. Все антитела тестировали при концентрации 100 нМ. Нейротензин тестировали при концентрации 10 мкМ. Уровни PGRN нормализовали относительно контроля. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SD. Данные анализировали с помощью однофакторного Anova с последующим анализом с использованием критерия Даннета, при этом все группы сравнивали с контролем, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (**пример 13**).

[0036] На **фигуре 11** показан эффект антител в отношении уровня внеклеточного PGRN в сверхэкспрессирующих сортилин клетках HEK человека, измеренного с помощью ELISA, как описано в **примере 13**. Все отобранные антитела к области D и три отобранных антитела к D+ повышали уровень внеклеточного PGRN. Уровни PGRN анализировали так же, как указано выше. Уровни PGRN нормализовали относительно необработанных контролей и приводили в %. Два антитела к сортилину человека получали от мыши (1F2F4 и 5E1F6), а остальные представляли собой антитела человека. Ab = моноклональное антитело.

[0037] На **фигуре 12 (верхняя и нижняя панели)** показан эффект антитела к сортилину в отношении уровня внеклеточного PGRN в дифференцированных из

клеток iPSC нейронах (**пример 14**). Антитело к области D сортилина 45 и антитело к D+ 68 повышали уровни PGRN, тогда как контрольные антитела B12 и антитело к HEL не оказывали эффекта.

[0038] Дифференцированные из клеток iPSC нейроны высевали в 96-луночный планшет. Спустя одну неделю к клеткам добавляли антитела. Среду от клеток собирали через 48 часов или 96 часов и анализировали с помощью ELISA для PGRN человека (Enzo Life sciences), и при этом образцы анализировали согласно инструкциям производителя. Антитела человека к сортилину 45 и 68 повышали уровни PGRN в средах, собранных в оба момента времени. Контрольные изотипические антитела B12 и антитело к Hel (отрицательный контроль) не изменяли уровень внеклеточного PGRN. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SD. Данные анализировали с помощью однофакторного Anova с последующим анализом с использованием критерия Даннета, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (**пример 14**).

[0039] На **фигуре 13 (панели А-С)** показаны уровни PGRN в плазме крови у мышей с нокином (KI), за счет которого у них экспрессируется сортилин человека, обработанных антителом к сортилину человека (**пример 15**). Антитело к сортилину 45 повышало уровни PGRN в плазме крови, тогда как контрольное антитело не оказывало эффекта.

[0040] **А. Исследование в динамике.** После введения посредством инъекции антитела 45 (антитела к области D) наблюдали повышенные уровни PGRN в плазме крови. Мышам вводили sc посредством инъекции антитело 45 (n=5) или контрольное антитело (n=3) в дозе 10 мг/кг. Каждую группу выводили из эксперимента в разные моменты времени. У мышей, обработанных контрольными антителами (антителами к Hel), не наблюдали изменения в отношении уровня PGRN в плазме крови, тогда как у мышей, обработанных антителом 45, наблюдали постепенное повышение уровней PGRN. Эффект достигал своего пика в промежутке от 24 до 48 часов и постепенно снижался к дням 4-7.

[0041] **В. Исследование средней длительности.** Мышей обрабатывали дважды в неделю с помощью 10 мг/кг антитела 45 и контрольного антитела (антитела к Hel). Образцы собирали из лицевой вены каждую неделю. Уровень PGRN в плазме крови был повышен на 1-й неделе и оставался примерно на том

же уровне на протяжении всего исследования по сравнению с животными, обработанными контрольным антителом (n=20).

[0042] **С. Исследование зависимости доза-ответ.** Разные дозы (4 дозы: 0,1, 0,4, 2 и 10 мг/кг) антитела к сортилину (45) и контрольных антител (антител к Hel) вводили посредством инъекции и мышей умерщвляли на 2-й день. Уровень PGRN в плазме крови был повышен у мышей, обработанных антителом 45 (10 и 2 мг/кг), при этом более низкие дозы (0,4 и 0,1 мг/кг) не оказывали эффекта в отношении уровня PGRN в плазме крови. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SD. Данные анализировали с помощью двухфакторного Anova с последующим анализом с использованием критерия Бонферрони, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (пример 15).

[0043] На **фигуре 14** представлена иллюстрация областей сортилина, определенных на основании конструкций сортилина, полученных перетасовкой, наложенных на предсказанную структуру сортилина. Области являются частью сегментов белка сортилина, в которых изменение выбранных аминокислотных остатков из человеческой последовательности на характерные для последовательности иглобрюхов приводит к подавлению связывания с антителами класса соответствия такой области. Стрелкой указан ранее сообщаемый высокоаффинный сайт связывания нейротензина и PGRN (Quistgaard Nat Struct Mol Biol. 2009 Jan;16(1):96-8, Lee et al, Hum Mol Genet. 2013).

[0044] На **фигурах 15a (панели 1-6) и 15b (панели 1-3)** показаны иллюстративные пептиды, охватывающие конформационный эпитоп антитела 45, 68 и 811. Все из показанных пептидов характеризуются степенью защиты от обмена более 0,5D, за исключением пептида 115-125. Пептид 115-125 является примером пептида, на который не оказывает влияние наличие антитела 45, 68 или 811, и поэтому он не является частью конформационного связывающего эпитопа (пример 16).

[0045] На **фигурах 16a (панели 1-6) и 16b (панели 1-3)** показаны иллюстративные пептиды, охватывающие конформационный эпитоп антитела 30. Все из показанных пептидов характеризуются степенью защиты от обмена более 0,5D, за исключением пептида 563-572, пептида 646-656 и пептида 704-714. Эти три пептида являются примерами пептидов, на которые не оказывает влияние

наличие антитела 30, и поэтому они не являются частью, отвечающей за конформационное связывание (**пример 16**)

[0046] На **фигуре 17** показана иллюстрация процедуры микродиализа.

[0047] На **фигуре 18a** показана динамика в отношении эффекта системного введения антитела 45 или PBS (50 мг/кг, 10 мл/кг, s.c.) за 24 ч. до проведения микродиализных экспериментов в отношении уровней PRGN в гиппокампе свободно двигающихся мышей hSORT1 с течением времени (24 ч.) (**пример 17**).

[0048] На **фигуре 18b** показаны объединенные результаты 24 ч. диализа: исходный уровень PRGN в гиппокампе свободно двигающихся мышей hSORT1, у мышей, обработанных mab№45 и PBS в дозе $3,3 \pm 0,3$ нг/мл и $1,1 \pm 0,1$ нг/мл соответственно, оцененные с помощью двухтактного микродиализа (**пример 17**).

[0049] На **фигуре 18c** представлена таблица, демонстрирующая уровни PRGN (средние значения $\pm$ SEM) в гиппокампе свободно двигающихся мышей hSORT1, которые измеряли каждые 2 ч. в течение 24 ч. через 1 день после обработки животных с помощью mab№45 (n=10) или PBS (n=8) (**пример 17**).

Подробное описание изобретения

[0050] Используемый в данном документе термин “сортилин” является синонимом “белка сортилина” (идентифицированного, например, в UniProt как Q99523, 1 и 2). Нумерация аминокислот сортилина приведена относительно **SEQ ID NO:169**, показанной ниже, при этом Met является аминокислотой 1:

MERPWGAADG LSRWPHGLGL LLLLQLLPPS TLSQDRLDAP PPPAAPLPRW
SGPIGVSWGL RAAAAGGAFP RGGRWRRSAP GEDEECGRVR DFVAKLANNT
HQHVFDDLRLG SVSLSWVGDS TGVIL VLTTF HVPLVIMTFG QSKLYRSEDY
GKNFKDITDL INNTFIRTEF GMAIGPENSG KVVLTAEVSG GSRGGGRIFRS
SDFAKNFVQT DLPFHPLTQM MYSPQNSDYL LALSTENGLW VSKNFGGKWE
EIHKAVCLAK WGSNTIFFT TYANGSCKAD LGALELWRTS DLGKSFKTIG
VKIYSFGLGG RFLFASVMAD KDTTRRIHVS TDQGDTWSMA QLPSVGQE QF
YSILAANDDM VFMHVDEPGD TGFGTIFTSD DRGIVYSKSL DRHLYTTTGG
ETDFTNVTSL RGVYITSVLS EDNSIQTMIT FDQGGRWTHL RKPENSECDA
TAKNKNESCSL HIHASYSISQ KLNVPMAPLS EPNAVGIIVIA HGSVGDAISV
MVPDVYISDD GGYSWTKMLE GPHYYTILDS GGIIVAI EHS SRPINVIKFS
TDEGQCWQTY TFTRDPIYFT GLASEPGARS MNISIWGFTE SFLTSQWVS Y

TIDFKDILER NCEEKDYTIW LAHSTDPEDY EDGCILGYKE QFLRLRKSSV
CQNGRDYVVT KQPSICLCSL EDFLCDFGY Y RPENDSKCVE QPELKGHDL E
FCLYGREEHL TTNGYRKIPG DKCQGGVNPV REVKDLKKKC TSNFLSPEKQ
NSKSNSVPIL LAIVGLMLVT VVAGVLIVKK YVCGGRFLVH RYSVLQQHAE
5 ANGVDGVDAL DTASHTNKSG YHDDSDLEDLLE.

[0051] Под используемым в данном документе термином “область D” подразумевается область сортилина (соответствующая остаткам 523-610 в **SEQ ID NO:169**), состоящая из аминокислот из **SEQ ID NO:170**, показанной ниже:

HYYTILDSGG IIVAIHSSR PINVIKFSTD EGQCWQTYTF TRDPIYFTGL

10 ASEPGARSMN ISIWGFTESE LTSQWVSYTI DFKDILER.

[0052] Что касается антител к области D, наблюдали связывание со следующими областями, полученными перетасовкой: hsort, hB06-10, B12390. Антитела не связывались с hB01-05, B45678, tet. Что касается антител к D+, наблюдали связывание со следующими областями, полученными перетасовкой:

15 hsort, B12390. Антитела не связывались с hB01-05, hB06-10, B45678, tet. Для антител, названных “D+”, наблюдали подобный профиль связывания как у антител к области “D”, за исключением того, что для антител к D+ не наблюдали связывания с hB06-10. Несмотря на разный профиль связывания с конструкциями, полученными перетасовкой, антитела к D+ имели общие с антителами к области
20 D функциональные характеристики (в клеточных анализах и т. д.).

[0053] Определенные антитела, связывающие D и D+, в частности, связывают область, определенную в **SEQ ID NO:185, 186 или 187**. Таким образом, настоящее изобретение относится в определенных вариантах осуществления к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с
25 последовательностью области D **SEQ ID 170** и последовательностями в пределах этой области **SEQ ID NO:185, 186 или 187**. За счет связывания эти антитела или антигенсвязывающие фрагменты влияют на уровни PGRN, и поэтому их можно применять для лечения заболеваний, ассоциированных с PGRN, таких как FTD, ALS и AD.

30 [0054] Путем дополнительного анализа связывания антител к D и D+ по настоящему изобретению было идентифицировано частичное связывание некоторых из антител со смежной областью (областью A). Эта область

соответствует аминокислотам 78-254 из **SEQ ID NO:169**, показанным в **SEQ ID NO:180** и ниже:

SAPGEDEECG RVRDFVAKLA NNTHQHVFD LRGSVSLSWV GDSTGVIL VL
TTFHVPLVIM TFGQSKLYRS EDYGKNFKDI TDLINNTFIR TEFGMAIGPE
5 NSGKVVLTAE VSGGSRGGRI FRSSDFAKNF VQTDLPFHPL TQMMYSPQNS
DYLLALSTEN GLWVSKNFGG KWEEIHK.

Эта область была названа “областью А”.

[0055] Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящее
10 изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, ко-
торые связывают область D, определенную выше и в SEQ ID NO: 170, 185, 186
или 187, и дополнительно обладают аффинностью к области А, идентифициро-
ванной в SEQ ID NO: 180. В пределах области А определенные антитела или их
антигенсвязывающие фрагменты обладают аффинностью к аминокислотам обла-
15 сти А, идентифицированным в SEQ ID NO: 181, 182, 183 или 184.

[0056] PGRN (проэпителин, предшественник гранулина-эпителина, фактор
роста, происходящий из клеток РС, акрогранин) кодирует секретируемый
гликопротеин размером 68,5 кДа, который содержит 7,5 повторов мотивов
гранулина меньшего размера, находящихся в диапазоне 6-25 кДа, которые могут
20 быть отщеплены ферментативным путем от предшественника PGRN (He, Z. &
Bateman, A., J. Mol. Med. 81:600-612 (2003)). В отличных от нейронов клетках
PGRN был ассоциирован с рядом явлений, как, например, регуляцией клеточного
цикла и подвижностью клеток (He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 57:600-612
(2003); Monami, G., et al, Cancer Res. 5(5):7103-7110 (2006)), заживлением ран,
25 воспалением (Zhu, J., et al, Cell 77:867-878 (2002)), индуцированием синтеза
факторов роста, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)
(Tangkeangsitsin, W. & Serrero, G, Carcinogenesis 25:1587-1592 (2004)), и
онкогенезом (He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 81:600-612 (2003), Monami, G., *et*
al., Cancer Res 5(5):7103-7110 (2006); Serrero, G., Biochem Biophys. Res. Commun.
30 505-409-413 (2003), Lu, R & Serrero, G., Proc. Natl Acad Sci U.S.A 98 142-147 (2001);
Liau, L M., et al., Cancer Res. 60:1353-1360 (2000)).

[0057] Мутации PGRN приводят к гаплонедостаточности (Baker, M., et al, Nature 442:916-919 (2006); Cruts, M., et al, Nature 442:920-924 (2006)) и, как известно, имеют место в около 50% случаев наследственной формы FTD, что делает мутацию PGRN главным генетическим фактором, ответственным за развитие FTD (Cruts, M. & Van Broeckhoven, C, Trends Genet. 24:186-194 (2008); Le Ber, I., et al, Brain 129:3051- 3065 (2006)). Гетерозиготный характер мутаций PGRN, обеспечивающих потерю функции, означает то, что у здоровых индивидуумов экспрессия PGRN играет важную роль с дозозависимым характером в обеспечении защиты здоровых индивидуумов от развития FTD.

[0058] Термин "антитело" (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобулина или, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, фрагменту молекулы иммуноглобулина, которая обладает способностью связываться с эпитопом молекулы ("антигена"). Встречающиеся в природе антитела обычно представляют собой тетрамер, который обычно состоит из по меньшей мере двух тяжелых (H) цепей и по меньшей мере двух легких (L) цепей. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного домена тяжелой цепи (сокращенно называемого в данном документе VH) и константного домена тяжелой цепи, обычно состоящего из трех доменов (CH1, CH2 и CH3). Тяжелые цепи могут относиться к любому изотипу, в том числе IgG (подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE. Каждая легкая цепь состоит из переменного домена легкой цепи (сокращенно называемого в данном документе VL) и константного домена легкой цепи (CL). Легкие цепи включают каппа-цепи и лямбда-цепи. Переменный домен тяжелой и легкой цепей обычно отвечает за распознавание антигена, тогда как константный домен тяжелой и легкой цепей может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе с различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классического пути активации системы комплемента. VH- и VL-домены могут дополнительно подразделяться на гиперпеременные области, называемые "областями, определяющими комплементарность", которые перемежаются с доменами с более консервативной последовательностью, называемыми "каркасными областями" (FR). Каждый VH и VL состоит из трех

CDR-доменов и четырех FR-доменов, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Вариабельные домены тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Особенно значимыми являются антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые были “выделены” таким образом, чтобы они существовали в физической среде, отличающейся от той, в которой они могут встречаться в природе, или которые были модифицированы таким образом, чтобы они отличались по аминокислотной последовательности от встречающегося в природе антитела.

10 [0059] Термин “эпитоп” означает антигенную детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические характеристики трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и линейные
15 эпитопы отличаются тем, что связывание с первыми, но не с последними, всегда утрачивается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно
20 блокируются пептидом, специфически связывающимся с антигеном (другими словами, аминокислотный остаток находится в пределах области узнавания пептида, специфически связывающегося с антигеном).

[0060] Используемый в данном документе термин “антигенсвязывающий фрагмент антитела” означает фрагмент, часть, область или домен антитела
25 (независимо от того, как он получен (например, посредством расщепления, рекомбинантным путем, посредством синтеза и т. д.)), который может связываться с эпитопом, и, таким образом, термин “антигенсвязывающий” означает то же самое, что и “эпитопсвязывающий”, так что, например, “антигенсвязывающий фрагмент антитела” подразумевают как то же, что и
30 “эпитопсвязывающий фрагмент антитела”. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 CDR-доменов такого антитела и, несмотря на то, что он может связываться с таким эпитопом, он может проявлять

специфичность, аффинность или селективность в отношении такого эпитопа, который отличается от эпитопа такого антитела. Предпочтительно, однако, чтобы антигенсвязывающий фрагмент содержал все 6 CDR-доменов такого антитела. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может представлять собой часть одной

5 полипептидной цепи (например, scFv) или содержать ее или может представлять собой часть двух или более полипептидных цепей или содержать их, причем каждая из них имеет amino-конец и карбоксильный конец (например, диатело, Fab-фрагмент, Fab₂-фрагмент и т. д.). Фрагменты антител, которые проявляют антигенсвязывающую способность, можно получить, например, путем

10 расщепления интактных антител протеазами. Более предпочтительно, чтобы, несмотря на то, что два домена Fv-фрагмента, VL и VH, в естественных условиях кодируются отдельными генами или полинуклеотидами, которые кодируют такие последовательности генов (например, их кодирующей кДНК), можно было соединить с помощью рекомбинантных способов гибким линкером, который

15 обеспечивает возможность их получения в виде одной белковой цепи, в которой VL- и VH-области ассоциируются с образованием одновалентных антигенсвязывающих молекул (известных как одноцепочечные Fv (scFv), см., например, Bird *et al.*, (1988) Science 242:423-426 и Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883). В качестве альтернативы, путем использования

20 гибкого линкера, который является слишком коротким (например, имеет длину менее чем приблизительно 9 остатков) для того, чтобы обеспечить возможность ассоциации VL- и VH-доменов одной полипептидной цепи друг с другом, можно образовать биспецифическое антитело, диатело или аналогичную молекулу (в которой две такие полипептидные цепи ассоциируют друг с другом с

25 образованием двухвалентной антигенсвязывающей молекулы) (см., например, PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993) в отношении описания диател). Примеры антигенсвязывающих фрагментов, охватываемых настоящим изобретением, включают (i) Fab'- или Fab-фрагмент - одновалентный фрагмент, состоящий из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов, или одновалентное антитело, описанное в

30 WO2007059782; (ii) F(ab')₂-фрагменты - двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирном домене; (iii) Fd-фрагмент, по сути, состоящий из VH- и CH1-доменов; (iv) Fv-фрагмент, по

сути, состоящий из VL- и VH-доменов, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который, по сути, состоит из VH-домена и также называется доменным антителом (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11): 484-90); (vi) антитела верблюдовых или нанотела (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5_(I): I П-24) и (vii) выделенную область, определяющую комплементарность (CDR). Кроме того, несмотря на то, что два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с помощью рекомбинантных способов с синтетическим линкером, который обеспечивает возможность их получения в виде одной белковой цепи, в которой VL- и VH-домены находятся в паре с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), см., например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) и Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Эти и другие фрагменты антител, применимые в контексте настоящего изобретения, дополнительно обсуждаются в данном документе. Также следует понимать, что термин антитело, если не указано иное, также включает антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела, и фрагменты антител, сохраняющие способность связываться с антигеном (антигенсвязывающие фрагменты), получаемые с помощью любой известной методики, такой как ферментативное расщепление, синтез пептидов и рекомбинантные методики. Полученное антитело может иметь любой изотип. Как используется в данном документе, "изотип" относится к классу иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), кодируемому генами константных доменов тяжелых цепей. Такие фрагменты антител получают с помощью традиционных методик, известных специалистам в данной области техники; при этом подходящие фрагменты, способные связываться с желаемым эпитопом, можно без труда подвергнуть скринингу в отношении полезности таким же образом, как и интактное антитело.

[0061] Термин "биспецифическое антитело" относится к антителу, содержащему два независимых антигенсвязывающих фрагмента, каждый из которых нацеливается на независимые мишени. Эти мишени могут представлять собой эпитопы, присутствующие в различных белках, или различные эпитопы, присутствующие в одной и той же мишени. Молекулы биспецифических антител

можно получить с помощью компенсаторных аминокислотных изменений в константных доменах HC исходных молекул моноспецифических двухвалентных антител. Полученное в результате гетеродимерное антитело содержит один Fab, вклад в образование которого вносят два разных исходных моноспецифических антитела. Аминокислотные изменения в Fc-домене приводят к повышенной стабильности гетеродимерного антитела с биспецифичностью, которая стабильна с течением времени. (Ridgway et al., Protein Engineering 9, 617-621 (1996), Gunasekaran et al., JBC 285, 19637-1(2010), Moore et al., MAbs 3:6 546-557 (2011), Strop et al., JMB 420, 204-219 (2012), Metz et al., Protein Engineering 25:10 571-580 (2012), Labrijn et al., PNAS 110:113, 5145 -5150 (2013), Spreter Von Kreudenstein et al., MAbs 5:5 646-654 (2013)). Биспецифические антитела также могут включать молекулы, которые получены с помощью слияний ScFv. Затем два моноспецифических scfv независимо соединяют с Fc-доменами, которые могут образовывать стабильные гетеродимеры, с получением одной биспецифической молекулы (Mabry et al., PEDS 23:3 115-127 (2010)). Биспецифические молекулы обладают способностями к двойному связыванию.

[0062] "Антитело против сортилина" или "антитело к сортилину" (используемые в данном документе взаимозаменяемо в зависимости от контекста, в котором они написаны) представляет собой антитело его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с сортилином, и в особенности с областью D сортилина, **SEQ ID NO:170**. Антитело к сортилину, которое связывается с областью D сортилина, обычно будет связываться с конформационным эпитопом или линейным эпитопом из 3, 4, 5, 6 или 7 последовательных аминокислот, расположенных в пределах области D (например, **SEQ ID NO:185, 186 или 187**), с аффинностью (IC₅₀), составляющей 22 нМ или меньше, как, например, от 22 нМ до 1 нМ, от 10 нМ до 1 нМ или от 5 нМ до 1 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к сортилину могут также связываться с областью A (**SEQ ID NO:180, 181, 182, 183 или 184**), однако следует подчеркнуть, что их основная биологическая функция, как полагают, достигается за счет связывания с областью D.

[0063] Идентифицированный сайт связывания является довольно уникальным, как показано на примере связывания селективного лиганда AF38469,

являющегося малой молекулой, с сортилином. Было показано, что сайт связывания AF38469 аналогичен сайту связывания нейротензина, и его характеризовали с помощью рентгеновской кристаллографии (Schröder *et al.* Bioorg Med Chem Lett. 2014 Jan 1;24(1):177-80). Сообщалось, что PGRN связывается с тем же сайтом (Lee *et al.* Hum Mol Genet. 2013). Антитела 45 и 68, связывающиеся с областью D и D⁺ соответственно, не подавляли связывание AF38469 с сортилином. Эти данные свидетельствуют о том, что эти антитела имеют сайт связывания сортилина, отличный от сайта связывания AF38469 и нейротензина. Следовательно, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, способным специфически связываться с сортилином и подавлять связывание PGRN с сортилином, но при этом их связывание не подавляет или не подавляет в значительной степени связывание нейротензина или AF38469 с сортилином. Это может быть показано с помощью, например, смещения связывания с сортилином с применением сцинтилляционного анализа сближения (SPA) (пример 11). Один из способов объяснения этого результата может заключаться в том, что антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с поверхностными участками сортилина, тогда как малые молекулы, такие как нейротензин, связываются внутри связывающего кармана.

[0064] Используемый в данном документе термин “антитело человека” (который может сокращенно называться “humAb” или “HuMab”) подразумевают как включающий антитела, имеющие переменные и константные домены, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro*, или во время перестройки гена, или с помощью соматической мутации *in vivo*).

[0065] Используемые в данном документе термины “моноклональное антитело” или “композиция на основе моноклональных антител” относятся к препарату из молекул антител единого молекулярного состава. Традиционная композиция на основе моноклональных антител характеризуется единой

специфичностью связывания и аффинностью к конкретному эпитопу. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело может состоять из более чем одного Fab-домена, за счет чего повышается специфичность более чем к одной мишени. Термины "моноклональное антитело" или

5 "композиция на основе моноклональных антител" не подразумеваются как ограниченные каким-либо конкретным способом получения (например, рекомбинантным, трансгенным, гибридным и т. п.).

[0066] Антитела по настоящему изобретению и их фрагменты, связывающие антиген сортилина, предпочтительно будут представлять собой человеческие или,

10 например, мышинные антитела (обозначенные 1F2, 5E1), в частности "гуманизированные" в случае использования в терапевтических целях. Термин "гуманизированный" относится к молекуле, получаемой, как правило, с использованием рекомбинантных методик, которая имеет антигенсвязывающий сайт, полученный из иммуноглобулина от вида, отличного от человека, и

15 остальную часть структуры иммуноглобулина, в основе которой лежит структура и/или последовательность иммуноглобулина человека. Антигенсвязывающий сайт может содержать либо полные переменные домены антитела, отличного от человеческого, слитые с человеческими константными доменами, либо только определяющие комплементарность области (CDR) таких переменных доменов,

20 привитые на соответствующие человеческие каркасные области человеческих переменных доменов. Остатки каркасных областей таких гуманизированных молекул могут быть дикого типа (например, полностью человеческими), или они могут быть модифицированы так, чтобы содержать одну или несколько аминокислотных замен, которые не встречаются в антителе человека,

25 последовательность которого послужила основой для гуманизации. Гуманизация уменьшает или устраняет вероятность того, что константный домен молекулы будет действовать в качестве иммуногена у людей, однако возможность выработки иммунного ответа на чужеродный переменный домен сохраняется (LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224).

30 Другой подход фокусируется не только на получении константных доменов человеческого происхождения, но также и на модификации переменных

доменов таким образом, чтобы реконструировать их как можно более близко к человеческой форме. Известно, что переменные домены как тяжелой, так и легкой цепей содержат три определяющие комплементарность области (CDR), которые различаются по ответу на рассматриваемые антигены и определяют возможность связывания, фланкированные четырьмя каркасными областями (FR), которые являются относительно консервативными у данного вида и которые предположительно обеспечивают остов для CDR. Если отличные от человеческих антитела получают к конкретному антигену, переменные домены можно “реконструировать” или “гуманизировать” путем прививания CDR, полученных из антитела, отличного от человеческого, на FR, присутствующие в подлежащем модификации антителе человека. О применении такого подхода к различным антителам сообщалось в Sato, K. *et al.* (1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L. *et al.* (1988) “*Reshaping Human Antibodies for Therapy*”, *Nature* 332:323-327; Verhoeven, M. *et al.* (1988) “*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*”, *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) “*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation*”, *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H. *et al.* (1991) “*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity*”, *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) “*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185; Tempest, P.R. *et al.* (1991) “*Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo*”, *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S. *et al.* (1991) “*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:2869-2873; Carter, P. *et al.* (1992) “*Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:4285-4289 и Co, M.S. *et al.* (1992) “*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen*”, *J. Immunol.* 148:1149-1154. В некоторых вариантах осуществления в гуманизированных антителах сохраняются все последовательности CDR (например, в гуманизированном антителе мыши, которое содержит все шесть CDR антител мыши). В других вариантах осуществления гуманизированные антитела имеют один или несколько CDR (один, два, три, четыре, пять, шесть), которые изменены относительно исходного антитела и которые также называют

одним или несколькими CDR, “полученными из” одного или нескольких CDR исходного антитела. Возможность гуманизации антигена хорошо известна (см., например, патенты США №№ 5225539, 5530101, 5585089, 5859205, 6407213, 6881557).

- 5 [0067] Термин “антитело “XX” подразумевается как означающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, антитело “5E1”), содержащие легкую цепь, переменный домен легкой цепи или CDR1-3 переменного домена легкой цепи, определенные по их соответствующему SEQ ID NO, и тяжелую цепь, переменный домен тяжелой цепи или CDR1-3 переменного домена тяжелой
- 10 цепи, определенные по их соответствующему SEQ ID NO, или состоящие из них. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент определены содержащимися в них полным переменным доменом тяжелой цепи, определенным по его SEQ ID NO, и переменным доменом легкой цепи, определенным по его SEQ ID NO.

15

- [0068] Нумерация аминокислотных остатков в этой области соответствует IMGT®, международной информационной системе ImMunoGeneTics® или Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesmann, K. S. & Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е издание, U.S. Department of Health and Human Services, публикация NIH № 91-3242; Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987). Canonical structures For The Hypervariable domains Of Immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196, 901-917.

- [0069] Как используется в данном документе, говорят, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент “специфически” связываются с областью другой
- 25 молекулы (т. е. эпитопом), если они реагируют или ассоциируют с этим эпитопом чаще, быстрее, с большей длительностью и/или с большей аффинностью или авидностью по сравнению с альтернативными эпитопами. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связываются по меньшей мере в 10 раз сильнее со своей мишенью
- 30 (сортилином), чем с другой молекулой; предпочтительно по меньшей мере в 50 раз сильнее и более предпочтительно по меньшей мере в 100 раз сильнее. Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются

в физиологических условиях, например, *in vivo*. Таким образом, под “специфическим связыванием с сортилином” подразумевается способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с сортилином с такой специфичностью и/или в таких условиях. Способы, подходящие для

5 определения такого связывания, будут известны специалистам в данной области техники, и иллюстративные способы описаны в прилагаемых примерах. Используемый в данном документе термин “связывание” в контексте связывания антитела с предварительно определенным антигеном обычно относится к связыванию с аффинностью, соответствующей KD, составляющей

10 приблизительно 10^{-7} М или меньше, как, например, приблизительно 10^{-8} М или меньше, как, например, приблизительно 10^{-9} М или меньше, при определении с помощью, например, технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore® 3000 либо T200 с применением антигена в качестве лиганда и антитела в качестве анализируемого вещества, и к связыванию с предварительно

15 определенным антигеном с аффинностью, соответствующей KD, по меньшей мере в десять раз более низкой, как, например, по меньшей мере в 100 раз более низкой, например, по меньшей мере в 1000 раз более низкой, как, например, по меньшей мере в 10000 раз более низкой, например, по меньшей мере в 100000 раз более низкой, чем его аффинность при связывании с неспецифическим антигеном

20 (например, BSA, казеином), отличным от предварительно определенного антигена, или близкородственным антигеном. Степень, на которую аффинность является более низкой, зависит от KD антитела, так что если KD антитела является очень низкой (то есть антитело является высокоспецифическим), то степень, на которую аффинность к антигену является более низкой, чем

25 аффинность к неспецифическому антигену, может быть по меньшей мере 10000-кратной. В частности, настоящее изобретение относится к антителам к сортилину, которые проявляют аффинность связывания, составляющую 22 нМ или меньше, как, например, от 22 нМ до 1 нМ, от 10 нМ до 1 нМ или от 5 нМ до 1 нМ, при определении, например, с помощью интерферометрии биослоя с применением

30 Octet 384RED (**пример 8**).

[0070] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему

фрагменту, способным конкурировать с humAb антителом 45 или humAb антителом 68 за связывание с сортилином. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые способны конкурировать с антителом 45 за связывание с областью D сортилина, определенной в **SEQ ID NO:170**. Такое конкурентное подавление связывания можно определить с помощью анализов и способов, хорошо известных из уровня техники, например, с применением чипов BIAcore® с иммобилизованным сортилином человека и инкубации с эталонным антителом (таким как антитело “45” или “68”) с полипептидом антитела, подлежащим тестированию, или без него. В качестве альтернативы можно применять подход попарного картирования, при котором эталонное антитело (такое как антитело “45” или “68”) иммобилизуют на поверхности чипа BIAcore®, при этом антиген сортилина человека связывается с иммобилизованным антителом, а затем второе антитело тестируют в отношении способности одновременного связывания с человеческим сортилином (см. ‘Руководство по анализу BIAcore®’, GE Healthcare Life Sciences, 29-0194-00 AA 05/2012; раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки).

[0071] Используемый в данном документе термин " k_d " (s^{-1} или $1/s$) относится к константе скорости диссоциации для конкретного взаимодействия антитела и антигена. Указанное значение также называют значением k_{off} .

[0072] Используемый в данном документе термин " k_a " ($M^{-1} \times s^{-1}$ или $1/M \cdot s$) относится к константе скорости ассоциации для конкретного взаимодействия антитела и антигена.

[0073] Используемый в данном документе термин " K_D " (M) относится к равновесной константе диссоциации для конкретного взаимодействия антитела и антигена, получаемой путем деления k_d на k_a .

[0074] Используемый в данном документе термин " K_A " (M^{-1} или $1/M$) относится к равновесной константе ассоциации для конкретного взаимодействия антитела и антигена, получаемой путем деления k_a на k_d .

[0075] В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые проявляют одно или несколько из следующих свойств:

- (i) аффинность связывания (K_D) с сортилином, составляющую 0,5-10 нМ, как, например, 1-5 нМ или 1-2 нМ;
- (ii) способность снижать и/или подавлять связывание PGRN с сортилином;
- (iii) способность снижать и/или подавлять выведение PGRN клетками, экспрессирующими сортилин;
- (iv) способность снижать и/или подавлять эндоцитоз PGRN клетками, экспрессирующими сортилин;
- (v) способность повышать количество и/или концентрацию PGRN в плазме крови у мышей с нокином, за счет которого у них экспрессируется сортилин человека.

[0076] Под термином “способность снижать и/или подавлять связывание PGRN с сортилином” подразумевается антитело, которое обладает способностью подавлять связывание с PGRN при значении IC_{50} , составляющем менее 50 нМ, но предпочтительно от 10 нМ до 0,2 нМ, которое определяют с помощью флуоресцентного анализа с временным разрешением (HTFR), раскрытого в **примере 10**.

[0077] Под термином “способность снижать и/или подавлять выведение PGRN клетками, экспрессирующими сортилин” подразумевается способность повышать концентрацию PGRN в среде по меньшей мере на 25%, как, например, от 25% до 500%, от 25% до 400% или от 25% до 200%, что измеряют с помощью анализа ELISA, как раскрыто в **примере 13**.

[0078] Под “способностью снижать и/или подавлять эндоцитоз PGRN клетками, экспрессирующими сортилин” подразумевается способность снижать внутриклеточную концентрацию PGRN по меньшей мере на 10%, но предпочтительно от 20 до 100%, что измеряют с помощью анализа, основанного на целломике, как раскрыто в **примере 12**.

[0079] Под “способностью повышать количество и/или концентрацию PGRN в плазме крови у мышей с нокином, за счет которого у них экспрессируется сортилин человека” подразумевается способность повышать концентрацию PGRN в плазме крови по меньшей мере на 25%, но предпочтительно от 50 до 500 процентов, что измеряют с помощью анализа ELISA, как раскрыто в **примере 15**.

[0080] Предусматривается, что способность повышать уровень PGRN в головном мозге можно также анализировать, например, с помощью микродиализа. Таким образом, под “способностью повышать количество и/или концентрацию PGRN в головном мозге” подразумевается способность повышать

5 концентрацию PGRN в головном мозге по меньшей мере на 25%, но предпочтительно от 50 до 500 процентов, что измеряют с помощью микродиализа.

[0081] В некоторых антителах для сохранения связывания в гуманизированном антителе необходима лишь часть CDR, а именно

10 подмножество остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR. Остатки CDR, не контактирующие с соответствующим эпитопом и не содержащиеся в SDR, можно идентифицировать на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDR H2 часто не являются необходимыми), из областей CDR по Kabat, лежащих за пределами

15 гипервариабельных петель по Chothia (см. Kabat *et al.* (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health, публикация № 91-3242; Chothia, C. *et al.* (1987) “*Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins*”, J. Mol. Biol. 196:901-917), с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем или согласно

20 описанному в Gonzales, N.R. *et al.* (2004) “*SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity*”, Mol. Immunol. 41:863-872. В таких гуманизированных антителах в положениях, в которых отсутствуют один или несколько остатков донорного CDR или в которых весь донорный CDR пропущен, аминокислота, занимающая положение, может

25 представлять собой аминокислоту, занимающую соответствующее положение (согласно нумерации по Kabat) в акцепторной последовательности антитела. Количество таких замен акцепторных аминокислот на донорные в CDR, которые нужно включить, отражает баланс альтернативных мнений. Такие замены являются потенциально преимущественными для снижения количества мышинных

30 аминокислот в гуманизированном антителе и снижения вследствие этого потенциальной иммуногенности. Тем не менее, замены также могут обуславливать изменения аффинности, и значительного уменьшения значений

аффинности предпочтительно избегают. Положения для замены в пределах CDR и подлежащие замене аминокислоты также можно выбрать эмпирическим путем.

[0082] Тот факт, что изменение одной аминокислоты в остатке CDR может привести к утрате функционального связывания (Rudikoff, S. *etc.* (1982) “*Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity*”, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6):1979-1983), обеспечивает возможность систематической идентификации альтернативных функциональных последовательностей CDR. В одном предпочтительном способе получения таких вариантов CDR полинуклеотид, кодирующий CDR, подвергают мутации (например, посредством случайного мутагенеза или с помощью сайт-направленного способа (например, с амплификацией, опосредованной полимеразной цепной реакцией, с праймерами, которые кодируют мутантный локус)) с получением CDR, имеющего замененный аминокислотный остаток. Путем сравнения идентичности исходной (функциональной) последовательности CDR по соответствующему остатку с идентичностью варианта последовательности CDR с заменой (нефункционального) для этой замены можно определить вес замены согласно BLOSUM62.iiij. В системе BLOSUM представлена матрица аминокислотных замен, создаваемая путем анализа базы данных последовательностей в отношении достоверных выравниваний (Eddy, S.R. (2004) “*Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?*”, Nature Biotech. 22(8):1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) “Amino acid substitution matrices from protein blocks”, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:10915-10919; Karlin, S. *et al.* (1990) “*Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes*”, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) “*Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective*”, J. Mol. Biol. 219, 555-565. В настоящее время наиболее совершенной базой данных BLOSUM является база данных BLOSUM62 (BLOSUM62.iiij). В **таблице 1** представлены значения веса замен согласно BLOSUM62.iiij (чем больше вес, тем более консервативной является замена и, следовательно, более вероятно, что замена не будет влиять на функцию). Если, например, антигенсвязывающий фрагмент, содержащий полученный в результате CDR, не может связываться с сортилином, то полагают, что вес замены согласно BLOSUM62.iiij свидетельствует о ее

недостаточной консервативности, и выбирают и производят новую замену-кандидата, имеющую больший вес замены. Так, например, если исходный остаток представлял собой глутамат (E), а нефункциональный заменяющий остаток представлял собой гистидин (H), то вес замены согласно BLOSUM62.ii будет равен 0, а более консервативные изменения (например, аспартат, аспарагин, глутамин или лизин) являются предпочтительными.

Таблица 1

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

[0083] Таким образом, настоящее изобретение предусматривает применение случайного мутагенеза для идентификации улучшенных CDR. В контексте настоящего изобретения консервативные замены могут быть определены как

замены в пределах классов аминокислот, отраженных в одной или нескольких из следующих трех таблиц.

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Таблица 2	
Кислые остатки	Asp (D) и Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R) и His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) и Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M) и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W)

Альтернативные классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Таблица 3			
1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Таблица 4	
Остатки, содержащие спиртовую группу	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Остатки, связанные с циклоалкенилом	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Маленькие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V

Очень маленькие остатки	A, G и S
Остатки, участвующие в образовании изгиба	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E и R

[0084] Группы более консервативных замен включают валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин.

[0085] Дополнительные группы аминокислот также могут быть составлены с применением принципов, описанных, например, в Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Company.

[0086] В качестве альтернативы можно применять технологию фагового дисплея для повышения (или снижения) аффинности CDR. В этой технологии, называемой созревaniem аффинности, используется мутагенез или “прогулка по CDR” и повторный отбор с применением антигена-мишени или его антигенного антигенсвязывающего фрагмента для идентификации антител, имеющих CDR, которые связываются с более высокой (или более низкой) аффинностью с антигеном по сравнению с первоначальным или исходным антителом (см., например, Glaser *et al.* (1992) *J. Immunology* 149:3903). Мутагенез целых кодонов, а не отдельных нуклеотидов, приводит к получению полуслучайного набора аминокислотных мутаций. Можно конструировать библиотеки, состоящие из пула вариантов клонов, каждый из которых отличается изменением одной аминокислоты в одном CDR и который содержит варианты, представляющие каждую возможную аминокислотную замену для каждого остатка CDR. Мутанты с повышенной (или пониженной) аффинностью связывания с антигеном можно подвергнуть скринингу путем приведения в контакт иммобилизованных мутантов с меченым антигеном. Для идентификации мутантных антител с повышенной или пониженной аффинностью к антигену можно применять любой известный из уровня техники способ скрининга (например, ELISA) (см. Wu *et al.* 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 95:6037; Yelton *et al.*, 1995, *J. Immunology* 155:1994). Возможно также применять “прогулку по CDR”, в ходе которой легкая цепь подвергается случайному мутагенезу (см. Schier *et al.*, 1996, *J. Mol. Bio.* 263:551).

[0087] Способы осуществления такого созревания аффинности описаны, например, в Krause, J.C. *et al.* (2011) “*An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody*”, MBio. 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. *et al.* (2010) “*Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas*”, Int. J. Cancer 10.1002/ijc.25645; Hackel, B.J. *et al.* (2010) “*Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes*”, J. Mol. Biol. 401(1):84-96; Montgomery, D.L. *et al.* (2009) “*Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41*”, MAbs 1(5):462-474; Gustchina, E. *et al.* (2009) “*Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naïve Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth*”, Virology 393(1):112-119; Finlay, W.J. *et al.* (2009) “*Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions*”, J. Mol. Biol. 388(3):541-558; Bostrom, J. *et al.* (2009) “*Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development*”, Methods Mol. Biol. 525:353-376; Steidl, S. *et al.* (2008) “*In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification*”, Mol. Immunol. 46(1):135-144; и Barderas, R. *et al.* (2008) “*Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling*”, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105(26):9029-9034.

[0088] Таким образом, последовательность вариантов CDR охватываемых антител или их антигенсвязывающих фрагментов может отличаться от последовательности CDR исходного антитела благодаря заменам; например, замененным 4 аминокислотным остаткам, 3 аминокислотным остаткам, 2 аминокислотным остаткам или 1 аминокислотному остатку. В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения дополнительно предусматривается то, что аминокислоты в CDR-областях можно заменять посредством консервативных замен, определенных в 3 таблицах ниже.

[0089] Термин "трансгенное животное, отличное от человека" относится к животному, отличному от человека, имеющему геном, содержащий один или несколько человеческих трансгенов или трансхромосом, кодирующих тяжелую и/или легкую цепи (интегрированных или не интегрированных в природную геномную ДНК животного), которое способно экспрессировать полностью человеческие антитела. Например, трансгенная мышь может иметь трансген, кодирующий человеческую легкую цепь, и либо трансген, кодирующий человеческую тяжелую цепь, либо трансхромосому, кодирующую человеческую тяжелую цепь, вследствие чего у мыши вырабатывается человеческое антитело к сортилину при иммунизации антигеном сортина и/или клетками, экспрессирующими сортин. Трансген, кодирующий человеческую тяжелую цепь, может быть интегрирован в хромосомную ДНК мыши, как в случае с трансгенными мышами, например, мышами HuMAb, такими как мыши HCo7 или HCo12, или трансген, кодирующий человеческую тяжелую цепь, может сохраняться внехромосомно, как в случае с трансхромосомными мышами КМ, описанными в WO02/43478. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши (в совокупности называемые в данном документе "трансгенными мышами") способны вырабатывать несколько изотипов моноклональных антител человека к данному антигену (таких как IgG, IgA, IgM, IgD и/или IgE), подвергаясь V-D-J-рекомбинации и переключению изотипа.

[0090] Трансгенное животное, отличное от человека, также можно использовать для получения антител к специфическому антигену путем введения генов, кодирующих такое специфичное антитело, например, путем формирования функциональной связи генов с геном, экспрессируемым в молоке животного.

[0091] Используемый в данном документе термин "лечение" или "осуществление лечения" означает облегчение, замедление, ослабление или устранение прогрессирования или тяжести заболевания или нарушения или облегчение, замедление, ослабление или устранение одного или нескольких симптомов или побочных эффектов такого заболевания или нарушения. Для целей настоящего изобретения "лечение" или "осуществление лечения" дополнительно означает подход для получения благоприятных или желаемых клинических результатов, где "благоприятные или желаемые клинические

результаты” включают без ограничения уменьшение интенсивности проявления симптома, снижение степени тяжести нарушения или заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие усугубления) состояния заболевания или нарушения, задержку или замедление прогрессирования состояния заболевания или нарушения, 5 облегчение или смягчение состояния заболевания или нарушения и ремиссию заболевания или нарушения, независимо от того являются ли они частично или полностью выявляемыми либо невыявляемыми.

[0092] “Эффективное количество”, применяемое в отношении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, относится к 10 количеству, которое при введении в необходимых дозах и в течение необходимых периодов времени является достаточным для достижения намеченного биологического эффекта или желаемого терапевтического результата, в том числе без ограничения клинических результатов. Фраза “терапевтически эффективное количество”, применяемая в отношении антитела или его антигенсвязывающего 15 фрагмента по настоящему изобретению, подразумевается как означающая количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое является достаточным для облегчения, смягчения, стабилизации, устранения, замедления, ослабления или задержки прогрессирования нарушения или болезненного состояния или симптома нарушения или заболевания. В одном варианте 20 осуществления способ по настоящему изобретению предусматривает введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинациях с другими соединениями. В таком случае “эффективное количество” представляет собой количество комбинации, достаточное для того, чтобы вызывать намеченный биологический эффект.

25 [0093] Терапевтически эффективное количество антитела к сортилину или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может меняться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность антитела к сортилину или его антигенсвязывающего фрагмента вызывать желаемый ответ у индивидуума. 30 Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтически благоприятные эффекты превосходят любые токсические или пагубные эффекты антитела или части антитела.

[0094] Антитела предпочтительно представляют собой человеческое или гуманизированное антитело.

- 5 [0095] Нумерация аминокислотных остатков в этой области соответствует IMGT®, международной информационной системе ImMunoGeneTics® или Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesmann, K. S. & Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е издание, U.S. Department of Health and Human Services, публикация NIH № 91-3242; Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987). Canonical structures For The Hypervariable domains Of Immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196, 901-917.

Антитело 5E1

[0096] Соответственно, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

- 15 (a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 1**;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 2**;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 3**;
- 20 (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 4**;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 5**; и
- 25 (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 6**, или состоящим из них.

[0097] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:8** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:7** или состоять из них.

Антитело 1F2

[0098] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

- 5 (a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 9**;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 10**;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ**
10 **ID NO: 11**;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 12**;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 13**; и
- 15 (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 14**, или состоящим из них.

[0099] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:16** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:15** или состоять из них.

20 Антитело 068

[00100] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ**
25 **ID NO: 17**;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 18**;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 19**;
- 30 (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 20**;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 21**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 22**, или состоящим из них.

- 5 [00101] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:24** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:23** или состоять из них.

Антитело 1320

- 10 [00102] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

(a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 25**;

- 15 (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 26**;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 27**;

(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 28**;

- 20 (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 29**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 30**, или состоящим из них.

- 25 [00103] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:32** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:31** или состоять из них.

Антитело 93-05

- 30 [00104] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

(a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 33**;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 34**;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 35**;

5 (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 36**;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 37**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 38**, или состоящим из них.

[00105] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:40** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:39** или состоять из них.

Антитело 93-01

15 [00106] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

(a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 41**;

20 (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 42**;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 43**;

(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 44**;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 45**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 46**, или состоящим из них.

30 [00107] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:48** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:47** или состоять из них.

Антитело 924

[00108] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

- 5 (a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 49**;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 50**;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ**
10 **ID NO: 51**;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 52**;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 53**; и
- 15 (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 54**, или состоящим из них.

[00109] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:56** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:55** или состоять из них.

20 **Антитело 1276**

[00110] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ**
25 **ID NO: 57**;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 58**;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 59**;
- 30 (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 60**;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 61**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 62**, или состоящим из них.

- 5 [00111] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:64** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:63** или состоять из них.

Антитело 849

- 10 [00112] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

(a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 65**;

- 15 (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 66**;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 67**;

(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 68**;

- 20 (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 69**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 70**, или состоящим из них.

- 25 [00113] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:72** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:71** или состоять из них.

Антитело 531-02

- 30 [00114] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

(a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 73**;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 74**;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 75**;

5 (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 76**;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 77**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 78**, или состоящим из них.

[00115] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:80** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:79** или состоять из них.

Антитело 548-01

15 [00116] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

(a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 81**;

20 (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 82**;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 83**;

(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 84**;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 85**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 86**, или состоящим из них.

30 [00117] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:88** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:87** или состоять из них.

Антитело 548-02

[00118] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

- 5 (a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 89**;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 90**;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ**
10 **ID NO: 91**;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 92**;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 93**; и
- 15 (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 94**, или состоящим из них.

[00119] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:96** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:95** или состоять из них.

20 Антитело 1289-02

[00120] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ**
25 **ID NO: 97**;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 98**;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 99**;
- 30 (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 100**;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 101**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 102**, или состоящим из них.

- 5 [00121] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:104** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:103** или состоять из них.

Антитело 811-02

- 10 [00122] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

(a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 105**;

- 15 (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 106**;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 107**;

(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 108**;

- 20 (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 109**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 110**, или состоящим из них.

- 25 [00123] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:112** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:111** или состоять из них.

Антитело 566-01

- 30 [00124] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

(a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 113**;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 114**;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 115**;

5 (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 116**;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 117**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 118**, или состоящим из них.

[00125] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:120** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:119** или состоять из них.

Антитело 562

15 [00126] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

(a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 121**;

20 (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 122**;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 123**;

(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 124**;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 125**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 126**, или состоящим из них.

30 [00127] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:128** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:127** или состоять из них.

Антитело 193

[00128] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

- 5 (a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 129**;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 130**;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ**
10 **ID NO: 131**;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 132**;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 133**; и
- 15 (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 134**, или состоящим из них.

[00129] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:136** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:135** или состоять из них.

20 **Антитело 88**

[00130] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ**
25 **ID NO: 137**;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 138**;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 139**;
- 30 (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 140**;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 141**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 142**, или состоящим из них.

- 5 [00131] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:144** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:143** или состоять из них.

Антитело 045

- 10 [00132] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

(a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 145**;

- 15 (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 146**;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 147**;

(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 148**;

- 20 (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 149**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 150**, или состоящим из них.

- 25 [00133] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:152** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:151** или состоять из них.

Антитело 044

- 30 [00134] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

(a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 153**;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 154**;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 155**;

5 (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 156**;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 157**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 158**, или состоящим из них.

[00135] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:160** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:159** или состоять из них.

Антитело 002

15 [00136] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим

(a) CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 161**;

20 (b) CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 162**;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 163**;

(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 164**;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 165**; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 166**, или состоящим из них.

30 [00137] Предпочтительно, моноклональное антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи с **SEQ ID NO:168** и переменный домен легкой цепи с **SEQ ID NO:167** или состоять из них.

[00138] В соответствии с одним вариантом осуществления антитела, упомянутые выше, могут дополнительно содержать вариант с не более чем 4 отличиями в аминокислотах, или не более чем 3 отличиями в аминокислотах, или не более чем 2 отличиями в аминокислотах, или не более чем 1 отличием в аминокислотах по сравнению с указанными последовательностями CDR1, CDR2 и/или CDR3 (VH и/или VL).

[00139] Кроме того, антитела могут быть представлены в композиции вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Антитела по настоящему изобретению можно применять в терапии. В частности, антитела по настоящему изобретению можно применять при лечении FTD, или ALS, или протеинопатий TDP43, как, например, болезнь Альцгеймера (AD).

[00140] Лечение, предусматриваемое настоящим изобретением, может быть долгосрочным, и пациент может получать лечение по меньшей мере в течение 2 недель, как, например, в течение по меньшей мере 1 месяца, 6 месяцев, 1 года или дольше.

[00141] Антитела по настоящему изобретению могут представлять собой, например, моноклональные антитела, получаемые с помощью гибридного способа, впервые описанного в Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), или могут представлять собой моноклональные антитела, получаемые с помощью рекомбинантных ДНК или других способов. Моноклональные антитела также можно выделять из фаговых библиотек антител с помощью методик, описанных, например, в Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991). Моноклональные антитела можно получать из любого подходящего источника. Так, например, моноклональные антитела можно получить из гибридом, полученных из В-лимфоцитов селезенки мыши, полученных от мышей, иммунизированных представляющим интерес антигеном, например, в виде клеток, экспрессирующих антиген на поверхности, или нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес антиген. Моноклональные антитела также можно получать из гибридом, полученных из клеток, экспрессирующих антитела, от иммунизированных людей или млекопитающих, отличных от человека, таких как крысы, кролики, собаки, овцы, козы, приматы и т. д.

[00142] В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело человека. Моноклональные антитела человека, направленные против сортилина, можно получать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека вместо системы мыши. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, называемых в данном документе мышами HuMAb и мышами КМ соответственно.

[00143] Мышь HuMAb содержит минилокус гена иммуноглобулина человека, который кодирует нереаранжированные последовательности переменных и константных доменов тяжелых цепей (μ и γ) и переменных и константных доменов легких цепей (κ) иммуноглобулина человека, вместе с целевыми мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы, кодирующие μ - и κ -цепи (Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)). Соответственно, у мышей проявляется пониженная экспрессия IgM или IgK, и в ответ на иммунизацию введенные трансгены, кодирующие человеческую тяжелую и легкую цепи, подвергаются переключению класса и соматической мутации с образованием высокоаффинных моноклональных антител IgG человека κ -изотипа (Lonberg, N. et al. (1994), выше; обзор которых приведен в Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. том 13, 65-93 (1995) и Harding, F. and Lonberg, N., Ann. N. Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)). Получение мышей HuMAb подробно описано в Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993), Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). См. также US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5789650, US 5877397, US 5661016, US 5814318, US 5874299, US 5770429, US 5545807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 и WO 01/09187.

[00144] Мыши HCo7, HCo12, HCo17 и HCo20 имеют JKD-разрушение в своих эндогенных генах легких цепей (каппа) (описанное в Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)), CMD-разрушение в своих эндогенных генах тяжелых цепей (описанное в **примере 1** WO 01/14424) и трансген KCo5, кодирующий

человеческую легкую каппа-цепь (описанный в Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)). Дополнительно, мыши HCo7 имеют трансген HCo7, кодирующий человеческую тяжелую цепь (описанный в US 5770429), мыши HCo12 имеют трансген HCo12, кодирующий человеческую тяжелую цепь (описанный в **примере 2** WO 01/14424), мыши HCo17 имеют трансген HCo17, кодирующий человеческую тяжелую цепь (описанный в **примере 2** WO 01/09187), а мыши HCo20 имеют трансген HCo20, кодирующий человеческую тяжелую цепь. Полученные в результате мыши экспрессируют трансгены, кодирующие тяжелую и легкую каппа-цепи иммуноглобулина человека в генетическом окружении, гомозиготном в отношении разрушения эндогенных локусов мышинной тяжелой и легкой каппа-цепей.

[00145] У мышей линии KM эндогенный ген мышинной легкой каппа-цепи был подвергнут гомозиготному разрушению, как описано в Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993), и эндогенный ген мышинной тяжелой цепи был подвергнут гомозиготному разрушению, как описано в **примере 1** WO 01/09187. Эта линия мышей несет трансген KCo5, кодирующий человеческую легкую каппа-цепь, описанный в Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Эта линия мышей также несет трансхромосому, кодирующую человеческую тяжелую цепь, состоящую из hCF-фрагмента хромосомы 14 (SC20), описанную в WO 02/43478. Мышей HCo12-Balb/c, HCo17-Balb/c и HCo20-Balb/c можно получить путем скрещивания HCo12, HCo17 и HCo20 с KCo5[J/K](Balb), как описано в WO 09/097006.

[00146] У мышей линии KM эндогенный ген мышинной легкой каппа-цепи был подвергнут гомозиготному разрушению, как описано в Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993), и эндогенный ген мышинной тяжелой цепи был подвергнут гомозиготному разрушению, как описано в **примере 1** WO 01/09187. Эта линия мышей несет трансген KCo5, кодирующий человеческую легкую каппа-цепь, описанный в Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Эта линия мышей также несет трансхромосому человеческой тяжелой цепи, состоящую из антигенсвязывающего фрагмента hCF (SC20) хромосомы 14, описанного в WO 02/43478.

[00147] Спленоциты от этих трансгенных мышей можно применять для получения гибридом, которые секретируют моноклональные антитела человека, в соответствии с хорошо известными методиками. Моноклональные или поликлональные антитела человека по настоящему изобретению или антитела по настоящему изобретению, происходящие от других видов, также можно получать трансгенным путем посредством получения другого млекопитающего, отличного от человека, или растения, являющегося трансгенным по представляющим интерес последовательностям тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, и получения из него антитела в извлекаемой форме. Что касается получения антител у млекопитающих трансгенным путем, антитела могут быть получены в молоке коз, коров или других млекопитающих и извлечены из него. См., например, US 5827690, US 5756687, US 5750172 и US 5741957.

[00148] Антитело по настоящему изобретению может относиться к любому изотипу. Выбор изотипа обычно будет определяться желаемыми эффекторными функциями, такими как индукция ADCC. Иллюстративными изотипами являются IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Можно использовать константные домены любой из человеческих легких цепей каппа- или лямбда-типа. При желании класс антитела к сортилину по настоящему изобретению можно переключить с помощью известных способов. Например, антитело по настоящему изобретению, которое изначально представляло собой IgM, можно подвергнуть переключению класса на антитело IgG по настоящему изобретению. Дополнительно, методики переключения класса можно применять для превращения одного подкласса IgG в другой, например из IgG1 в IgG2. Таким образом, эффекторную функцию антител по настоящему изобретению можно изменить путем переключения изотипа, например, на антитело IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM для различных терапевтических путей применения. В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело IgG1, например, IgG1 к-изотипа. Считают, что антитело относится к конкретному изотипу, если его аминокислотная последовательность наиболее гомологична такому изотипу по сравнению с другими изотипами.

[00149] В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой полноразмерное антитело, предпочтительно

антитело IgG, в частности, антитело IgG1 к-изотипа. В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела или одноцепочечное антитело.

[00150] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты можно получать,

5 например, путем разделения на антигенсвязывающие фрагменты с применением традиционных методик, а антигенсвязывающие фрагменты подвергать скринингу в отношении полезности таким же образом, как описано в данном документе для полных антител. Например, антигенсвязывающие F(ab')₂-фрагменты можно получать путем обработки антитела пепсином. Полученный в результате

10 антигенсвязывающий F(ab')₂-фрагмент можно обработать для восстановления дисульфидных мостиков с получением антигенсвязывающих Fab'-фрагментов. Антигенсвязывающие Fab-фрагменты можно получать путем обработки антитела IgG папаином; антигенсвязывающие Fab'-фрагменты можно получать путем расщепления антитела IgG пепсином. Антигенсвязывающий F(ab')-фрагмент

15 также можно получать путем связывания описанного ниже Fab' с помощью тиоэфирной связи или дисульфидной связи. Антигенсвязывающий Fab'-фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела, полученный путем разрезания дисульфидной связи в шарнирном домене F(ab')₂. Антигенсвязывающий Fab'-фрагмент можно получать путем обработки

20 антигенсвязывающего F(ab')₂-фрагмента восстановителем, таким как дитиотреитол. Антигенсвязывающий фрагмент антитела также можно получить посредством экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих такие антигенсвязывающие фрагменты, в рекомбинантных клетках (см., например, Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)). Например, химерный ген, кодирующий часть антигенсвязывающего F(ab')₂-фрагмента, может включать

25 последовательности ДНК, кодирующие CH1-домен и шарнирный домен H-цепи, за которыми расположен стоп-кодон для остановки трансляции с получением такой усеченной молекулы антигенсвязывающего фрагмента антитела.

[00151] В одном варианте осуществления антитело к сортилину представляет

30 собой одновалентное антитело, предпочтительно одновалентное антитело, описанное в WO2007059782 (включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), имеющее делецию в шарнирной области.

Соответственно, в одном варианте осуществления антитело представляет собой
одновалентное антитело, где указанное антитело к сортилину сконструировано с
помощью способа, включающего i) обеспечение конструкции нуклеиновой
кислоты, кодирующей легкую цепь указанного одновалентного антитела, при
5 этом указанная конструкция содержит нуклеотидную последовательность,
кодирующую VL-область выбранного антиген-специфического антитела к
сортилину, и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную CL-
область Ig, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая VL-
область выбранного антиген-специфического антитела, и указанная нуклеотидная
10 последовательность, кодирующая CL-область Ig, функционально связаны друг с
другом, и где в случае с подтипом IgG1 нуклеотидная последовательность,
кодирующая CL-область, была модифицирована таким образом, чтобы CL-
область не содержал каких-либо аминокислот, способных образовывать
дисульфидные связи или ковалентные связи с другими пептидами, содержащими
15 идентичную аминокислотную последовательность CL-области, в присутствии
поликлонального IgG человека или при введении животному или человеку; ii)
обеспечение конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь
указанного одновалентного антитела, при этом указанная конструкция содержит
нуклеотидную последовательность, кодирующую VH-область выбранного
20 антиген-специфического антитела, и нуклеотидную последовательность,
кодирующую константную CH-область Ig человека, где нуклеотидная
последовательность, кодирующая CH-область, была модифицирована таким
образом, чтобы область, соответствующая шарнирной области и, как того требует
подтип Ig, другим областям CH-области, таким как CH3-область, не содержал
25 каких-либо аминокислотных остатков, участвующих в образовании
дисульфидных связей или ковалентных или стабильных нековалентных связей
между тяжелыми цепями с другими пептидами, содержащими идентичную
аминокислотную последовательность CH-области Ig человека, в присутствии
поликлонального IgG человека или при введении животному человеку, где
30 указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая VH-область
выбранного антиген-специфического антитела, и указанная нуклеотидная
последовательность, кодирующая CH-область указанного Ig, функционально

связаны друг с другом; iii) обеспечение клеточной системы экспрессии для получения указанного одновалентного антитела; iv) получение указанного одновалентного антитела путем совместной экспрессии конструкций нуклеиновых кислот из (i) и (ii) в клетках клеточной системы экспрессии из (iii).

5 [00152] Подобным образом, в одном варианте осуществления антитело к сортилину по настоящему изобретению представляет собой одновалентное антитело, которое содержит

(i) вариабельный домен антитела по настоящему изобретению, описанный в данном документе, или антигенсвязывающую часть указанного домена, и

10 (ii) СН-домен иммуноглобулина или его домен, содержащий СН2- и СН3-домены, где СН-домен или его домен был модифицирован таким образом, чтобы домен, соответствующий шарнирному домену и, если иммуноглобулин не относится к подтипу IgG4, другим доменам СН-домена, таким как СН3-домен, не содержал каких-либо аминокислотных остатков, способных образовывать дисульфидные связи с идентичным СН-доменом или другие ковалентные или стабильные нековалентные связи между тяжелыми цепями с идентичным СН-доменом в присутствии поликлонального IgG человека.

[00153] В дополнительном варианте осуществления тяжелая цепь одновалентного антитела была модифицирована таким образом, чтобы вся шарнирная область была подвергнута делеции.

20 [00154] В другом дополнительном варианте осуществления последовательность одновалентного антитела была модифицирована таким образом, чтобы она не содержала каких-либо акцепторных сайтов N-связанного гликозилирования.

25 [00155] Настоящее изобретение также включает “биспецифические антитела”, где область связывания антитела с сортилином (например, область связывания с сортилином моноклонального антитела к сортилину) является частью двухвалентного или поливалентного биспецифического остова, который нацеливается более чем на один эпитоп (например, второй эпитоп может включать в себя эпитоп рецептора, участвующего в активном транспорте, так что биспецифическое антитело будет проявлять улучшенный транцитоз через биологический барьер, такой как гематоэнцефалический барьер). Таким образом,

30

в другом дополнительном варианте осуществления одновалентный Fab антитела к сортилину может быть соединен с дополнительным Fab или scFv, которые нацеливаются на другой белок, с получением биспецифического антитела. Биспецифическое антитело может иметь двойную функцию, например

5 терапевтическую функцию, придаваемую связывающимся с сортилином доменом, и транспортную функцию, благодаря которой оно может связываться с молекулой рецептора для усиления переноса через биологический барьер, такой как гематоэнцефалический барьер.

[00156] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему

10 изобретению также включают одноцепочечные антитела. Одноцепочечные антитела представляют собой пептиды, в которых Fv-домены тяжелой и легкой цепей соединены друг с другом. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает одноцепочечный Fv (scFv), где тяжелая и легкая цепи в Fv антитела к сортилину по настоящему изобретению соединены с

15 помощью гибкого пептидного линкера (обычно длиной приблизительно 10, 12, 15 или больше аминокислотных остатков) в одну пептидную цепь. Способы получения таких антител описаны, например, в US 4946778, Pluckthun в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, том 113, под редакцией Rosenberg и Moore, Springer-Verlag, New York, стр. 269-315 (1994), Bird et al., Science 242, 423-

20 426 (1988), Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) и McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990). Одноцепочечное антитело может быть одновалентным, если используется только один VH и VL, двухвалентным, если используются два VH и VL, или поливалентным, если используется более двух VH и VL.

[00157] Описываемые в данном документе антитела к сортилину и их

25 антигенсвязывающие фрагменты можно модифицировать путем включения любого подходящего количества модифицированных аминокислот и/или ассоциаций с такими конъюгированными заместителями. Пригодность в данном контексте в общем определяется способностью по меньшей мере в значительной степени сохранять селективность в отношении сортилина и/или специфичность в

30 отношении сортилина, присущую недериватизированному исходному антителу к сортилину. Включение одной или нескольких модифицированных аминокислот может быть преимущественным, например, для увеличения периода полужизни

полипептида в сыворотке крови, уменьшения антигенности полипептида или повышения стабильности полипептида при хранении. Аминокислота(аминокислоты) поддается модификации, например, котрансляционно или посттрансляционно в ходе получения рекомбинантным

5 путем (например, N-связанное гликозилирование в мотивах N-X-S/T в ходе экспрессии в клетках млекопитающих), или поддается модификации с помощью синтетических способов. Неограничивающие примеры модифицированной аминокислоты включают гликозилированную аминокислоту, сульфатированную аминокислоту, пренилированную (например, фарнезилированную,

10 геранилгеранилированную) аминокислоту, ацетилированную аминокислоту, ацилированную аминокислоту, пегилированную аминокислоту, биотинилированную аминокислоту, карбоксилированную аминокислоту, фосфорилированную аминокислоту и т. п. В литературе представлено множество источников, подходящих в качестве руководства для специалиста по

15 модификации аминокислот. Примеры протоколов находятся в Walker (1998) Protein Protocols On CD-Rom, Humana Press, Totowa, NJ. Модифицированная аминокислота может быть выбрана, например, из гликозилированной аминокислоты, пегилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной

20 аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с липидным фрагментом, или аминокислоты, конъюгированной с органическим дериватизирующим средством.

[00158] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению также можно модифицировать химическим путем посредством ковалентного конъюгирования с полимером, например, для увеличения их

25 периода полужизни в кровотоке. Иллюстративные полимеры и способы присоединения их к пептидам приведены, например, в US 4766106, US 4179337, US 4495285 и US 4609546. Дополнительные иллюстративные полимеры включают полиоксиэтилированные полиолы и полиэтиленгликоль (PEG) (например, PEG с молекулярной массой от приблизительно 1000 до

30 приблизительно 40000, как, например, от приблизительно 2000 до приблизительно 20000, например, приблизительно 3000-12000 г/моль).

[00159] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно дополнительно применять в способе диагностики или в качестве диагностического визуализирующего лиганда.

[00160] В одном варианте осуществления предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, содержащие одну или несколько аминокислот, меченных радиоактивными изотопами. Антитело к сортилину, меченное радиоактивным изотопом, можно применять как в диагностических, так и в терапевтических целях (конъюгирование с молекулами, меченными радиоактивными изотопами, является другой возможной характерной особенностью). Неограничивающие примеры таких меток включают без ограничения висмут (^{213}Bi), углерод (^{11}C , ^{13}C , ^{14}C), хром (^{51}Cr), кобальт (^{57}Co , ^{60}Co), медь (^{64}Cu), диспрозий (^{165}Dy), эрбий (^{169}Er), фтор (^{18}F), гадолиний (^{153}Gd , ^{159}Gd), галлий (^{68}Ga , ^{67}Ga), германий (^{68}Ge), золото (^{198}Au), гольмий (^{166}Ho), водород (^3H), индий (^{111}In , ^{112}In , ^{113}In , ^{115}In), йод (^{121}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), иридий (^{192}Ir), железо (^{59}Fe), криптон ($^{81\text{m}}\text{Kr}$), лантан (^{140}La), лютеций (^{177}Lu), магний (^{54}Mn), молибден (^{99}Mo), азот (^{13}N , ^{15}N), кислород (^{15}O), палладий (^{103}Pd), фосфор (^{32}P), калий (^{42}K), празеодим (^{142}Pr), прометий (^{149}Pm), рений (^{186}Re , ^{188}Re), родий (^{105}Rh), рубидий (^{81}Rb , ^{82}Rb), рутений (^{82}Ru , ^{97}Ru), самарий (^{153}Sm), скандий (^{47}Sc), селен (^{75}Se), натрий (^{24}Na), стронций (^{85}Sr , ^{89}Sr , ^{92}Sr), серу (^{35}S), технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Tl), олово (^{113}Sn , ^{117}Sn), ксенон (^{133}Xe), иттербий (^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Yb), иттрий (^{90}Y) и цинк (^{65}Zn). Способы получения аминокислот, меченных радиоактивными изотопами, и соответствующих производных пептидов известны из уровня техники (см., например, Junghans et al., в Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2-е издание, под редакцией Chafner и Longo, Lippincott Raven (1996)) и US 4681581; US 4735210; US 5101827; US 5102990 (US RE35500), US 5648471 и US 5697902. Например, радиоактивный изотоп можно конъюгировать с помощью способа с применением хлорамина Т (Lindegren, S. et al. (1998) “Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstannyl)Benzoate As An Intermediate”, Nucl. Med. Biol. 25(7):659-665; Kurth, M. et al. (1993) “Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor”, J. Med. Chem. 36(9):1255-1261; Rea, D.W. et al.

(1990) "Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors" Cancer Res. 50(3 Suppl):857s-861s).

[00161] Настоящее изобретение также предусматривает антитела к сортилину и их антигенсвязывающие фрагменты, меченные с помощью выявляемой

5 флуоресцентной метки (такой как хелат редкоземельного элемента (например, хелат европия)), метки флуоресцеинового типа (например, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, 5-карбоксифлуоресцеин, 6-карбоксифлуоресцеин, дихлортиазиниламинфлуоресцеин), метки родаминового типа (например, ALEXA FLUOR® 568 (Invitrogen), TAMRA® или данзилхлорид), VIVOTAG 680 XL

10 FLUOROCHROME™ (Perkin Elmer), фикоэритрина; умбеллиферона, лиссамина; цианина; фикоэритрина, техасского красного, BODIPY FL-SE® (Invitrogen) или его аналога, все из которых подходят для оптического выявления. Можно использовать хемилюминесцентные метки (например, люминол, люциферазу, люциферин и экворин). Такую диагностику и выявление также можно

15 осуществить путем связывания диагностической молекулы по настоящему изобретению с выявляемыми веществами, в том числе без ограничения различные ферменты, при этом ферменты включают без ограничения пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу, или с комплексами с простетическими группами, такие как без ограничения

20 стрептавидин/биотин и авидин/биотин.

[00162] Можно использовать хемилюминесцентные метки (например, люминол, люциферазу, люциферин и экворин). Такую диагностику и выявление также можно осуществить путем связывания диагностической молекулы по настоящему изобретению с выявляемыми веществами, в том числе без

25 ограничения различные ферменты, при этом ферменты включают без ограничения пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу, или с комплексами с простетическими группами, такие как без ограничения стрептавидин/биотин и авидин/биотин. Также можно использовать парамагнитные метки, и их предпочтительно выявляют с помощью

30 позитронно-эмиссионной томографии (PET) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT). Такие парамагнитные метки включают без ограничения соединения, содержащие парамагнитные ионы алюминия (Al), бария

(Ba), кальция (Ca), церия (Ce), диспрозия (Dy), эрбия (Er), европия (Eu), гадолиния (Gd), гольмия (Ho), иридия (Ir), лития (Li), магния (Mg), марганца (Mn), молибдена (Mo), неодимия (Nd), осмия (Os), кислорода (O), палладия (Pd), платины (Pt), родия (Rh), рутения (Ru), самария (Sm), натрия (Na), стронция (Sr), тербия (Tb), тулия (Tm), олова (Sn), титана (Ti), вольфрама (W), и циркония (Zr), и, в частности, Co^{+2} , Cr^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Ga^{+3} , Mn^{+3} , Ni^{+2} , Ti^{+3} , V^{+3} и V^{+4} , позитронно-активные металлы с использованием различных видов позитронно-эмиссионной томографии и нерадиоактивных парамагнитных ионов металлов.

[00163] Таким образом, в одном варианте осуществления антитело к сортилину или его фрагмент, связывающийся с сортилином, по настоящему изобретению могут быть мечеными флуоресцентной меткой, хемилюминесцентной меткой, парамагнитной меткой, радиоизотопной меткой или ферментной меткой. Меченое антитело его фрагмент можно применять для выявления наличия или измерения количества указанного сортилина в головном мозге субъекта. Этот способ может включать выявление или измерение количества антитела к сортилину или фрагмента, связывающегося с сортилином, связанного с указанным сортилином, посредством визуализации *in vivo* и может включать визуализацию *ex vivo* указанного антитела к сортилину или фрагмента, связывающегося с сортилином, связанного с таким сортилином.

[00164] В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, кодирующему одну или несколько полипептидных цепей антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего домена. Такие векторы экспрессии можно применять для получения антител и антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению рекомбинантным путем.

[00165] Вектор экспрессии в контексте настоящего изобретения может представлять собой любой подходящий ДНК- или РНК-вектор, в том числе хромосомные, нехромосомные векторы и векторы на основе синтетической нуклеиновой кислоты (последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая подходящий набор элементов контроля экспрессии). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирус, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные в результате

объединения плазмид и фаговой ДНК, и векторы на основе вирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК). В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к сортилину, содержится в векторе на основе "голой" ДНК или РНК, включающем, например, линейный элемент экспрессии (описанный, например, в Sykes and Johnston, *Nat Biotech* 12, 355-59 (1997)), векторе на основе 5 плотно упакованной нуклеиновой кислоты (описанный, например, в US 6077835 и/или WO 00/70087), плазмидном векторе, таком как pBR322, pUC 19/18 или pUC 118/119, векторе минимального размера "midge" на основе нуклеиновой кислоты (описанный, например, в Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), или 10 представлена в виде осаждаемой векторной конструкции на основе нуклеиновой кислоты, такой как конструкция, осаждаемая CaPO₄ (описанная, например, в WO 00/46147, Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978), и Coraro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 2, 603 (1981)). Такие векторы на основе нуклеиновых кислот и их применение хорошо известны из 15 уровня техники (см., например, US 5589466 и US 5973972).

[00166] В одном варианте осуществления вектор подходит для экспрессии антител к сортилину или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению в бактериальной клетке. Примеры таких векторов включают векторы экспрессии, такие как BlueScript (Stratagene), векторы pIN (Van Heeke & 20 Schuster, *J Biol Chem* 264, 5503-5509 (1989), векторы pET (Novagen, Мэдисон, Висконсин) и т. п.).

[00167] Вектор экспрессии может также или в качестве альтернативы представлять собой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Можно использовать любой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой 25 системе. Подходящие векторы включают, например, векторы, содержащие конститутивные или индуцируемые промоторы, такие как промотор гена фактора альфа, алкогольоксидазы и PGH (обзор которых приведен в *Current Protocols in Molecular Biology*, под редакцией F. Ausubel *et al.*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), Grant *et al.*, *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987), 30 Mattanovich, D. *et al.* *Methods Mol. Biol.* 824, 329-358 (2012), Celik, E. *et al.* *Biotechnol. Adv.* 30(5), 1108-1118 (2012), Li, P. *et al.* *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142(2), 105-124 (2007), Böer, E. *et al.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(3), 513-523

(2007), van der Vaart, J.M. *Methods Mol. Biol.* 178, 359-366 (2002), и Holliger, P. *Methods Mol. Biol.* 178, 349-357 (2002)).

[00168] В векторе экспрессии по настоящему изобретению нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело к сортилину, могут содержать любой подходящий промотор, энхансер и другие элементы, способствующие экспрессии, или быть связанными с ними. Примеры таких элементов включают сильные промоторы экспрессии (например, IE промотор/энхансер CMV человека, а также LTR промоторы RSV, SV40, SL3-3, MMTV и HIV), эффективные поли-(A)-последовательности терминации, точку начала репликации для продукта плазмиды в *E. coli*, ген устойчивости к антибиотику в качестве селектируемого маркера и/или подходящий сайт клонирования (например, полилинкер). Нуклеиновые кислоты также могут содержать индуцируемый промотор, а не конститутивный промотор, такой как IE CMV (специалист в данной области техники поймет, что такие термины фактически описывают степень экспрессии гена в определенных условиях).

[00169] В еще одном дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантной эукариотической или прокариотической клетке-хозяину, такой как трансфектома, которая продуцирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, определенные в данном документе, или биспецифическую молекулу по настоящему изобретению, определенную в данном документе. Примеры клеток-хозяев включают клетки дрожжей, бактерий и млекопитающих, такие как клетки CHO или HEK. Например, в одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, стабильно интегрированную в клеточный геном, которая содержит последовательность, кодирующую экспрессируемое антитело к сортилину по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент. В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую неинтегрированную нуклеиновую кислоту, такую как плазида, космида, фагида или линейный элемент экспрессии, которая содержит последовательность, кодирующую экспрессируемое антитело к сортилину или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

[00170] В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения антитела к сортилину по настоящему изобретению, при этом указанный способ включает стадии а) культивирования гибридомы или клетки-хозяина по настоящему изобретению, описанных в данном документе выше, и б)

5 очистки антитела по настоящему изобретению от культуральной среды.

[00171] В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату в том смысле, в котором этот термин используется в данном документе, который содержит антитело к сортилину, определенное в данном документе, и который практически не содержит антител, образующихся в естественных условиях, которые либо не способны связываться с сортилином, либо существенным образом не изменяют функциональные характеристики антитела к сортилину в препарате. Таким образом, такой препарат не охватывает сыворотку крови, образующуюся в естественных условиях, или очищенный производный продукт такой сыворотки крови, который содержит смесь антитела к сортилину и другого антитела, которое не изменяет функциональные характеристики антитела к сортилину в препарате, где такие функциональные характеристики представляют собой

(i) аффинность связывания (K_D) с сортилином;

(ii) способность снижать и/или подавлять связывание PGRN с сортилином;

(iii) способность снижать и/или подавлять выведение PGRN клетками, экспрессирующими сортилин;

(iv) способность снижать и/или подавлять эндоцитоз PGRN клетками, экспрессирующими сортилин;

25 (v) способность повышать количество и/или концентрацию PGRN в плазме крови у мышей с нокином, за счет которого у них экспрессируется сортилин человека; способность повышать количество и/или концентрацию PGRN в головном мозге и/или

(vi) способность обеспечивать лечение лобно-височной деменции (FTD) и/или бокового амиотрофического склероза (ALS) при его длительном введении.

[00172] Настоящее изобретение, в частности, относится к препаратам такого антитела к сортилину, имеющего структурное изменение в своей аминокислотной

последовательности (в любых своих CDR, вариабельных доменах, остатках каркасной области и/или константных доменах) по сравнению со структурой встречающегося в природе антитела к сортилину, где указанное структурное изменение обуславливает проявление антителом к сортилину значительно

5 измененных функциональных характеристик (т. е. более чем с 20% разницей, более чем с 40% разницей, более чем с 60% разницей, более чем с 80% разницей, более чем со 100% разницей, более чем со 150% разницей, более чем с 2-кратной разницей, более чем с 4-кратной разницей, более чем с 5-кратной разницей или более чем с 10-кратной разницей в функциональных характеристиках) по

10 сравнению с функциональными характеристиками, проявляемыми указанным встречающимся в природе антителом сортилину; где указанные функциональные характеристики представляют собой

- (i) аффинность связывания (K_D) с сортилином;
- (ii) способность снижать и/или подавлять связывание PGRN с

15 сортилином;

- (iii) способность снижать и/или подавлять выведение PGRN клетками, экспрессирующими сортилин;
- (iv) способность снижать и/или подавлять эндоцитоз PGRN клетками, экспрессирующими сортилин;

20 (vi) способность повышать количество и/или концентрацию PGRN в плазме крови у мышей с нокином, за счет которого у них экспрессируется сортилин человека;

- (vii) способность повышать количество и/или концентрацию PGRN в головном мозге и/или

25 (vi) способность обеспечивать лечение лобно-височной деменции (FTD), бокового амиотрофического склероза (ALS) и/или болезни Альцгеймера (AD) при его длительном введении,

особенно в тех случаях, где такие измененные функциональные характеристики

30 являются результатом структурного изменения и, следовательно, неотделимы от нее.

[00173] Термин “практически не содержит антител, образующихся в естественных условиях” относится к полному отсутствию таких антител, образующихся в естественных условиях, в таких препаратах или к включению таких антител, образующихся в естественных условиях, в такие препараты в концентрации, в которой они существенным образом не влияют на свойства связывания с сортилином данных препаратов. Говорят, что антитело является “выделенным”, если оно не имеет эквивалента, образующегося в естественных условиях, или было отделено или очищено от компонентов, которые в естественных условиях сопутствуют ему.

10 [00174] Термин “антитела, образующиеся в естественных условиях”, используемый в отношении таких препаратов, относится к антителам (в том числе аутоантителам, образующимся в естественных условиях), образование которых вызывается в организме людей или других животных как естественное следствие функционирования их иммунных систем.

15 [00175] Таким образом, препараты по настоящему изобретению не исключают, а в действительности явным образом охватывают такие препараты, которые содержат антитело к сортилину и преднамеренно добавленное дополнительное антитело, способное связываться с эпитопом, не содержащимся в сортилине. Такие препараты, в частности, включают варианты их осуществления, где данный препарат проявляет повышенную эффективность при лечении лобно-височной деменции (FTD) и/или бокового амиотрофического склероза (ALS).

[00176] Антитела их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно получить в различных линиях клеток, таких как линия клеток человека, линия клеток млекопитающего, отличного от человека, и линия клеток насекомого, например линия клеток CHO, линия клеток НЕК, линия клеток ВНК-21, линия клеток мыши (такая как линия клеток миеломы), линия клеток фибросаркомы, линия клеток PER.C6, линия клеток НКВ-11, линия клеток CAP и линия клеток HuH-7 человека (Dumont et al, 2015, Crit Rev Biotechnol. Sep 18:1-13, содержание, которого включено в данный документ посредством ссылки).

30 [00177] В еще одном дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей

(i) антитело к сортилину или его антигенсвязывающий фрагмент, оба из которых определены в данном документе, или препарат, в том смысле, в котором этот термин определен в данном документе, который содержит такое антитело к сортилину или его антигенсвязывающий фрагмент; и

5 (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

[00178] Фармацевтические композиции можно составлять с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, а также с любыми другими известными вспомогательными средствами и наполнителями согласно традиционным методикам, таким как раскрытые в Remington: The Science and
10 Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2013.

[00179] Фармацевтически приемлемые носители или разбавители, а также любые другие известные вспомогательные средства и наполнители должны быть пригодными для выбранного соединения по настоящему изобретению и
15 выбранного способа введения. Пригодность носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяют на основании отсутствия значительного отрицательного влияния на желаемые биологические свойства выбранного соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, менее чем существенного влияния (10% или меньшего
20 относительного подавления, 5% или меньшего относительного подавления и т. п.)) на связывание с эпитопом.

[00180] Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению также может содержать разбавители, заполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионный детергент, такой как Tween-20 или Tween-80), стабилизаторы
25 (например, сахара или свободные протеиногенные аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию. Разбавитель выбирают таким образом, чтобы он не влиял на биологическую активность комбинации. Примерами таких разбавителей являются дистиллированная вода,
30 физиологический фосфатно-солевой буферный раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнка. В дополнение, фармацевтическая композиция или состав также могут содержать другие носители или нетоксичные

нетерапевтические неиммуногенные стабилизаторы и т. п. Композиции также могут содержать крупные, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полисахариды, такие как хитозан, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты и сополимеры (например, функционализированную латексом сефарозу, агарозу, целлюлозу и т. п.), полимеры аминокислот, сополимеры аминокислот и липидные агрегаты (например, капли масла или липосомы).

[00181] Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно изменять таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения. Выбранный уровень дозы будет зависеть от ряда фармакокинетических факторов, в том числе активности конкретных используемых композиций по настоящему изобретению или их амида, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза подвергаемого лечению пациента, а также аналогичных факторов, хорошо известных в области медицины.

[00182] Фармацевтическую композицию можно вводить любым подходящим путем и способом, в том числе парентеральным, местным, пероральным или интраназальным путями, для профилактического и/или терапевтического лечения. В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят парентерально. Используемые в данном документе фразы "парентеральное введение" и "вводимый парентерально" означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают в себя эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсульную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, внутрисухожильную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную, внутричерепную,

интраторакальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию. Дополнительные подходящие пути введения соединения по настоящему изобретению *in vivo* и *in vitro* хорошо известны из уровня техники и могут быть выбраны специалистами обычной квалификации в данной области техники. В

5 одном варианте осуществления эту фармацевтическую композицию вводят посредством внутривенной или подкожной инъекции или инфузии.

[00183] Фармацевтически приемлемые носители включают всевозможные подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, средства, придающие изотоничность,

10 антиоксиданты и средства, замедляющие абсорбцию, и т. п., которые являются физиологически совместимыми с соединением по настоящему изобретению.

[00184] Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, этанол,

15 декстозу, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.), а также их пригодные смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовую камедь и пригодные для инъекций сложные органические эфиры, такие как этилолеат,

20 и/или различные буферы. Другие носители хорошо известны в области фармацевтики.

[00185] Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для индивидуального получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Применение таких сред и

25 средств для фармацевтически активных веществ известно из уровня техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или средство являются несовместимыми с активным соединением, предполагается их применение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению.

[00186] Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем

30 применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

[00187] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например, (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т. п.; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т. п.; и (3) металлохелаторы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т. п.

10 [00188] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать изотонические средства, такие как сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, глицерин, или хлорид натрия, в композициях.

[00189] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать одно или несколько вспомогательных веществ, подходящих для
15 выбранного пути введения, таких как консерванты, смачивающие вещества, эмульгаторы, диспергирующие вещества, консерванты или буферы, которые могут повышать сохраняемость или эффективность фармацевтической композиции. Соединения по настоящему изобретению можно получать с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения,
20 как, например, в виде состава с контролируемым высвобождением, в том числе имплантатов, трансдермальных пластырей и микроинкапсулированных систем доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как сополимер этилена и винилацетата, полиангидриды, полигликолевую кислоту,
25 коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочную кислоту отдельно или вместе с воском, или другие материалы, хорошо известные из уровня техники. Способы получения таких составов в целом известны специалистам в данной области техники. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

30 [00190] В одном варианте осуществления соединения по настоящему изобретению можно составлять для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Фармацевтически приемлемые носители для парентерального введения

включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для индивидуального получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно из уровня техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или средство являются несовместимыми с активным соединением, предполагается их применение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

[00191] Фармацевтические композиции для инъекций, как правило, должны

быть стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой водный или неводный растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и пригодные для инъекций сложные органические эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительным включение в композицию средств, придающих изотоничность, например, сахаров, многоатомных спиртов, таких как глицерин, маннит, сорбит, или хлорида натрия. Длительного всасывания инъекционных композиций можно достичь путем включения в композицию средства, замедляющего всасывание антитела, например, моностеаратных солей и желатина. Стерильные инъекционные растворы можно получить путем помещения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, например, перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизующей микрофильтрацией. Обычно дисперсии получают путем помещения активного соединения в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты, например, из

перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов примерами способов получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), в результате которой получают порошкообразный активный ингредиент плюс любой дополнительный требуемый

5 ингредиент из их раствора, предварительно подвергнутого стерилизующей фильтрации.

[00192] Стерильные инъекционные растворы можно получить путем помещения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизующей микрофильтрацией. Обычно дисперсии получают путем помещения активного соединения в стерильный среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше.

10 В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов примерами способов получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), в результате которой получают порошкообразный активный ингредиент плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из их раствора, предварительно подвергнутого стерилизующей

15 фильтрации.

[00193] Режимы дозирования в вышеуказанных способах лечения и путях применения, описанных в данном документе, корректируют для получения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить однократную болюсную дозу, можно вводить несколько разделенных доз в течение некоторого времени, или дозу можно

20 пропорционально уменьшать или увеличивать, как определяется потребностями терапевтической ситуации. Композиции для парентерального введения можно составлять в виде единичной лекарственной формы для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, как используется в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в

25 качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта,

30

совместно с необходимым фармацевтическим носителем. Технические требования к единичным лекарственным формам по настоящему изобретению продиктованы (а) уникальными характеристиками активного соединения и конкретным терапевтическим эффектом, которого необходимо достичь, и (b) ограничениями, присущими области составления такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов, и непосредственно зависят от них.

[00194] Эффективные дозы и режимы дозирования антител к сортилину зависят от заболевания или состояния, подлежащих лечению, и могут быть определены специалистами в данной области техники. Иллюстративный неограничивающий диапазон для терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению составляет приблизительно 0,1-10 мг/кг веса тела, как, например, приблизительно 0,1-5 мг/кг веса тела, например, приблизительно 0,1-2 мг/кг веса тела, как, например, приблизительно 0,1-1 мг/кг веса тела, например, приблизительно 0,15, приблизительно 0,2, приблизительно 0,5, приблизительно 1, приблизительно 1,5 или приблизительно 2 мг/кг веса тела.

[00195] Врач или ветеринар со стандартной квалификацией в данной области техники легко может определить и назначить эффективное количество необходимой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с доз антитела к сортилину, используемого в фармацевтической композиции, на более низких уровнях, чем необходимый для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно повышать дозу до достижения желаемого эффекта. В целом, подходящей суточной дозой композиции по настоящему изобретению будет такое количество соединения, которое является наиболее низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от описанных выше факторов. Введение может быть, например, внутривенным, внутримышечным, внутрибрюшинным или подкожным, и, например, введение можно осуществлять в непосредственной близости от сайта мишени. При желании эффективную суточную дозу фармацевтической композиции можно вводить в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более частей дозы, вводимых по отдельности с соответствующими интервалами в течение дня, необязательно в

виде единичных лекарственных форм. Хотя соединение по настоящему изобретению можно вводить отдельно, предпочтительно вводить соединение в виде фармацевтической композиции, описанной выше.

[00196] Меченые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно применять в диагностических целях для выявления, диагностики или мониторинга заболеваний или нарушений. Настоящее изобретение предусматривает выявление или диагностику нейродегенеративного или когнитивного заболевания или нарушения, в том числе без ограничения FTD, ALS или протеинопатий TDP43, как например, болезнь Альцгеймера (AD), включающие (а) проведение анализа наличия пироглутамилированных A β -фрагментов в клетках или образцах тканей субъекта с применением одного или нескольких антител, специфично связывающихся с сортилином; и (b) проведение сравнения уровня антигена с контрольным уровнем, например, с уровнями в нормальных образцах тканей, при котором повышение анализируемого уровня антигена по сравнению с контрольным уровнем антигена свидетельствует о заболевании или нарушении или свидетельствует о тяжести заболевания или нарушения.

[00197] Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно применять для анализа уровня сортилина или антигенсвязывающих фрагментов сортилина в биологическом образце с помощью иммуногистохимических способов, хорошо известных из уровня техники. Другие способы с использованием антител, применимые для выявления белка, включают иммунологические анализы, такие как иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммунологический анализ (RIA), а также анализы с использованием платформы Meso Scale Discovery (MSD). В таких наборах и способах можно применять подходящие метки для антител, и метки, известные из уровня техники, включают ферментные метки, такие как щелочная фосфатаза и глюкозооксидаза; радиоизотопные метки, такие как йод (^{125}I , ^{131}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций ($^{99\text{m}}\text{Tc}$); а также люминесцентные метки, такие как люминол и люцифераза; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин.

[00198] Наличие меченых антител к сортилину или их фрагментов, связывающихся с сортилином, можно выявлять *in vivo* для диагностических целей. В одном варианте осуществления диагностика предусматривает а) введение субъекту эффективного количества такой меченой молекулы; б) ожидание в течение некоторого промежутка времени после введения для обеспечения концентрирования меченой молекулы в местах отложения Аβ (при наличии таковых) и для обеспечения очищения от несвязанной меченой молекулы до фонового уровня; с) определение фонового уровня и d) выявление меченой молекулы у субъекта, таким образом, что выявление меченой молекулы на уровне, превышающем фоновый, свидетельствует о том, что у субъекта имеется заболевание или нарушение, или свидетельствует о тяжести заболевания или нарушения. В соответствии с таким вариантом осуществления молекулу метят визуализирующим компонентом, подходящим для выявления с помощью конкретной системы визуализации, известной специалистам в данной области техники. Фоновые уровни можно определить с помощью различных способов, известных из уровня техники, в том числе путем сравнения количества выявленного меченого антитела со стандартным значением, предварительно определенным для конкретной системы визуализации. Способы и системы, которые можно применять в способах диагностики по настоящему изобретению, включают без ограничения компьютерную томографию (СТ), сканирование всего тела, такое как позитронно-эмиссионная томография (PET), магнитно-резонансная визуализация (MRI) и ультразвуковое исследование.

[00199] В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по настоящему изобретению для применения в медицине.

[00200] В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по настоящему изобретению для применения при лечении заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента.

[00201] В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению при изготовлении лекарственного препарата для лечения

заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента.

[00202] В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента, включающему введение эффективной дозы антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента.

[00203] Предпочтительно, чтобы в путях применения и способах по данным аспектам настоящего изобретения заболевание представляло собой FTD; ALS или протеинопатии TDP43, как, например, AD.

[00204] Предпочтительно, в путях применения и способах по данным аспектам настоящего изобретения лечение является длительным и предпочтительно продолжается по меньшей мере в течение 2 недель, как, например, в течение по меньшей мере 1 месяца, 6 месяцев, 1 года или дольше.

[00205] В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

Таблица 5. Последовательности антител

Ab 5E1		
Seq ID No:	1	CDR1 легкой цепи 5E1
Seq ID No:	2	CDR2 легкой цепи 5E1
Seq ID No:	3	CDR3 легкой цепи 5E1
Seq ID No:	4	CDR1 тяжелой цепи 5E1
Seq ID No:	5	CDR2 тяжелой цепи 5E1
Seq ID No:	6	CDR3 тяжелой цепи 5E1
Seq ID No:	7	VL 5E1
Seq ID No:	8	VH 5E1
Ab 1F2		
Seq ID No:	9	CDR1 легкой цепи 1F2
Seq ID No:	10	CDR2 легкой цепи 1F2
Seq ID No:	11	CDR3 легкой цепи 1F2
Seq ID No:	12	CDR1 тяжелой цепи 1F2
Seq ID No:	13	CDR2 тяжелой цепи 1F2
Seq ID No:	14	CDR3 тяжелой цепи 1F2
Seq ID No:	15	VL 1F2
Seq ID No:	16	VH 1F2
Ab 068		
Seq ID No:	17	CDR1 легкой цепи 068
Seq ID No:	18	CDR2 легкой цепи 068
Seq ID No:	19	CDR3 легкой цепи 068
Seq ID No:	20	CDR1 тяжелой цепи 068
Seq ID No:	21	CDR2 тяжелой цепи 068
Seq ID No:	22	CDR3 тяжелой цепи 068
Seq ID No:	23	VL 068
Seq ID No:	24	VH 068
Ab 1320		
Seq ID No:	25	CDR1 легкой цепи 1320
Seq ID No:	26	CDR2 легкой цепи 1320
Seq ID No:	27	CDR3 легкой цепи 1320

Seq ID No:	28	CDR1 тяжелой цепи 1320
Seq ID No:	29	CDR2 тяжелой цепи 1320
Seq ID No:	30	CDR3 тяжелой цепи 1320
Seq ID No:	31	VL 1320
Seq ID No:	32	VH 1320
Ab 93-05		
Seq ID No:	33	CDR1 легкой цепи 93-05
Seq ID No:	34	CDR2 легкой цепи 93-05
Seq ID No:	35	CDR3 легкой цепи 93-05
Seq ID No:	36	CDR1 тяжелой цепи 93-05
Seq ID No:	37	CDR2 тяжелой цепи 93-05
Seq ID No:	38	CDR3 тяжелой цепи 93-05
Seq ID No:	39	VL 93-05
Seq ID No:	40	VH 93-05
Ab 93-01		
Seq ID No:	41	CDR1 легкой цепи 93-01
Seq ID No:	42	CDR2 легкой цепи 93-01
Seq ID No:	43	CDR3 легкой цепи 93-01
Seq ID No:	44	CDR1 тяжелой цепи 93-01
Seq ID No:	45	CDR2 тяжелой цепи 93-01
Seq ID No:	46	CDR3 тяжелой цепи 93-01
Seq ID No:	47	VL 93-01
Seq ID No:	48	VH 93-01
Ab 924		
Seq ID No:	49	CDR1 легкой цепи 924
Seq ID No:	50	CDR2 легкой цепи 924
Seq ID No:	51	CDR3 легкой цепи 924
Seq ID No:	52	CDR1 тяжелой цепи 924
Seq ID No:	53	CDR2 тяжелой цепи 924
Seq ID No:	54	CDR3 тяжелой цепи 924
Seq ID No:	55	VL 924
Seq ID No:	56	VH 924

Ab 1276		
Seq ID No:	57	CDR1 легкой цепи 1276
Seq ID No:	58	CDR2 легкой цепи 1276
Seq ID No:	59	CDR3 легкой цепи 1276
Seq ID No:	60	CDR1 тяжелой цепи 1276
Seq ID No:	61	CDR2 тяжелой цепи 1276
Seq ID No:	62	CDR3 тяжелой цепи 1276
Seq ID No:	63	VL 1276
Seq ID No:	64	VH 1276
Ab 849		
Seq ID No:	65	CDR1 легкой цепи 849
Seq ID No:	66	CDR2 легкой цепи 849
Seq ID No:	67	CDR3 легкой цепи 849
Seq ID No:	68	CDR1 тяжелой цепи 849
Seq ID No:	69	CDR2 тяжелой цепи 849
Seq ID No:	70	CDR3 тяжелой цепи 849
Seq ID No:	71	VL 849
Seq ID No:	72	VH 849
Ab 531-02		
Seq ID No:	73	CDR1 легкой цепи 531-02
Seq ID No:	74	CDR2 легкой цепи 531-02
Seq ID No:	75	CDR3 легкой цепи 531-02
Seq ID No:	76	CDR1 тяжелой цепи 531-02
Seq ID No:	77	CDR2 тяжелой цепи 531-02
Seq ID No:	78	CDR3 тяжелой цепи 531-02
Seq ID No:	79	VL 531-02
Seq ID No:	80	VH 531-02
Ab 548-01		
Seq ID No:	81	CDR1 легкой цепи 548-01
Seq ID No:	82	CDR2 легкой цепи 548-01
Seq ID No:	83	CDR3 легкой цепи 548-01
Seq ID No:	84	CDR1 тяжелой цепи 548-01

Seq ID No:	85	CDR2 тяжелой цепи 548-01
Seq ID No:	86	CDR3 тяжелой цепи 548-01
Seq ID No:	87	VL 548-01
Seq ID No:	88	VH 548-01
Ab 548-02		
Seq ID No:	89	CDR1 легкой цепи 548-02
Seq ID No:	90	CDR2 легкой цепи 548-02
Seq ID No:	91	CDR3 легкой цепи 548-02
Seq ID No:	92	CDR1 тяжелой цепи 548-02
Seq ID No:	93	CDR2 тяжелой цепи 548-02
Seq ID No:	94	CDR3 тяжелой цепи 548-02
Seq ID No:	95	VL 548-02
Seq ID No:	96	VH 548-02
Ab1289-02		
Seq ID No:	97	CDR1 легкой цепи 1289-02
Seq ID No:	98	CDR2 легкой цепи 1289-02
Seq ID No:	99	CDR3 легкой цепи 1289-02
Seq ID No:	100	CDR1 тяжелой цепи 1289-02
Seq ID No:	101	CDR2 тяжелой цепи 1289-02
Seq ID No:	102	CDR3 тяжелой цепи 1289-02
Seq ID No:	103	VL 1289-02
Seq ID No:	104	VH 1289-02
Ab 811-02		
Seq ID No:	105	CDR1 легкой цепи 811-02
Seq ID No:	106	CDR2 легкой цепи 811-02
Seq ID No:	107	CDR3 легкой цепи 811-02
Seq ID No:	108	CDR1 тяжелой цепи 811-02
Seq ID No:	109	CDR2 тяжелой цепи 811-02
Seq ID No:	110	CDR3 тяжелой цепи 811-02
Seq ID No:	111	VL 811-02
Seq ID No:	112	VH 811-02
Ab 566-01		

Seq ID No:	113	CDR1 легкой цепи 566-01
Seq ID No:	114	CDR2 легкой цепи 566-01
Seq ID No:	115	CDR3 легкой цепи 566-01
Seq ID No:	116	CDR1 тяжелой цепи 566-01
Seq ID No:	117	CDR2 тяжелой цепи 566-01
Seq ID No:	118	CDR3 тяжелой цепи 566-01
Seq ID No:	119	VL 566-01
Seq ID No:	120	VH 566-01
Ab 562		
Seq ID No:	121	CDR1 легкой цепи 562
Seq ID No:	122	CDR2 легкой цепи 562
Seq ID No:	123	CDR3 легкой цепи 562
Seq ID No:	124	CDR1 тяжелой цепи 562
Seq ID No:	125	CDR2 тяжелой цепи 562
Seq ID No:	126	CDR3 тяжелой цепи 562
Seq ID No:	127	VL 562
Seq ID No:	128	VH 562
Ab 193		
Seq ID No:	129	CDR1 легкой цепи 193
Seq ID No:	130	CDR2 легкой цепи 193
Seq ID No:	131	CDR3 легкой цепи 193
Seq ID No:	132	CDR1 тяжелой цепи 193
Seq ID No:	133	CDR2 тяжелой цепи 193
Seq ID No:	134	CDR3 тяжелой цепи 193
Seq ID No:	135	VL 193
Seq ID No:	136	VH 193
Ab 88		
Seq ID No:	137	CDR1 легкой цепи 88
Seq ID No:	138	CDR2 легкой цепи 88
Seq ID No:	139	CDR3 легкой цепи 88
Seq ID No:	140	CDR1 тяжелой цепи 88
Seq ID No:	141	CDR2 тяжелой цепи 88

Seq ID No:	142	CDR3 тяжелой цепи 88
Seq ID No:	143	VL 88
Seq ID No:	144	VH 88
Ab 045		
Seq ID No:	145	CDR1 легкой цепи 045
Seq ID No:	146	CDR2 легкой цепи 045
Seq ID No:	147	CDR3 легкой цепи 045
Seq ID No:	148	CDR1 тяжелой цепи 045
Seq ID No:	149	CDR2 тяжелой цепи 045
Seq ID No:	150	CDR3 тяжелой цепи 045
Seq ID No:	151	VL 045
Seq ID No:	152	VH 045
Ab 044		
Seq ID No:	153	CDR1 легкой цепи 044
Seq ID No:	154	CDR2 легкой цепи 044
Seq ID No:	155	CDR3 легкой цепи 044
Seq ID No:	156	CDR1 тяжелой цепи 044
Seq ID No:	157	CDR2 тяжелой цепи 044
Seq ID No:	158	CDR3 тяжелой цепи 044
Seq ID No:	159	VL 044
Seq ID No:	160	VH 044
Ab 002		
Seq ID No:	161	CDR1 легкой цепи 002
Seq ID No:	162	CDR2 легкой цепи 002
Seq ID No:	163	CDR3 легкой цепи 002
Seq ID No:	164	CDR1 тяжелой цепи 002
Seq ID No:	165	CDR2 тяжелой цепи 002
Seq ID No:	166	CDR3 тяжелой цепи 002
Seq ID No:	167	VL 002
Seq ID No:	168	VH 002
Полностью человеческая последовательность		
Seq ID No:	169	сортилина изоформы 1

Seq ID No:	170	“Область D”, идентифицированная в настоящем изобретении
Seq ID No:	171	Сортилин “hSORTECDBAP”
Seq ID No:	172	Сортилин SORTECDBAP_hBACK
Seq ID No:	173	Сортилин SORTECDBAP_tetra
Seq ID No:	174	Сортилин SORTECDBAP_hB01-05
Seq ID No:	175	Сортилин SORTECDBAP_hRIM
Seq ID No:	176	Сортилин SORTECDBAP_hB06-10
Seq ID No:	177	Сортилин SORTECDBAP_hB12390
Seq ID No:	178	Сортилин SORTECDBAP_hB45678
Seq ID No:	179	Сортилин SORTECD_HIS
Seq ID No:	180	“Область A”, идентифицированная в настоящем изобретении
Seq ID No:	181	Область A 109-114
Seq ID No:	182	Область A 126-153
Seq ID No:	183	Область A 126-144
Seq ID No:	184	Область A 154-159
Seq ID No:	185	Область D 570-572
Seq ID No:	186	Область D 588-597
Seq ID No:	187	Область D 593-597
Seq ID No:	188	Последовательности, применяемые для HDX

Перечисление или обсуждение в данном описании документа, очевидно опубликованного ранее, не обязательно должны рассматриваться как подтверждение того, что документ является частью уровня техники или общедоступными сведениями.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00206] Как будет очевидно из текста и примеров, настоящее изобретение дополнительно относится к приведенным ниже вариантам осуществления.

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные
5 специфически связываться с сортилином и подавлять связывание PGRN с сортилином.
2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вариантом осуществления 1, где антитело содержит интактное антитело или состоит из него.
- 10 3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вариантом осуществления 1 или 2, где антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из Fv-фрагмента (например, одноцепочечного Fv или связанного дисульфидной связью Fv); Fab-подобного фрагмента (например, Fab-фрагмента или F(ab')₂-фрагмента);
15 и доменного антитела (например, отдельного вариабельного домена V_H или вариабельного домена V_L), или состоит из него.
4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело выбрано из группы, состоящей из антитела подтипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.
- 20 5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с областью D сортилина, определенной в **SEQ ID NO:170**.
6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым
25 из предыдущих вариантов осуществления, где указанные антитело или его фрагмент специфически связываются по меньшей мере с 3 последовательными аминокислотами, как, например, 4, 5, 6 или 7 последовательными аминокислотами, области D сортилина, определенной в **SEQ ID NO:170**.
7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым
30 из предыдущих вариантов осуществления, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент проявляют одно или несколько из следующих свойств:

- (i) аффинность связывания (K_D) с сортилином, составляющую 0,5-10 нМ, как, например, 1-5 нМ или 1-2 нМ;
- (ii) способность снижать и/или подавлять связывание PGRN с сортилином;
- (iii) способность снижать и/или подавлять выведение PGRN клетками, экспрессирующими сортилин;
- (iv) способность снижать и/или подавлять эндоцитоз PGRN клетками, экспрессирующими сортилин;
- (v) способность повышать количество и/или концентрацию PGRN в плазме крови у мышей с нокином, за счет которого у них экспрессируется сортилин человека.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вариантом осуществления 7, где способность антитела или его фрагмента снижать связывание PGRN с сортилином предусматривает снижение связывания PGRN с сортилином на 10% или больше; например, на 20% или больше или на 30% или больше.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вариантом осуществления 7 или 8, где способность указанных антитела или его фрагмента антитела или его фрагмента снижать и/или подавлять связывание PGRN с сортилином предусматривает снижение и/или подавление связывания PGRN с сортилином при IC₅₀, составляющей 22 нМ или меньше, как, например, от 22 нМ до 1 нМ, или от 10 нМ до 1 нМ, или от 5 нМ до 1 нМ.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются человеческими или гуманизированными.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, содержащие вариабельный домен легкой цепи, содержащий один или несколько CDR 1-3 легкой цепи, изложенных для каждого из антител, определенных в таблице 5, или аминокислотную последовательность, имеющую не более 4 отличий в аминокислотах, или не более 3 отличий в аминокислотах, или не более 2 отличий в аминокислотах, или не более 1 отличия в аминокислотах.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вариантом осуществления 11, содержащие переменный домен легкой цепи, содержащий CDR 1-3 легкой цепи, изложенные для каждого из антител, определенных в таблице 5.

5 13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вариантом осуществления 11 или 12, содержащие переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VL, изложенную для каждого из антител, определенных в таблице 5, или состоящий из нее.

10 14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вариантов осуществления 11-13, содержащие легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность VL, изложенную для каждого из антител, определенных в таблице 5, или состоящую из нее.

15 15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, содержащие переменный домен тяжелой цепи, содержащий один или несколько CDR 1-3 тяжелой цепи, изложенных для каждого из антител, определенных в таблице 5, или аминокислотную последовательность, имеющую не более 4 отличий в аминокислотах, или не более 3 отличий в аминокислотах, или не более 2 отличий в аминокислотах, или не более 1 отличия в аминокислотах.

20 16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вариантом осуществления 15, содержащие переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR 1-3 тяжелой цепи, изложенные для каждого из антител, определенных в таблице 5.

25 17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вариантом осуществления 15 или 16, содержащие переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VH, изложенную для каждого из антител, определенных в таблице 5, или состоящий из нее.

30 18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вариантов осуществления 15-17, содержащие тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность VL, изложенную для каждого из антител, определенных в таблице 5, или состоящую из нее.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, содержащие переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VL, изложенную для каждого из антител, определенных в таблице 5, или состоящий из нее, и

5 переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VH, изложенную для каждого из антител, определенных в таблице 5, или состоящий из нее.

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, содержащие легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность VL, изложенную для каждого из антител, определенных в таблице 5, или состоящую из нее, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность VH, изложенную для каждого из антител, определенных в таблице 5, или состоящую из нее.

10

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, определенными в варианте осуществления 20, за связывание с сортилином.

15

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат Fc-область.

20

23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат компонент для увеличения периода полужизни *in vivo*.

25

24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вариантом осуществления 22, где компонент для увеличения периода полужизни *in vivo* выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (PEG), сывороточного альбумина человека, гликозилирующих групп, жирных кислот и декстрана.

30

25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат выявляемый компонент.

26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с
5 вариантом осуществления 25, где выявляемый компонент выбран из группы, состоящей из флуоресцентной метки; хемилюминесцентной метки; парамагнитной метки; радиоизотопной метки или ферментной метки.

27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с
10 вариантом осуществления 25 или 26, где выявляемый компонент содержит радиоактивный изотоп или состоит из него.

28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вариантом осуществления 26 или 27, где радиоактивный изотоп выбран из группы, состоящей из ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr , ^{123}I и ^{201}Tl .

29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с
15 вариантом осуществления 25, где выявляемый компонент содержит парамагнитный изотоп или состоит из него.

30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вариантом осуществления 29, где парамагнитный изотоп выбран из группы, состоящей из ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Cr и ^{56}Fe .

20 31. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вариантов осуществления 25-30, где выявляемый компонент выявляется с помощью методики визуализации, такой как SPECT, PET, MRI, оптическая или ультразвуковая визуализация.

32. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым
25 из вариантов осуществления 25-31, где выявляемый компонент опосредованно соединен с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с помощью линкерного компонента.

33. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вариантом осуществления 32, где линкерный компонент выбран из группы, состоящей из производных 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной
30 кислоты (DOTA); дефероксамина (DFO); производных диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA); производных S-2-(4-

изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусной кислоты (NOTA) и производных 1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетрауксусной кислоты (TETA).

34. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, определенные в любом из вариантов осуществления 1-33.

35. Молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с вариантом осуществления 34, где молекула представляет собой молекулу кДНК.

36. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, определенную в вариантах осуществления 34 или 35.

37. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, определенную в любом из вариантов осуществления 34-36.

38. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, определенных в любом из вариантов осуществления 1-33, при этом способ включает культивирование клетки-хозяина, определенной в варианте осуществления 37, в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии кодируемого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

39. Препарат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где указанный препарат практически не содержит антител, образующихся в естественных условиях, которые либо не способны связываться с сортилином, либо существенным образом не изменяют функциональные характеристики антитела к сортилину в препарате, при этом указанные функциональные характеристики выбраны из группы, состоящей из

- (i) аффинности связывания (K_D) с сортилином;
- (ii) способности снижать и/или подавлять связывание PGRN с сортилином;
- (iii) способности снижать и/или подавлять выведение PGRN клетками, экспрессирующими сортилин;
- (iv) способности снижать и/или подавлять эндоцитоз PGRN клетками, экспрессирующими сортилин;

(v) способность повышать количество и/или концентрацию PGRN в плазме крови у мышей с нокином, за счет которого у них экспрессируется сортилин человека; и/или

(vi) способность обеспечивать лечение лобно-височной деменции (FTD) и/или бокового амиотрофического склероза (ALS) при его длительном введении.

40. Препарат, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где указанное моноклональное антитело имеет структурное изменение в своей аминокислотной последовательности по сравнению со структурой встречающегося в природе антитела к сортилину, где указанное структурное изменение обуславливает проявление указанным моноклональным антителом измененных функциональных характеристик по сравнению с функциональными характеристиками, проявляемыми указанным встречающимся в природе антителом к сортилину, где указанные функциональные характеристики представляют собой

(i) аффинность связывания (KD) с сортилином;

(ii) способности снижать и/или подавлять связывание PGRN с сортилином;

(iii) способности снижать и/или подавлять выведение PGRN клетками, экспрессирующими сортилин;

(iv) способности снижать и/или подавлять эндоцитоз PGRN клетками, экспрессирующими сортилин;

(v) способность повышать количество и/или концентрацию PGRN в плазме крови у мышей с нокином, за счет которого у них экспрессируется сортилин человека; и/или

(vi) способность обеспечивать лечение лобно-височной деменции (FTD) и/или бокового амиотрофического склероза (ALS) при его длительном введении.

41. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, определенные в любом из вариантов осуществления 1-33, или препарат в соответствии с любым из вариантов осуществления 39-40 и фармацевтически приемлемый носитель.

42. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, определенные в любом из вариантов осуществления 1-33, или препарат в соответствии с любым из вариантов осуществления 39-40 для применения в медицине.

43. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, определенные в любом из вариантов осуществления 1-33, или препарат в соответствии с любым из вариантов осуществления 39-40 для применения при предупреждении и/или лечении заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента.

44. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, определенных в любом из вариантов осуществления 1-33, или препарата в соответствии с любым из вариантов осуществления 39-40 при изготовлении лекарственного препарата для предупреждения и/или лечения заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента.

45. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в соответствии с вариантом осуществления 43 или применения в соответствии с вариантом осуществления 44, где заболевание выбрано из группы, состоящей из FTD; ALS; протеинопатий TDP43, как, например, AD.

46. Способ предупреждения или лечения заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента, включающий введение эффективной дозы антитела или его фрагмента, определенных в любом из вариантов осуществления 1-33, препарата в соответствии с любым из вариантов осуществления 39-40 или фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления 41.

47. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в соответствии с вариантом осуществления 43, или применение в соответствии с вариантом осуществления 44, или способ в соответствии с вариантом осуществления 46, где заболевание выбрано из группы, состоящей из FTD; ALS или протеинопатий TDP43, как, например, AD.

48. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения; или применение; или способ в соответствии с вариантом осуществления 46 или 47, где лечение является длительным.

49. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения; или применение; или способ в соответствии с вариантом осуществления 48, где длительное лечение продолжается в течение по меньшей мере 2 недель, как, например, в течение по меньшей мере 1 месяца, 6 месяцев, 1 года или дольше.

50. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, определенные в любом из вариантов осуществления 1-33, препарат в соответствии с любым из вариантов осуществления 39-40 или фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 41, которые способны специфически связываться с сортилином и подавлять связывания PGRN с сортилином, но при этом их связывание не подавляет или не подавляет в значительной степени связывание нейротензина или AF38469 с сортилином.

51. Набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, определенные в любом из вариантов осуществления 1-33, препарат, определенный в любом из вариантов осуществления 39-40, или фармацевтическую композицию, определенную в варианте осуществления 41.

[00207] Предпочтительные неограничивающие примеры, которые воплощают определенные аспекты настоящего изобретения, далее будут описаны со ссылкой на прилагаемые фигуры.

ПРИМЕРЫ

В примерах 1-3 описано получение конструкций сортилина.

[00208] В **примере 1** раскрыты конструкции, полученные перетасовкой. В **примере 2** раскрыта экспрессия конструкций сортилина. В **примере 3** раскрыта очистка конструкций сортилина.

В примерах 4-7 описано получение антител к сортилину.

[00209] В **примере 4** раскрыты иммунизация и гибридомы. В **примере 5** раскрыт анализ последовательностей. В **примере 6** раскрыта очистка антител. В **примере 7** раскрыто получение антител мыши.

В примерах 8-17 описана характеристика антител к сортилину

[00210] В **примере 8** раскрыто связывание сортилина. В **примере 9** раскрыта способность антител к сортилину к перекрестному блокированию. В **примере 10** раскрыт HTRF, проводимый в отношении связывания PGRN-сортилин. В **примере 11** раскрыто связывание NTS. В **примере 12** раскрыты связывание PGRN клетками и эндоцитоз. В **примере 13** раскрыты уровни внеклеточного PGRN. В **примере 14** раскрыты уровни PGRN в iPSC. В **примере 15** раскрыты уровни PGRN в плазме крови. В **примере 16** раскрыто картирование эпитопов с помощью HDX. В **примере 17** раскрыт микродиализ PGRN в головном мозге.

Пример 1

[00211] Для применения как в способе скрининга гибридом, так и в расширении панели антител разрабатывали, конструировали и получали так называемые “конструкции, полученные перетасовкой” с образованием набора химерных молекул сортилина, содержащих аминокислотные последовательности, полученные как от сортилина человека, так и сортилина дальнеродственных видов (иглобрюхи) со значительно низкой степенью гомологии последовательностей. Логическим обоснованием для этого является то, что общая структура сортилина и функциональные характеристики этих химерных конструкций будут сохраняться, но при этом прекращение связывания антител с определенными химерными конструкциями будет указывать на вовлечение в связывание конкретных областей, подвергнутых замене. Конструкции растворимой внеклеточной области (ECD, aa 1-755) метили либо ВАР-меткой

(биотин-акцепторный пептид), обеспечивающей возможность биотинилирования белков “in vitro” с помощью совместной экспрессии с биотин-лигазой, либо His-меткой, обеспечивающей возможность простой очистки. Получали векторы экспрессии, кодирующие следующие белки: SORT-ECDBAP, SORT-ECDBAP-hB01-05, SORT-ECDBAP-hB06-10, SORT-ECDBAP-hB12390, SORT-ECDBAP-hB45678, SORT-ECDBAP-tetra, SORT, SORT-tetra.

[00212] Последовательности сортилина можно найти в **SEQ ID NO:169-180** и на **фигуре 2**, показывающей схематическое представление соотнесения антител к областям на основании связывания с конструкциями сортилина, полученными перетасовкой.

Пример 2

[00213] В случае экспрессии антитела векторы, кодирующие соответствующую тяжелую цепь и легкую цепь, описанные в примерах 4, 5 и 6, совместно экспрессировали в клетках HEK-293F.

Пример 3. Очистка сортилина, меченного His

[00214] SORTECDHis экспрессировали в клетках HEK-293F. His-метка в белках обеспечивала возможность очистки с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном металле. В этом способе картридж NiNTA Superflow (Qiagen) уравнивали с помощью 50 mM NaN_2PO_4 , 300 mM NaCl и 10 mM имидазола, pH 8,0. В колонку загружали белок, меченный His, при этом время удерживания составляло 1 минуту. Колонку промывали с помощью 50 mM NaN_2PO_4 , 300 mM NaCl и 20 mM имидазола, pH 8,0. Белок элюировали с помощью 50 mM NaN_2PO_4 , 300 mM NaCl и 250 mM имидазола, pH 8,0. Затем белок подвергали диализу в PBS с применением Slide-A-Lyzer с отсечением по молекулярной массе 10000 Да (Thermo Scientific). После выполнения диализа белок подвергали стерилизующей фильтрации с применением фильтра SFCA с размером пор 0,2 микрона (Thermo Scientific).

[00215] Линию клеток S18-HEK получали путем трансфекции клеток HEK293 вектором экспрессии сортилина человека дикого типа (WT). Стабильно трансфицированные клетки получали после осуществления пассажа в присутствии селективируемого средства. Отдельные клоны отбирали с помощью клонирования методом разведений. Клоны характеризовали в отношении

экспрессии мРНК сортилина с применением QPCR. Клоны с наиболее высокими уровнями экспрессии затем анализировали с помощью FACS (Guava, Millipore) с применением поликлонального антитела к сортилину (поликлонального козьего биотинилированного Ab к сортилину, № по кат.: BAF2934_(R&D Systems)) для определения уровней поверхностной экспрессии сортилина.

Пример 4

А. Процедура иммунизации трансгенных мышей

[00216] Антитела HuMab к сортилину получали путем иммунизации мышей линий HCo12, HCo17, HCo20, HCo12-BALB/c, HCo17-BALB/c и HCo20-BALB/c с помощью HuMab (моноклонального антитела человека; Medarex Inc., Сан-Хосе, Калифорния, США). Эти мыши характеризуются двойным нокаутом по гену иммуноглобулина (Ig) мыши и гену мышиной легкой каппа-цепи, который в значительной степени инактивирует экспрессию антител, являющихся полностью мышиными. Различные линии мышей делали трансгенными путем вставки локусов, кодирующих тяжелую цепь Ig человека, и локусов, кодирующих легкую каппа-цепь Ig человека, и они отличались по количеству человеческих генов VH (вариабельного домена тяжелой цепи) и VL (вариабельного домена легкой цепи). Мышей HCo12-BALB/c получали путем перекрестного скрещивания с мышами KCo5-BALB/c (с трансгеном, кодирующим легкую каппа-цепь).

[00217] 48 мышей поочередно иммунизировали внутрибрюшинно (IP) с помощью 20 мкг SORTECDHis (SEQ ID NO: 179) и подкожно (SC, в основание хвоста) тем же белком с интервалом 14 дней. Осуществляли максимум восемь иммунизаций: 4 IP и 4 SC.

[00218] Согласно одному протоколу первую иммунизацию проводили с помощью SORTECDHis в полном адъюванте Фрейнда (CFA, Difco Laboratories, Детройт, Мичиган, США), следующие иммунизации - в неполном адъюванте Фрейнда (IFA). Согласно второму протоколу применяли SAS в качестве адъюванта на всех стадиях иммунизации. После обнаружения, что сывороточные титры являются достаточными (разведение сыворотки крови 1/50 или ниже давало положительный результат в скрининговом анализе, специфическом в отношении антигена, по меньшей мере в двух последовательных, проводимых два раза в неделю событиях скрининга), мышей дополнительно дважды

стимулировали внутривенно (IV) с помощью 10 мкг белка SORTECDHis в 100 мкл PBS, за четыре и три дня до слияния.

В. Получение HuMAb-гибридомы

[00219] Мышей HuMAb с выработкой достаточного антигенспецифического титра, как определено выше, умерщвляли и собирали селезенку и лимфатические узлы, прилегающие к брюшной аорте и полую вену. Слияние спленоцитов и клеток лимфатических узлов с линией мышинных клеток миеломы проводили путем электрослияния с применением системы для электрослияния CEEF 50 (Cyto Pulse Sciences, Глен Берни, Мэриленд, США), по сути, в соответствии с инструкциями производителя. Слитые клетки высевали в среду для культивирования слитых клеток, содержащую 10% бычьей сыворотки FetalClone I (Perbio), 1 mM пирувата натрия (Cambrex), 0,5 ед./мл пенициллина, 0,5 ед./мл стрептомицина (Cambrex), 50 мкМ 2-меркаптоэтанола (Invitrogen), 600 нг/мл интерлейкина 6 (IL-6) (Strathmann), 1 x HAT (Sigma) и 0,5 мг/мл канамицина (Invitrogen) в HyQ mADCF-Mab (Perbio). Через десять дней собирали супернатант и клетки обновляли средой для сбора, содержащей 10% бычьей сыворотки FetalClone I, 0,5 ед./мл пенициллина, 0,5 ед./мл стрептомицина, 600 нг/мл IL-6 и 1 x proHT (Cambrex) в HyQ mADCF-Mab. Супернатанты культур гибридомы подвергали скринингу с помощью первичных скрининговых анализов и гранул стрептавидина, связанного с SORTECDBAP (SEQ ID NO: 171), SORTECDBAPhB06-10 (SEQ ID NO: 176), SORTECDBAPhB12390 (SEQ ID NO: 177), для выявления гибридом, продуцирующих человеческие (или химерные) антитела к сортилину. Клетки гибридомы из определенных в ходе первичного скрининга лунок с наилучшим результатом высевали в полутвердую среду, изготовленную из 40% CloneMedia (Genetix, Гэмпшир, Великобритания) и 60% полной среды HyQ 2x (Hyclone, Уолтем, США). В случае каждой лунки из первичного скрининга ее содержимое высевали в лунку 6-луночного черного планшета Genetix. Из каждой лунки отбирали 25 субклонов с помощью системы ClonePix (Genetix). Субклоны отбирали в среду для сбора. Спустя семь дней супернатанты субклонов снова подвергали скринингу в отношении специфического к сортилину связывания IgG человека и измеряли концентрацию IgG человека с применением платформы Octet 384red (Fortebio, Менло-Парк,

США). Из каждой лунки первичного скрининга выбирали наилучший субклон и размножали его в среде для размножения, содержащей только 600 нг/мл IL-6, 0,5 ед./мл пенициллина, 0,5 ед./мл стрептомицина и 1 х ргоНТ. Субклоны размножали в следующем порядке: одна лунка 96-луночного планшета - одна лунка 24-луночного планшета - четыре лунки 24-луночного планшета - шесть лунок 6-луночного планшета. Клоны, полученные в результате этого процесса, были обозначены как первичные клоны (РС).

[00220] Антитела HuMab к сортилину по настоящему изобретению идентифицировали и подвергали анализу последовательностей.

10 **Пример 5. Анализ последовательностей специфических в отношении сортилина переменных доменов HuMab и клонирование в векторы экспрессии**

[00221] Из 0,2-5x10⁶ клеток гибридомы получали общую РНК и из 100 нг общей РНК получали 5'-RACE-комплементарную ДНК (кДНК) с помощью набора для амплификации кДНК SMART RACE (Clontech) в соответствии с инструкциями производителя. Области, кодирующие VH и VL, амплифицировали с помощью ПЦР и непосредственно клонировали в рамке считывания в векторы экспрессии p33G1f и p33Kappa (содержащие последовательности, кодирующие константные домены IgG1 человека/каппа) путем независимого от лигирования клонирования (Aslanidis, C. and PJ de Jong, Nucleic Acids Res 1990; 18 (20): 6069-74). Для каждого антитела секвенировали 16 клонов VL и 16 клонов VH. Для дополнительного изучения и экспрессии отбирали клоны с корректной открытой рамкой считывания (ORF). Осуществляли совместную транзientную экспрессию векторов всех комбинаций тяжелых цепей и легких цепей в клетках FreestyleTM 293-F с использованием 293fectin.

[00222] Полученные в результате последовательности показаны в данном документе в перечне последовательностей (SEQ ID NO:1-168). Последовательности CDR определяли в соответствии с изданными руководствами.

30 **Пример 6. Очистка антител**

[00223] Супернатант культуры фильтровали через тупиковые фильтры с размером пор 0,2 мкм, загружали на 5 мл колонки с белком А (rProtein A FF,

Amersham Bioscience) и элюировали с помощью 0,1 М лимонной кислоты-NaOH, pH 3. Элюат немедленно нейтрализовали с помощью 2 М Tris-HCl, pH 9, и подвергали диализу в 12,6 mM NaH_2PO_4 , 140 mM NaCl, pH 7,4 (B.Braun), O/N (в течение ночи). После диализа образцы подвергали стерилизующей фильтрации через тупиковые фильтры с размером пор 0,2 мкм. Чистоту определяли с помощью SDS-PAGE, а концентрацию измеряли с помощью нефелометрии и поглощения при 280 нм. Очищенные антитела разделяли на аликвоты и хранили при -80°C. После размораживания аликвоты очищенных антител выдерживали при 4°C. Масс-спектрометрию проводили для идентификации молекулярной массы тяжелой и легкой цепей антитела, экспрессируемого гибридами.

Пример 7. Получение антител мыши (1F2 и 5E1)

Иммуноген

[00224] Синтетический ген, кодирующий химерный иммуноген hSortilin-FC, (AA сортилина человека (78-756) из SEQ ID NO:169 и AA IgG1-FC человека (104-330) из SEQ ID NO:169), клонировали в pcDNA3.1 и использовали для экспрессии с применением системы freestyle от Invitrogen. Антиген очищали из супернатантов культуры клеток с помощью аффинной хроматографии на белке А с применением стандартных процедур очистки антител, описанных выше для антител человека.

Получение гибридомы

[00225] hSortilin-FC применяли в качестве иммуногена и им иммунизировали 5 мышей BALB/c. Мыши с удовлетворительным иммунным ответом выбирали для слияния клеток и получения гибридомы. Супернатанты гибридом подвергали скринингу с помощью ELISA с применением hSortilin-ECD в качестве покрывающего антигена. В общей сложности получали восемнадцать линий клеток гибридомы, происходящих из девяти исходных клонов.

Экспрессия

[00226] Гибридомы изначально выращивали в полной среде для выращивания, DMEM с 10% FBS+антибиотики, и затем обеспечивали адаптацию к среде CDhybridoma (Invitrogen) для проведения экспериментов по экспрессии.

Очистка

[00227] Моноклональные антитела мыши очищали из супернатантов культуры клеток гибридомы на сефарозе с белком G в соответствии со стандартными процедурами, рекомендованными поставщиком (GE healthcare).

5 **Пример 8. Аффинность специфических в отношении сортилина HuMab и антител мыши к рекомбинантной внеклеточной области сортилина**

[00228] Кинетику связывания антител HuMab к сортилину с сортилином определяли с применением Octet 384RED (ForteBio, Менло-Парк, США). Растворы HuMab с концентрацией 2 мкг/мл получали путем разведения в разбавителе образцов (ForteBio, арт. № 18-5028). Чувствительные к белку А сенсоры (ForteBio, арт. № 18-0004) предварительно смачивали буфером для исследования кинетики (1:10 разбавителя образцов в PBS) в течение по меньшей мере 600 секунд. Затем на сенсоры иммобилизовали раствор HuMab в течение 600 секунд. Ответ на исходном уровне получали путем погружения в буфер для исследования кинетики на 120 секунд. Ассоциацию с конструкциями SORTECD обеспечивали путем инкубации в течение 1000 секунд. После этого обеспечивали диссоциацию в буфере для исследования кинетики в течение 100 секунд. После диссоциации сенсоры восстанавливали (10 мМ глицина, pH 1,0) и нейтрализовали (буфер для исследования кинетики) 3 раза в течение 5 секунд. Все HuMab анализировали с использованием четырех концентраций конструкций SORTECD (10, 5, 2,5 и 1,25 мкг/мл). Молекулярную массу, составляющую 76,8 кДа, использовали для SORTECDHis. Данные аппроксимировали с помощью программного обеспечения ForteBio Analysis 6.4, используя глобальную общую аппроксимацию. Результаты показаны на **фигуре 3** и **фигуре 4**.

25 **Пример 9. Перекрестное блокирование HuMab к сортилину антителами**

[00229] Исследования по перекрестному блокированию антителами проводили с применением Octet 384RED (ForteBio, Менло-Парк, США). Растворы антител HuMab с концентрацией 2 мкг/мл получали путем разведения в разбавителе образцов (ForteBio, арт. № 18-5028). Чувствительные к аминокислотам сенсоры (ForteBio, арт. № 18-0008) использовали для иммобилизации HuMab. Перед связыванием с чувствительными к аминокислотам сенсорами HuMab разводили в буфере MES, pH 6,0 (18-5027). Связывание осуществляли при 30°C и

1000 об./мин. следующим образом. Чувствительные к аминок группам сенсоры предварительно смачивали в PBS и затем активировали с помощью раствора для активации EDC/NHS (ForteBio, арт. № 18-1033/18-1034) (в соответствии с инструкцией производителя) в течение 300 секунд. На активированные сенсоры

5 иммобилизовали HuMab в течение 600 секунд. Иммобилизованные сенсоры блокировали этаноламином (ForteBio, № по кат. 18-1039) для устранения остаточной реактивности в отношении аминок групп. После блокирования сенсоры помещали в PBS до применения. Анализ перекрестного блокирования начинали с установлением ответа на исходном уровне при 30°C и 1000 об./мин. Ответ на

10 исходном уровне получали путем погружения в разбавитель образца на 120 секунд. Ассоциацию с SORTECDHis обеспечивали в течение 300 секунд, непосредственно после чего обеспечивали ассоциацию с HuMab в течение 300 секунд. После ассоциации с HuMab сенсоры восстанавливали (10 mM глицина, pH 1,0) и нейтрализовали (разбавитель образцов) 3 раза в течение 5 секунд. Данные

15 обрабатывали с применением программного обеспечения ForteBio Analysis 6.4.

[00230] Антитела группировали на основании их профилей связывания с разными конструкциями сортилина, полученными перетасовкой (**фигура 2, фигура 3 и фигура 4**). Для подтверждения того, что все антитела, соответствующие области D (и области F), связываются с одной и той же

20 областью в ECD сортилина человека дикого типа, их способность блокировать связывание друг друга с ECD сортилина человека дикого типа характеризовали в исследовании перекрестного блокирования с применением Octet384 red. Например, при тестировании антител, соответствующих одной и той же области, первичное антитело будет блокировать связывание вторичного антитела и

25 наоборот. Тогда как при тестировании антител, соответствующих разным областям, перекрестное блокирование не будет происходить, поскольку только одна область блокируется первичным антителом, а остальные области доступны для связывания с вторичным антителом. На **фигуре 7** показано, что все антитела к области D и D+ перекрестно блокировали друг друга, что подтверждает

30 определение антител в класс соответствия области D и D+ на основании конструкций, полученных перетасовкой. Кроме того, эти данные также

подтверждают, что у химерных конструкций сортилина сохраняется сходство с ECD нативного сортилина человека дикого типа.

Пример 10. Характеристика связывания сортилина с лигандом PGRN в присутствии антител к сортилину

- 5 [00231] Значения IC₅₀ для антител определяли путем измерения смещения связывания PGRN с сортилином с помощью флуоресцентного анализа с временным разрешением (HTRF, CisBio), см. **фигуру 5** и **фигуру 6**.
- [00232] Эксперименты проводили в буфере для анализа (50 mM фосфата, pH 7,0, 0,1% BSA) в общем объеме 20 мкл в 384-луночном белом малообъемном
- 10 титрационном микропланшете от Greiner (784075, Greiner).
- [00233] Антитела предварительно инкубировали в течение 15 мин. при комнатной температуре с 50 nM HIS-меченного ECD сортилина и 4 nM PGRN (SULU20110924) перед добавлением 7 nM антитела к 6HIS-d2 и 0,7 nM антитела к PGRN-криптит Eu (Cisbio), разведенного в буфере для конъюгата (50 mM фосфата,
- 15 pH 7,0, 0,8 mM KF, 0,1% BSA). 20 мкМ нейротензина использовали в качестве положительного контроля, а DMSO в буфере использовали в качестве отрицательного контроля.
- [00234] Аналитический планшет инкубировали в течение 60 мин. при комнатной температуре и в течение ночи при 4°C перед считыванием планшета на
- 20 считывающем устройстве EnVision (Perkin Elmer).
- [00235] Пробы немеченного нейротензина и DMSO использовали соответственно в качестве положительного и отрицательного контроля для постановки анализа. Оценку зависимости доза-ответ для антител проводили с использованием десяти концентраций в диапазоне от 1 мкМ до 50 пМ по кривой
- 25 3-кратного разведения.
- [00236] Значения концентрации полумаксимального подавления (IC₅₀) рассчитывали с помощью нелинейной регрессии с использованием сигмоидальной кривой концентрация-ответ (с переменной крутизной) в XLfit 4 (IDBS, Великобритания) (**фигуры 5 и 6**).

Пример 11. Характеристика связывания сортилин – нейротензин в присутствии антител к сортилину

[00237] Значение IC₅₀ для специфического в отношении сортилина соединения AF38469 (Schröder et al, Bioorg Med Chem Lett. 2014 Jan 1;24(1):177-80, 2014) определяли путем измерения смещения связывания ³H-нейротензина с сортилином с применением сцинтилляционного анализа сближения (SPA).

[00238] Эксперименты проводили в буфере для анализа (50 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0,1% BSA, 0,1% Tween-20) в общем объеме 40 мкл в 384-луночном белом непрозрачном планшете Optiplate (6007299, Perkin Elmer).

[00239] 150 nM HIS-меченного сортилина предварительно инкубировали в течение 15 мин. при комнатной температуре с 1 мкМ специфического в отношении сортилина антитела (IgG1-6003-045 или IgG1-6003-068) или без него или с изотипическим контролем, представляющим собой IgG1 человека, перед добавлением растворов белка в лунки, содержащие AF38469 в серии концентраций от 50 мкМ до 2,5 нМ. Смесь инкубировали в течение 15 мин. при комнатной температуре на шейкере перед добавлением 5 нМ ³H-нейротензина и гранул, покрытых хелатом Ni, для визуализации (RPNQ0266, Perkin Elmer). Анализируемую смесь дополнительно инкубировали в течение 60 мин. при тех же условиях.

[00240] Через 6 ч. планшет считывали на ViewLux (время выдержки 360 с). Пробы немеченного нейротензина и DMSO использовали соответственно в качестве положительного и отрицательного контроля.

[00241] Оценку зависимости доза-ответ для AF38469 проводили с использованием десяти концентраций в диапазоне от 50 мкМ до 2,5 нМ по кривой 3-кратного разведения. Значения концентрации полумаксимального подавления (IC₅₀) рассчитывали с помощью нелинейной регрессии с использованием сигмоидальной кривой концентрация-ответ (с переменной крутизной) в *XLfit* 4 (IDBS, Великобритания). Результаты можно увидеть на **фигуре 8**.

Пример 12. Характеристика связывания сортилина с лигандом PGRN на поверхности клеток в присутствии антител к сортилину

[00242] В этом анализе использовали как клетки, транзигентно трансфицированные сортилином, так и стабильную линию клеток S18-НЕК

(клетки HEK, сверхэкспрессирующие сортилин человека). Клетки трипсинизировали и высевали при плотности 42000 клеток на лунку в 96-луночный планшет. В случае транзientно трансфицированных клеток клетки высевали в 96-луночные планшеты через 24 часа после трансфекции. На
5 следующий день среду полностью заменяли и к клеткам добавляли разведенные в среде тестируемые соединения на 30 мин. с последующим добавлением PGRN на 4 часа. В конце исследования (через 4,5 часа) клетки фиксировали и окрашивали для выявления PGRN. Все планшеты, подвергнутые окрашиванию, анализировали с помощью Cellomics Array Scan (Thermo Fischer) и среднюю интенсивность
10 окрашивания по PGRN/клетка/лунка использовали для анализа.

[00243] Используемый в анализе PGRN собирали из среды после транзientной трансфекции клеток HEK 293 плазидами, экспрессирующими PGRN. Уровни PGRN измеряли с применением набора ELISA для PGRN (R&D).

[00244] Добавленный к клеткам PGRN легко связывался и подвергался
15 эндоцитозу, что приводило к повышенному сигналу флуоресценции в лунках с клетками, трансфицированными сортилином. Добавление нейротензина предотвращало связывание сортилина с PGRN и интенсивность флуоресценции PGRN была аналогичной контрольным уровням, указывая на то, что PGRN не связывался и не подвергался эндоцитозу в присутствии нейротензина.

[00245] Оба HumAb к сортилину (45 и 68) препятствовали поглощению PGRN
20 с аналогичной нейротензину эффективностью. Изотипическое контрольное антитело B12 не оказывало никакого эффекта в отношении эндоцитоза или связывания PGRN. Результаты можно увидеть на **фигуре 9**.

Пример 13. Эффект антител на уровни внеклеточного PGRN

[00246] Было обнаружено, что как клетки HEK293, так и клетки S18-HEK
25 непрерывно секретируют PGRN в среду без какой-либо стимуляции.

[00247] Антитела и контрольные средства добавляли к клеткам S18-HEK для
оценки эффекта на уровень PGRN. Добавление нейротензина, известного пептидного лиганда сортилина, или антител 45, 68 и 811 человека к клеткам S18-
30 HEK приводило к повышению уровня PGRN в среде культуры клеток. Два антитела человека к сортилину (45 и 68) имели подобный к нейротензину эффект с повышением уровней PGRN до 202% и 201% соответственно. Антитело 811

повышало уровень PGRN в среде до 146% по сравнению с контролями B12, при этом изотипическое контрольное антитело использовали в качестве отрицательного контроля во всех исследованиях, и оно не показано никакого эффекта в отношении уровней PGRN. Эти наблюдения указывают, что тестируемые антитела к сортилину подавляли опосредованную сортилином интернализацию PGRN, повышая за счет этого уровень внеклеточного PGRN.

[00248] В 1-й день клетки S18-НЕК высевали в 96-луночный планшет. Через 24 часа среду полностью заменяли либо только средой (контроль), либо средой, дополненной тестируемым соединением. Все соединения тестировали при концентрации 10 мкМ, а антитела при концентрации 100 нМ, если не указано иное. Среду собирали на 3-й день и анализировали с помощью ELISA для PGRN (R&D). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью Cell TiterGlo (Pro Mega) для оценки цитотоксического эффекта соединений. Уровни PGRN в среде анализировали с помощью ELISA и значения нормализовали относительно контрольных лунок. Результаты можно увидеть на **фигуре 10**.

Пример 14. Анализ ELISA в отношении внеклеточного PGRN в iPSC

[00249] Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) получали с помощью неинтегративного перепрограммирования фибробластов человека (нормальных фибробластов кожи человека от 18-летнего мужчины; Lonza), как описано в другом документе (Rasmussen et al., Stem Cell Reports. 2014 Sep 9;3(3):404-13.). Для этих исследований использовали линию NHDF K1_shp53. iPSC изначально получали в среде mTESR и затем культивировали в виде монослоя в Pluripro (Cell Guidance System). Дифференцировку в нейроны инициировали в день 0 путем посева клеток на покрытые поли-L-орнитином/ламинином чашки и культивирования их в среде N3 (50% DMEM/F12 + 50% нейробазальной среды, дополненной 0,5% N2, 1% B27 с RA, 0,5 mM GlutaMAX, 0,5% NEA, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола и 2,5 мг/мл инсулина) с 500 нг/мл noggin и 10 мкМ SB431542. Среду обновляли каждый день. Спустя 11 дней индуцирования с помощью noggin/SB431542 клетки подвергали расщеплению с помощью диспазы и пересевали в покрытые поли-L-орнитином/ламинином чашки в среду N3. С этого момента среду N3 обновляли

каждые 2-3 дня и клетки подвергали расщеплению примерно каждые 10-14 дней с использованием аккутазы.

[00250] Дифференцированные из клеток iPSC нейроны высевали в 96-луночный планшет. Спустя одну неделю к клеткам добавляли антитела. Среда от клеток собирали через 48 часов или 96 часов и анализировали с помощью ELISA для PGRN человека (Enzo Life sciences), и при этом образцы анализировали согласно инструкциям производителя.

[00251] Тестируемые антитела человека к сортилину (45 и 68) повышали уровни PGRN в среде на различных уровнях через 48 часов и 96 часов. Антитело B12 и антитело к Hel представляли собой контрольные изотипические антитела (отрицательный контроль). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SD. Данные анализировали с помощью однофакторного Anova с последующим анализом с использованием критерия Даннета, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$. Результаты можно увидеть на **фигуре 12**.

Пример 15

[00252] Для анализа эффекта антител в отношении уровней PGRN в плазме крови гуманизированные мыши с KI по сортилину получали однократную или многократные инъекции (10 мг/кг) антител к сортилину или изотипического контроля посредством подкожных инъекций. Животных анестезировали и умерщвляли в различные моменты времени после введения доз, и уровни PGRN в плазме крови определяли с помощью ELISA.

А. Исследование в динамике. Мышей обрабатывали антителами (humab к сортилину или контрольным ab) и умерщвляли в разные моменты времени. У мышей, обработанных контрольными антителами (антителами к Hel), не наблюдали изменения в отношении уровней PGRN в плазме крови, тогда как у мышей, обработанных humab 45 к сортилину, наблюдали повышение уровней PGRN, которые, судя по всему, достигали своего пика в промежутке от 24 до 48 часов, а затем постепенно снижались, начиная примерно с 4-го дня. Уровни PGRN по-прежнему были повышенными на 7-й день.

В. Исследование средней длительности. На основании данных из исследования в динамике мышам с KI по сортилину дважды в неделю вводили дозы, составляющие 10 мг/кг, s.c, либо антитела 45 человека к сортилину, либо

изотипического контрольного антитела с целью поддержания постоянного уровня антител для исследования средней длительности (4 недели). Образцы крови собирали в начале исследования и каждую неделю для отслеживания изменений в отношении уровня PGRN в плазме крови. Уровни PGRN в плазме крови в начале исследования были аналогичными в обеих группах животных. Более высокие уровни PGRN в плазме крови наблюдали у мышей, обработанных антителом 45 к сортилину, начиная с недели 1, и они оставались повышенными на протяжении всего исследования. У мышей, обработанных контрольным аб, не наблюдали какого-либо повышения уровня PGRN в плазме крови, и он оставался на исходных уровнях (неделя 0).

С. Исследование зависимости доза-ответ. Разные дозы (4 дозы: 10, 2, 0,4 и 0,1 мг/кг) антитела к сортилину (45) и контрольного антитела (антитела к Hel) вводили посредством инъекции и мышей умерщвляли на 2-й день. Уровень PGRN в плазме крови повышался у мышей, обработанных humab к сортилину в дозе 10 мг/кг и 2 мг/кг, а более низкие дозы не оказывали эффекта в отношении уровня PGRN в плазме крови, что четко указывает на дозозависимый эффект антитела к сортилину в отношении уровней PGRN в плазме крови. У мышей, обработанных контрольным антителом, не наблюдали никакого изменения в отношении уровней PGRN.

[00253] Мышей анестезировали с помощью IP введения 0,4 мл авертина и кровь из сердца собирали и переносили во флакон с 500 мкл kEDTA. Образцы выдерживали на льду до проведения центрифугирования при 3600 G в течение 15 мин. при 4C. Плазму крови переносили пипеткой во флакон micronic и замораживали при -20°C. Уровень PGRN в образцах измеряли с применением набора ELISA для PGRN (Adipogen) согласно инструкциям производителя. Результаты можно увидеть на **фигуре 13**.

Пример 16. Картирование эпитопов антител, нацеливающихся на взаимодействие програнулин-сортилин, с помощью водород-дейтериевого обмена с последующей масс-спектрометрией

[00254] При проведении водород-дейтериевого обмена с последующей масс-спектрометрией (HDX-MS) измеряли скорость обмена атомов водорода амидной группы остова белка. Таким образом можно изучать конформационную динамику

всего остова белка, за исключением остатков пролина. Скорость реакции обмена определяли по состоянию амидной группы остова образовывать водородные связи и в меньшей степени по доступности для растворителя. Незначительные изменения в отношении этих двух параметров, например, обусловленные

5 присутствием лиганда, могут наблюдаться в виде изменения уровня включения дейтерия.

[00255] Для определения сублокализации изменений включения дейтерия белок обрабатывали кислотоустойчивой протеазой (например, пепсином), которая обеспечивает образование локальных областей обычно из десяти - пятнадцати

10 аминокислот. Области, в которых наблюдается смещение в присутствии лиганда, либо непосредственно вовлечены в связывание граничной поверхности, либо аллостерически влияют на процесс связывания.

Картирование эпитопов антител

[00256] Включение дейтерия во внеклеточную область сортилина (**SEQ ID**

15 **NO:188**) измеряли в отсутствии и присутствии mAb45, mAb68, mAb811 и антитела, названного mAb30, которое не связывается с областью D. Для гарантии того, что измерения будут проводится в неизменных условиях, обеспечивали уравнивание комплексов в течение 15 мин. при 25°C перед иницированием реакции обмена. Реакцию обмена иницировали путем разведения образцов белка

20 1:9 (об./об.) в дейтерированном буфере (99% D₂O, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pD_{счит.} = 7,6). Спустя различные моменты времени (15 с, 1 мин., 10 мин., 1 ч. и 8 ч.) реакцию обмена гасили путем разведения 1:1 (об./об.) ледяным буфером для гашения (2 M глицина, 0,8 M Tris-(2-карбокситетил)фосфина (TCPEP), pH = 2,3), со снижением за счет этого pH до 2,46. Подвергнутые гашению образцы немедленно

25 помещали в морозильную установку, поддерживающую -80°, и хранили в ней до проведения анализа. Полностью дейтерированные контрольные образцы получали путем разведения образцов сортилина в соотношении 1:9 (об./об.) в дейтерированном денатурирующем буфере (6 M гуанидиния хлорида, 99% D₂O, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pD_{счит.} = 7,6) с последующим инкубированием при

30 25°C в течение 16 ч. перед их гашением и произведением манипуляций, как описано выше.

[00257] Подвергнутые гашению образцы размораживали и вводили в охлажденную (0°C) систему на основе обращенно-фазовой UPLC-HDX (Waters Inc., США), оборудованную предварительно заполненной пепсином колонкой (внутренний объем 60 мкл, гранулы пепсина приобретали у Thermo Scientific Inc.).

- 5 В данной случае дейтерированные образцы белка подвергали отслеживаемому в режиме реального времени расщеплению пепсином при 20°C и полученные в результате действия пепсина пептиды разделяли с помощью обращенно-фазовой UPLC. Пептиды ионизировали с помощью электрораспылительной ионизации в масс-спектрометре (масс-спектрометр Synapt G2, Waters Inc, Великобритания),
10 при этом пептиды дополнительно разделяли на основании подвижности ионов перед окончательным определением их массы.

- [00258] Идентификацию пептидов проводили с использованием полностью восстановленных и недейтерированных образцов с помощью тандемной масс-спектрометрии, в которой используется комбинация принципов сбора данных, не
15 зависящих от полученной ранее информации (MSe) и зависящих от нее.

Анализ данных

Идентификация пептидов

- [00259] Полученные масс-спектры представляли собой фиксированную массу, скорректированную относительно GFP, и анализировали в PLGS 3.0, который
20 подбирал соответствия между родительскими и фрагментированными ионами с локальной базой данных белков. Все идентификации пептидов внимательно оценивали вручную.

- [00260] Определение уровня включения дейтерия. Полученные масс-спектры представляли собой фиксированную массу, скорректированную относительно
25 GFP, и программное обеспечение DynamX 3.0 (Waters Inc., USA) применяли для определения уровня включения дейтерия для всех пептидов сортилина в присутствии либо отсутствии антител.

- [00261] Считалось, что пептид является частью связывающего эпитопа, если наблюдали защиту от обмена более 0,5D в присутствии антитела.

Таблица 1. Таблица с идентифицированными с помощью HDX-MS конформационными эпитопами

Антитело	Картированный с помощью HDX-MS эпитоп относительно SEQ ID NO:169				
	109-114	126-153		570-572	588-597
45	109-114	126-153		570-572	588-597
68	109-114	126-144	154-159	570-572	593-597
811-02	109-114	126-144			593-597

Пример 17. Микродиализ для оценки уровней програнулина в головном мозге бодрствующих свободно двигающихся животных

- 5 [00262] Двухтактный способ микродиализа применяли для оценки уровня програнулина (PRGN) в ISF головного мозга у бодрствующих и свободно двигающихся мышей. Мышей содержали поодиночке в контролируемых условиях температуры ($22 \pm 1,5^\circ\text{C}$) и влажности (55-65%) и поддерживали 12:12-часовой цикл света/темноты (включение света в 06:00 ч.). Пища и вода были доступны без
- 10 ограничений. Данное исследование проводили на гиппокампе мышей с нокином по человеческому сортилину (hSORT1) (возрастом 22 недели). Для обеспечения возможности осуществления микродиализа в гиппокампе мышей анестезировали изофлураном и в головном мозг стереотаксически имплантировали
- 15 внутрицеребральную направляющую канюлю (CMA), располагая микродиализный зонд в гиппокампе (координаты наконечника зонда: на 3,1 мм кзади и на 2,8 мм латерально от брегмы и на 1,3 мм относительно твердой мозговой оболочки) в соответствии с атласом Paxinos и Franklin 2001. Акриловый цемент применяли для фиксации направляющих канюль. После имплантации канюли обеспечивали восстановление мышей после операции в течение 7 дней
- 20 перед осуществлением диализа. В течение первых 5 дней, включая день проведения хирургического вмешательства, животные получали обезболивающие средства и антибиотики (римадил и Noromox Prolongatum). За 24 ч. до начала микродиализных экспериментов насос также подсоединяли к выпускной трубке с целью предотвращения потери перфузионной жидкости из зонда при
- 25 пропускании жидкости через трубку. В качестве перфузионного буфера 25% фракции V бычьего альбумина (Sigma) разводили до 0,2% искусственной CSF (aCSF; в mM: 147 NaCl, 2,7 KCl, 1,2 CaCl₂, 0,85 MgCl₂) в день его применения и

фильтровали через мембрану с размером пор 0,1 мкм. Фактическую скорость потока у насоса определяли без присоединенного зонда. Пробирки для образцов взвешивали до и после забора образцов в течение заданного периода времени и рассчитывали скорость потока. Затем насос устанавливали на постоянный поток 1 мкл/мин. На протяжении всего периода экспериментов использовали 120-мин. режим забора образцов и собирали 12 образцов (12 ч. сбора) (**фигура 17**, что касается процедуры). В конце экспериментов у животных брали кровь, животных подвергали перфузии и собирали образцы головного мозга. Диализаты, плазму крови и образцы головного мозга хранили при -80°C до определения уровня PRGN с помощью ELISA.

[00263] Измерение уровней PRGN каждые 2 ч. в течение 24 ч. изображено на **фигуре 17**. В каждый период времени, за исключением 24 ч. после начала сбора диализатов, уровни PRGN значительно повышались у животных, обработанных с помощью mab №45, по сравнению с таковыми у животных, обработанных с помощью PBS (**фигура 18a**). Уровни PRGN оставались постоянными с течением времени от 4 ч. до 16 ч. после введения зонда в гиппокамп. Уровень PRGN в первом диализате был повышен, вероятно, вследствие введения зонда в гиппокамп. Предполагается, что уровни PRGN понижаются через ≥ 18 ч./20 ч. после введения зонда, вероятно, вследствие закупоривания мембраны зонда, поскольку это происходило в обеих группах (и ранее наблюдалось в других двухтактных исследованиях).

[00264] За исходный уровень принимали среднее значение $\pm$ SEM от 12 образцов диализа через 24 ч. после обработки антителом или средой-носителем, для каждого животного и затем данные от всех животных объединяли (**фигура 18b**). Различия в данных от животных, обработанных с помощью mab №45 и PBS, анализировали с помощью двухвыборочного t-критерия для независимых выборок. Исходные уровни PRGN у животных, обработанных с помощью mab №45, значительно повышались по сравнению с таковыми у животных, обработанных с помощью PBS ($p < 0,001$, F10,0, DFn, 9 Dfd 7; $3,3 \pm 0,3$ нг/мл, $n = 10$ по сравнению с $1,1 \pm 0,1$ нг/мл, $n = 8$) (**фигура 18b**).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранное из группы, состоящей из антител (1)-(21);

Антитело (1), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:1**;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:2**;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:3**;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:4**;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:5**; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:6**.

Антитело (2), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:9**;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:10**;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:11**;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:12**;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:13**; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:14**.

Антитело (3), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:17**;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:18**;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:19**;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:20**;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:21**; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:22**.

Антитело (4), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:25**;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:26**;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:27**;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:28**;

- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:29; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:30.

Антитело (5), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:33;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:34;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:35;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:36;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:37; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:38.

Антитело (6), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:41;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:42;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:43;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:44;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:45; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:46.

Антитело (7), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:49;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:50;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:51;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:52;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:53; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:54.

Антитело (8), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:57;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:58;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:59;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:60;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:61; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:62.

Антитело (9), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:65**;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:66**;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:67**;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:68**;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:69**; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:70**.

Антитело (10), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:73**;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:74**;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:75**;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:76**;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:77**; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:78**.

Антитело (11), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:81**;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:82**;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:83**;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:84**;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:85**; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:86**.

Антитело (12), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:89**;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:90**;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:91**;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:92**;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:93**; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:94**.

Антитело (13), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:97**;

- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:98**;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:99**;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:100**;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:101**; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:102**.

Антитело (14), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:105**;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:106**;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:107**;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:108**;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:109**; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:110**.

Антитело (15), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:113**;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:114**;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:115**;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:116**;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:117**; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:118**.

Антитело (16), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:121**;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:122**;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:123**;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:124**;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:125**; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:126**.

Антитело (17), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:129**;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:130**;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит **SEQ ID NO:131**;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит **SEQ ID NO:132**;

- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:133; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:134.

Антитело (18), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:137;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:138;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:139;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:140;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:141; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:142.

Антитело (19), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:145;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:146;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:147;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:148;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:149; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:150.

Антитело (20), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:153;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:154;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:155;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:156;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:157; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:158.

Антитело (21), характеризующееся тем, что:

- a. L-CDR1 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:161;
- b. L-CDR2 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:162;
- c. L-CDR3 переменного домена легкой цепи, содержит SEQ ID NO:163;
- d. H-CDR1 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:164;
- e. H-CDR2 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:165; и
- f. H-CDR3 переменного домена тяжелой цепи, содержит SEQ ID NO:166.

2. Антитело по п. 1, причем указанное антитело дополнительно характеризуется:

Антитело (1) дополнительно характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:8** и вариабельной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:7**.

Антитело (2) дополнительно характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:16** и вариабельной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:15**.

Антитело (3) дополнительно характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:24** и вариабельной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:23**.

Антитело (4) дополнительно характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:32** и вариабельной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:31**.

Антитело (5) дополнительно характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:40** и вариабельной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:39**.

Антитело (6) дополнительно характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:48** и вариабельной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:47**.

Антитело (7) дополнительно характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:56** и вариабельной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:55**.

Антитело (8) дополнительно характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:64** и вариабельной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:63**.

Антитело (9) дополнительно характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:72** и вариабельной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:71**.

Антитело (10) дополнительно характеризуется переменной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:80** и переменной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:79**.

Антитело (11) дополнительно характеризуется переменной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:88** и переменной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:87**.

Антитело (12) дополнительно характеризуется переменной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:96** и переменной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:95**.

Антитело (13) дополнительно характеризуется переменной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:104** и переменной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:103**.

Антитело (14) дополнительно характеризуется переменной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:112** и переменной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:111**.

Антитело (15) дополнительно характеризуется переменной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:120** и переменной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:119**.

Антитело (16) дополнительно характеризуется переменной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:128** и переменной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:127**.

Антитело (17) дополнительно характеризуется переменной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:136** и переменной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:135**.

Антитело (18) дополнительно характеризуется переменной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:144** и переменной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:143**.

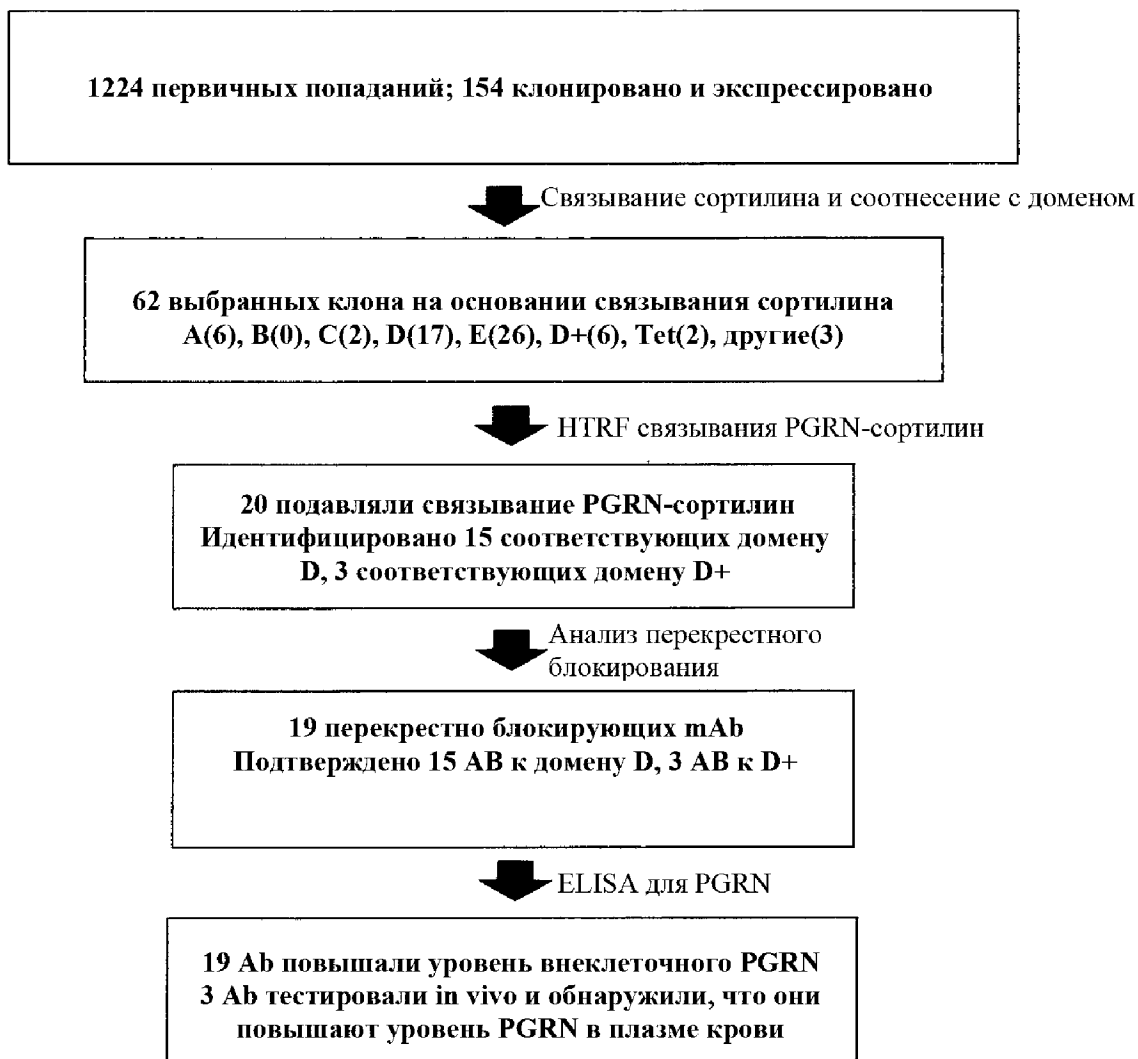
Антитело (19) дополнительно характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:152** и вариабельной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:151**.

Антитело (20) дополнительно характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:160** и вариабельной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:159**.

Антитело (21) дополнительно характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи содержащей **SEQ ID NO:168** и вариабельной областью легкой цепи содержащей **SEQ ID NO:167**.

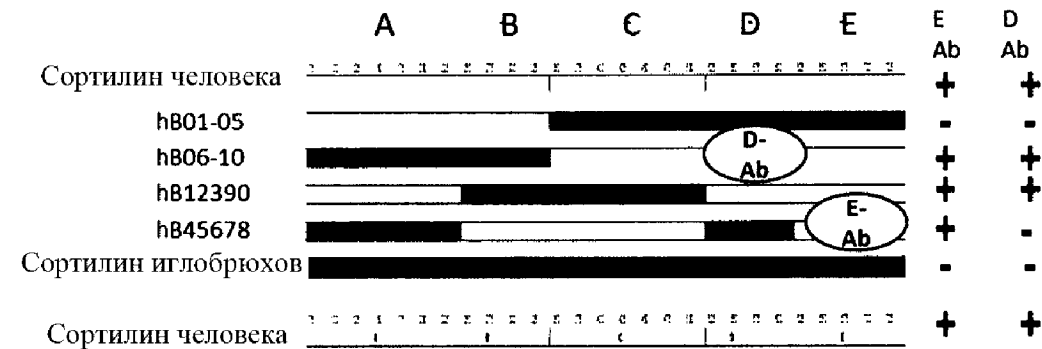
3. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-2 и фармацевтически приемлемый носитель для лечения заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента.
4. Применение антитела по любому из пп. 1-2, для лечения заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента.
5. Применение антитела по любому из пп. 1-2 при изготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента.
6. Применение фармацевтической композиции по п. 3 для лечения заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента.
7. Применение фармацевтической композиции по п. 3 при изготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента.
8. Способ предупреждения или лечения заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента, включающий введение эффективной дозы антитела по любому из пп. 1-2.
9. Способ предупреждения или лечения заболевания, ассоциированного с пониженными уровнями PGRN в головном мозге пациента, включающий введение фармацевтической композиции по п. 3.

10. Применение по пп. 4-7, где заболевание представляет собой: лобно-височную деменцию, боковой амиотрофический склероз или протеинопатии TAR-ДНК-связывающего белка 43, такие как болезнь Альцгеймера.
11. Способ по пп. 8-9, где заболевание представляет собой: лобно-височную деменцию, боковой амиотрофический склероз или протеинопатии TAR-ДНК-связывающего белка 43, такие как болезнь Альцгеймера.
12. Применение по пп. 4-7, где длительное лечение продолжается в течение по меньшей мере 2 недель.
13. Применение по пп. 4-7, где длительное лечение продолжается в течение по меньшей мере 1 месяца.
14. Применение по пп. 4-7, где длительное лечение продолжается в течение по меньшей мере 6 месяцев.
15. Применение по пп. 4-7, где длительное лечение продолжается в течение по меньшей мере 1 года.
16. Способ по пп. 8-9, где длительное лечение продолжается в течение по меньшей мере 2 недель.
17. Способ по пп. 8-9, где длительное лечение продолжается в течение по меньшей мере 1 месяца.
18. Способ по пп. 8-9, где длительное лечение продолжается в течение по меньшей мере 6 месяцев.
19. Способ по пп. 8-9, где длительное лечение продолжается в течение по меньшей мере 1 года.
20. Набор, содержащий антитело по любому из пп. 1-2 или фармацевтическую композицию по п.3.
21. Антитело по любому из пп. 1-2, которое получено или произведено в линии клеток, такой как линия клеток человека, линия клеток млекопитающего, отличного от человека, линия клеток насекомого, дрожжей или бактерии.

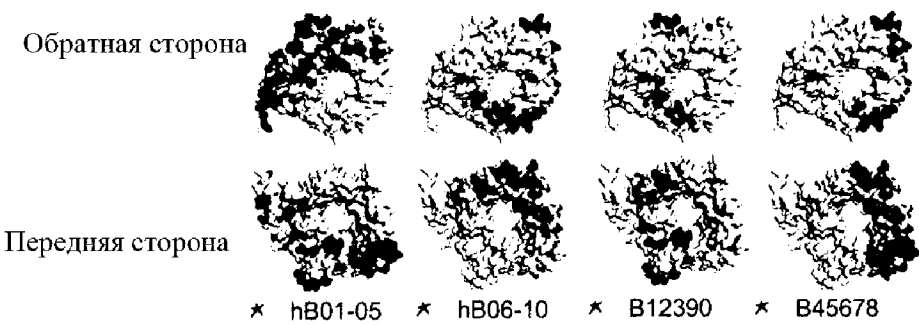


Фиг. 1

A



B



C

mAb	Домен	hSort	hB01-05	hB06-10	B12390	B45678	Tet
6	A	+	+	-	+	-	-
0	B	+	+	-	-	+	-
2	C	+	-	+	-	+	-
17	D	+	-	+	+	-	-
26	E	+	-	+	+	+	-
6	D+	+	-	-	+	-	-
2	Tet	+	+	+	+	+	+
3	Другой	+	+/-	+/-	+/-	+	-

Фиг. 2

mAb	Домен	hSort	hB01-05	hB06-10	B12390	B45678	Tet
002	D	2,40	NB	43,30	2,44	NB	NB
044	D	1,38	NB	21,20	1,03	NB	NB
045	D	1,56	NB	9,60	1,10	NB	NB
68	D+	1,80	NB	NB	1,87	NB	NB
088	D	2,49	NB	9,55	1,57	NB	NB
093-01	D	3,47	NB	44,53	2,13	NB	NB
093-05	D	2,88	NB	43,24	1,78	NB	NB
193	D	2,07	NB	5,57	0,83	NB	NB
531	D+	5,50	NB	NB	2,29	NB	NB
548	D+	4,49	NB	NB	3,36	NB	NB
562	D	2,23	NB	24,56	1,34	NB	NB
566	D	2,93	NB	42,55	2,12	NB	NB
811	D	1,81	NB	8,00	1,08	NB	NB
849	D	1,01	NB	17,08	0,78	NB	NB
924	D	6,76	NB	20,01	3,83	NB	NB
1276	D	2,24	NB	8,78	0,93	NB	NB
1289	D	1,62	NB	15,23	0,96	NB	NB
1320	D	19,14	NB	55,43	12,32	NB	NB

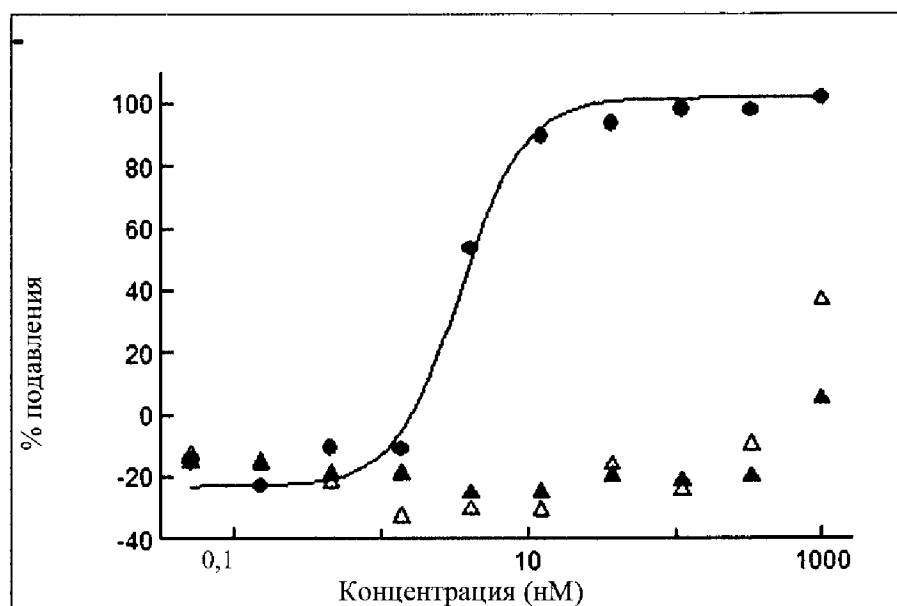
+	EC50 0,1-10 нг/мл
+	EC50 >10 нг/мл
NB	Отсутствие связывания

Фиг. 3

mAb	Домен	hSort	hB01-05	hB06-10	B12390	B45678	Tet
1F2F4	D	1,56	NB	9,60	1,10	NB	NB
5E1F6	D	1,14	NB	0,72	0,59	NB	NB

+	Связывание
NB	Отсутствие связывания

Фиг. 4



Антитело	IC50 (нМ)
IgG1-6003-045	3,5 ± 0,6
Ab к E-домену	>1000 *
IgG1-B12 (контр.)	>1000 **

* эффект антитела был слишком слабым для подбора кривой зависимости доза-ответ. 6% подавление при 1 мкМ

** эффект контр. антитела был слишком слабым для подбора кривой зависимости доза-ответ. 37% подавление при 1 мкМ

Фиг. 5

Ab	Наиболее высокая конц.	% подавл. наиболее высокой конц.	IC50 (нМ)	Домен
IgG1-6003-002	500	91	4,3	D
IgG1-6003-044	1000	101	3,4	D
IgG1-6003-045	1000	102	3,9	D
IgG1-6003-068	1000	92	22	D+
IgG1-6003-088	1000	96	2,5	D
IgG1-6003-093-L01	1000	82	13	D
IgG1-6003-093-L05	1000	95	35	D
IgG1-6003-193	1000	93	1,8	D
IgG1-6003-531	1000	102	2,5	D+
IgG1-6003-548	600	87	11	D+
IgG1-6003-562	1000	100	5,8	D
IgG1-6003-566	1000	100	2,6	D
IgG1-6003-811	1000	102	4,4	D
IgG1-6003-849	1000	101	3,8	D
IgG1-6003-924	1000	100	3,3	D
IgG1-6003-1276	1000	108	2,5	D
IgG1-6003-1289	800	98	3,0	D
IgG1-6003-1320	900	75	32	D
IgG1-B12	1000	37	-	-

Фиг. 6

		D+	D+	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
Домен	Антитело	548	531	002	044	045	088	193	562	566	811	878	1289	849
D+	548	0,04	0,01	0,00	0,04	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,01	0,03
D+	531	0,02	0,00	-0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
D	002	0,00	-0,02	-0,02	0,00	0,02	-0,02	-0,02	0,03	-0,02	-0,01	-0,02	-0,01	0,03
D	044	0,02	0,00	-0,01	0,00	0,02	-0,01	-0,01	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,01	0,00
D	045	0,02	0,00	0,00	0,01	0,03	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
D	088	0,02	-0,01	-0,01	0,02	0,02	-0,01	-0,01	0,01	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00
D	193	0,03	0,02	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02
D	562	0,01	0,00	-0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00
D	566	0,00	-0,02	-0,04	-0,01	-0,01	-0,03	-0,03	-0,02	-0,03	-0,02	-0,03	-0,02	-0,03
D	811	-0,01	-0,02	-0,01	0,00	0,01	-0,02	-0,02	0,00	-0,02	-0,01	-0,02	-0,01	0,00
D	878	0,00	-0,01	-0,02	-0,01	0,00	-0,02	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	-0,01
D	1289	-0,01	-0,02	-0,01	-0,01	0,00	-0,03	-0,03	-0,02	-0,03	-0,02	-0,03	-0,02	-0,02
D	849	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,02	-0,01	-0,02	0,00	-0,01	0,00	-0,02	0,01	-0,01
D	1276	0,01	0,01	-0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,08
D	924	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
D	093-L01	0,01	0,00	-0,01	0,02	0,03	0,00	-0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
D	093-L05	0,01	0,00	-0,01	0,00	0,01	-0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01
D	5E1F6	0,02	0,01	0,00	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02
D	1F2F4	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	-0,01	0,00	-0,01	0,01	0,00	0,01	0,00
D+	068	-0,01	0,00	-0,01	-0,02	-0,01	0,00	-0,02	0,00	-0,01	0,00	-0,02	0,00	-0,01
D	1320	-0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	-0,01	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	-0,01

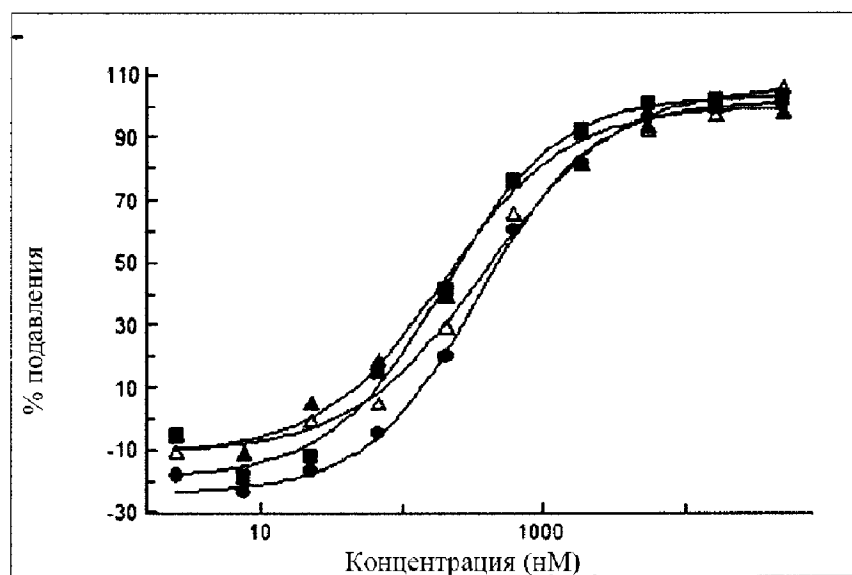
Фиг. 7

		1276	924	093-L01	093-L05	5E1F6	1F2F4	068	1320	A1
		D	D	D	D	D	D	D+	D	A
Домен	Антитело	1276	924	093-L01	093-L05	5E1F6	1F2F4	068	1320	AbA1
D+	548	0,02	0,02	0,04	0,01	0,02	x	0,00	0,04	0,07
D+	531	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	x	0,00	0,04	0,69
D	002	0,02	0,03	0,00	0,01	0,07	x	-0,02	0,02	0,57
D	044	0,01	0,01	0,00	0,03	0,02	x	-0,01	0,01	0,49
D	045	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	x	0,00	0,01	0,52
D	088	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	x	-0,02	0,03	0,77
D	193	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03	x	0,01	0,04	0,42
D	562	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	x	-0,01	0,01	0,23
D	566	-0,03	-0,01	0,01	0,00	-0,02	-0,01	-0,04	0,01	0,58
D	811	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	x	-0,02	0,01	0,77
D	1289	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	x	-0,02	0,00	0,45
D	849	-0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	X	-0,01	0,01	0,73
D	1276	0,01	0,05	0,01	0,01	0,01	X	0,00	0,01	0,70
D	924	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	X	0,00	0,02	0,52
D	093-L01	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	X	-0,01	0,01	0,65
D	093-L05	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	X	-0,01	0,03	0,62
D	5E1F6	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03	0,39
D	1F2F4	0,00	0,04	-0,01	0,01	0,01	0,01	-0,01	0,01	0,41
D+	068	-0,01	0,01	0,02	0,00	0,01	X	-0,01	0,01	0,52
D	1320	-0,01	0,00	0,04	0,00	-0,01	0,00	-0,01	0,00	0,19

Фиг. 7 (продолж.)

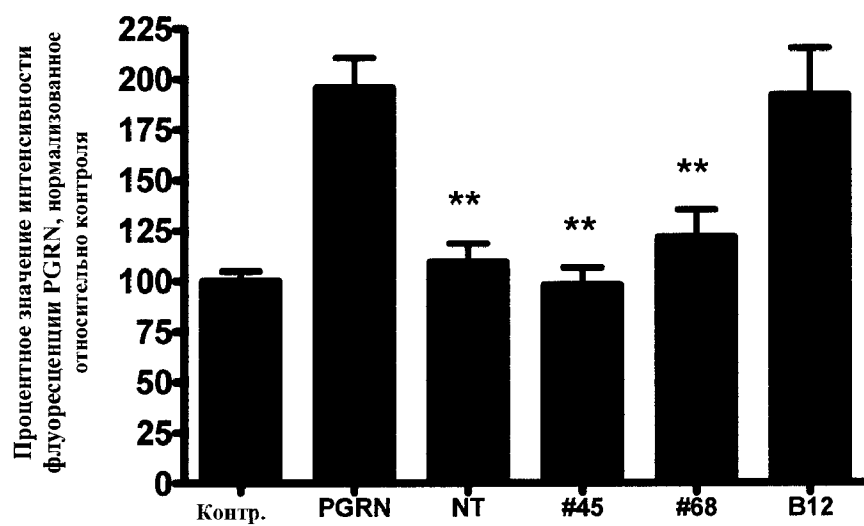
		530	784	010	471	532	910	550	826	942
		E	E	E	E	E	E	Tetra	E	A
Домен	Антитело	AbE1	AbE2	AbE3	AbE4	AbE5	AbE6	Abtet	AbE7	AbA2
D+	548	0,01	0,03	0,22	0,26	0,27	0,22	0,06	0,01	0,05
D+	531	0,28	0,60	0,83	0,92	0,93	0,87	0,69	0,51	0,22
D	002	0,25	0,52	0,74	0,70	0,79	0,78	0,67	0,42	0,19
D	044	0,18	0,42	0,64	0,73	0,68	0,68	0,56	0,32	0,20
D	045	0,23	0,47	0,67	0,72	0,72	0,70	0,60	0,36	0,19
D	088	0,42	0,79	1,00	1,19	1,13	1,09	0,96	0,64	0,24
D	193	0,19	0,38	0,54	0,57	0,52	0,53	0,43	0,27	0,19
D	562	b	0,23	0,39	0,36	0,33	0,33	0,24	0,13	0,13
D	566	0,25	0,55	0,77	0,88	0,87	0,79	0,60	0,35	0,24
D	811	0,42	0,79	1,02	1,17	1,13	1,09	0,97	0,65	0,24
D	1289	0,18	0,43	0,56	0,67	0,63	0,64	0,47	0,29	0,18
D	849	0,37	0,74	0,96	1,11	1,08	1,04	0,90	0,58	0,25
D	1276	0,39	0,74	0,93	1,03	1,00	0,97	0,83	0,57	0,26
D	924	0,25	0,50	0,66	0,67	0,69	0,65	0,52	0,33	0,22
D	093-L01	0,31	0,64	0,82	0,93	0,92	0,87	0,78	0,49	0,23
D	093-L05	0,29	0,58	0,80	0,89	0,88	0,84	0,69	0,45	0,22
D	5E1F6	0,19	0,39	0,62	0,57	0,59	0,54	0,40	0,27	0,18
D	1F2F4	0,16	0,38	0,60	0,63	0,62	0,58	0,44	0,26	0,18
D+	068	0,26	0,58	0,80	0,94	0,94	0,89	0,80	0,43	0,12
D	1320	b	b	0,22	0,28	0,28	0,29	0,17	b	b

Фиг. 7 (продолж.)



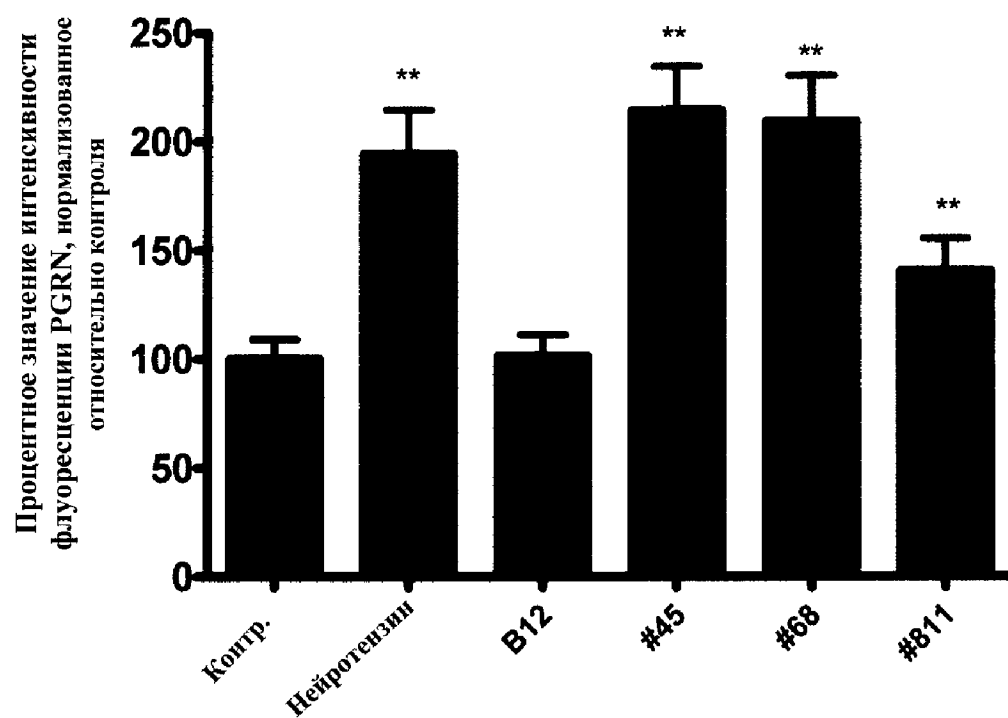
Сортилин + антитело	IC50 AF38469 (нМ)
Сортилин	371 ± 79
Сортилин + IgG1-6003-045	198 ± 32
Сортилин + IgG1-6003-068	199 ± 11
Сортилин + изотипический контроль hIgG1	385 ± 113

Фиг. 8



Фиг. 9

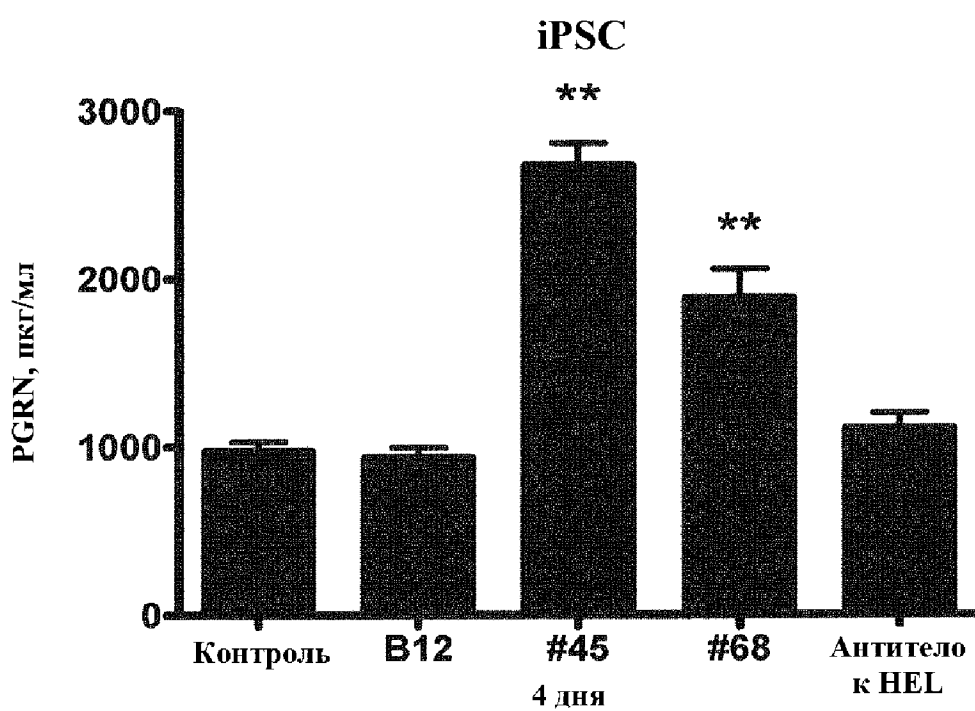
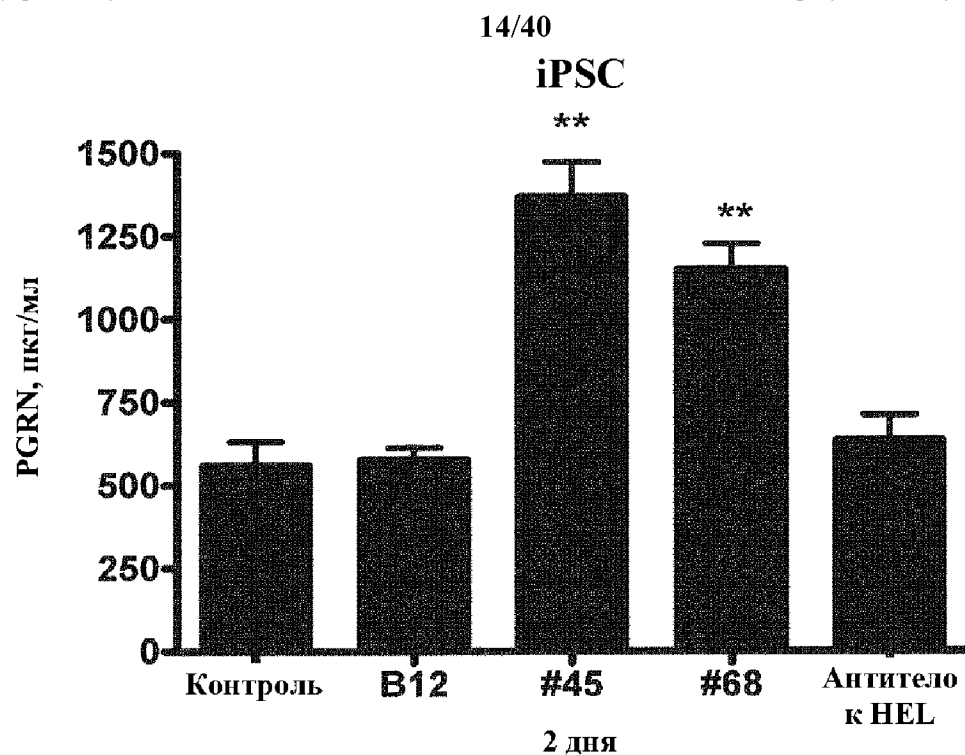
12/40



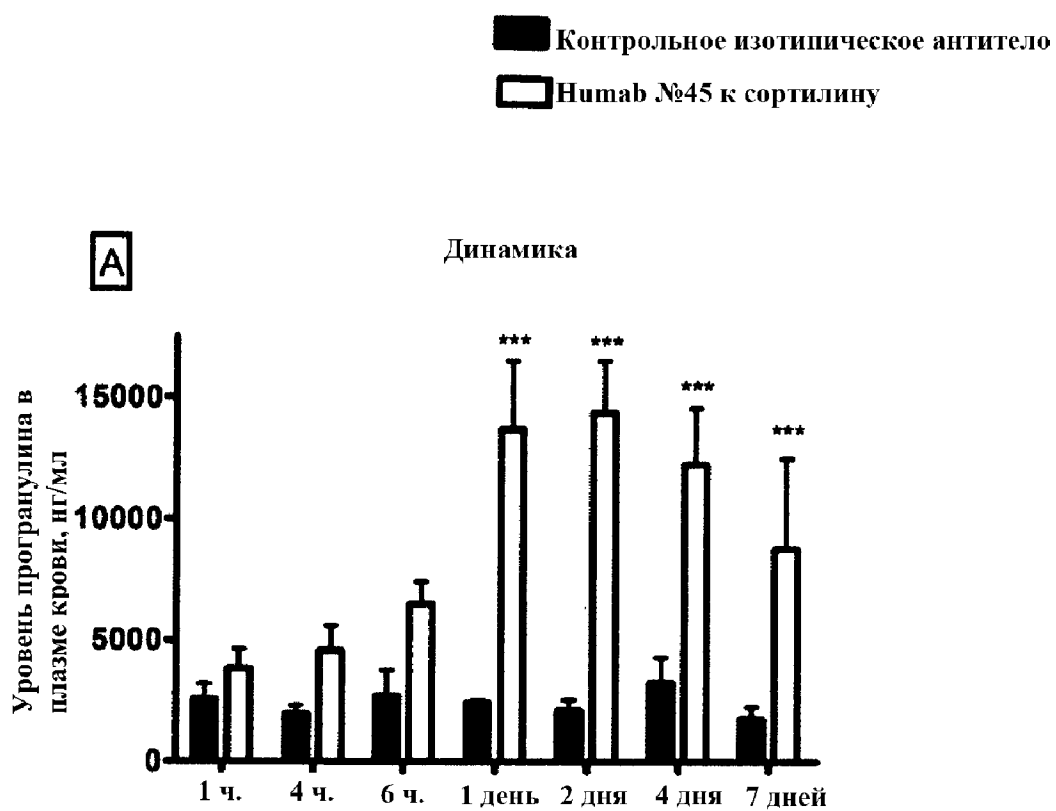
Фиг. 10

№ Ab	% PGRN	№ Ab	% PGRN
002	142	849	149
044	166	1276	163
045	202	924	125
088	121	093-L01	116
193	207	093-L05	140
562	139	1320	114
566	139	1F2F4	282
811	146	5E1F6	177
1289	117		
548	139	68	201
531	140		

Фиг. 11



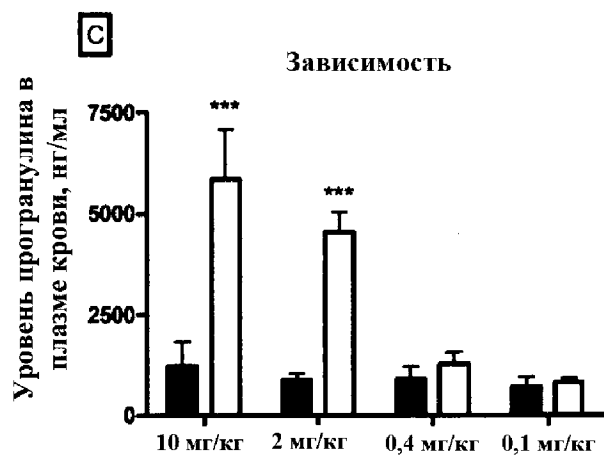
Фиг. 12



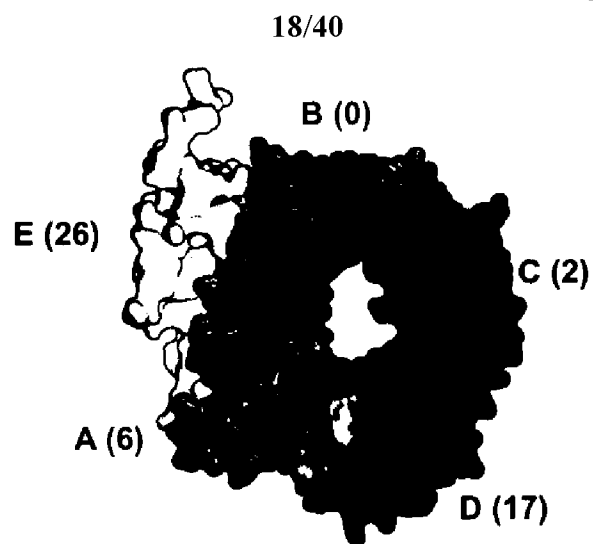
Фиг. 13а



Фиг. 13b



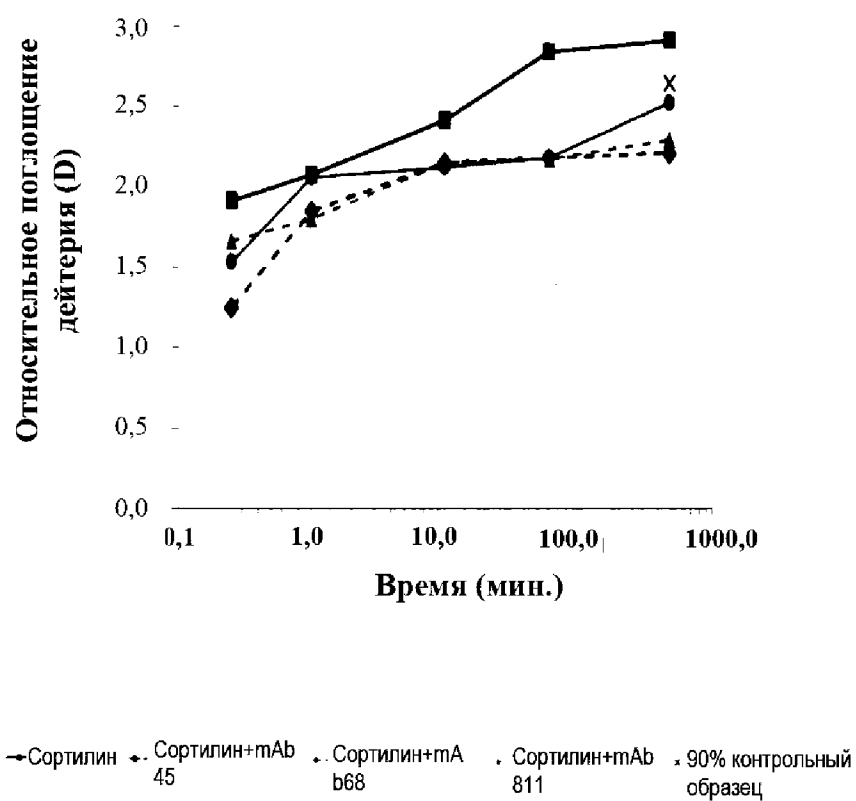
Фиг. 13с



Фиг. 14

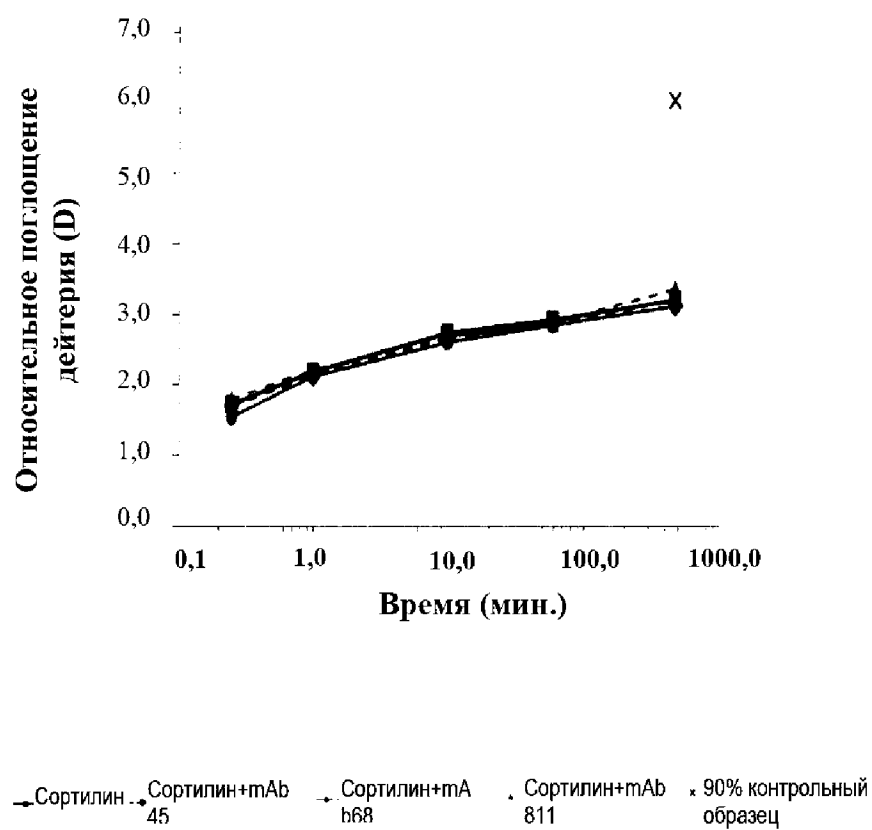
19/40

109-114 RGSVSL



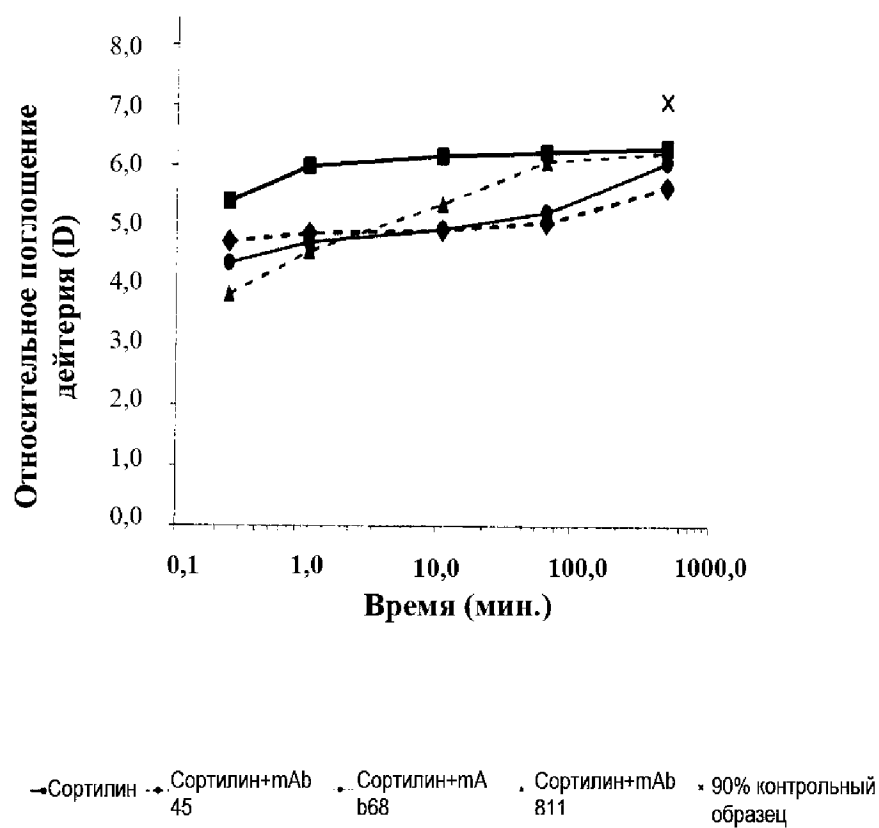
Фиг. 15а (1)

115-125 SWVGDSTGVIL

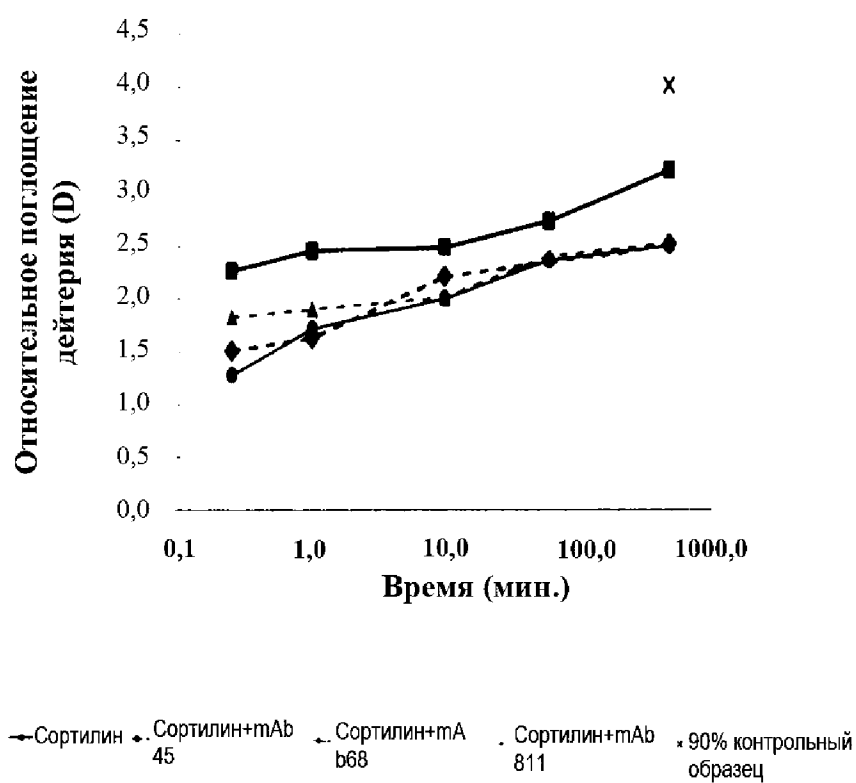


Фиг. 15а (2)

126-138 VLTFHVPLVIMT

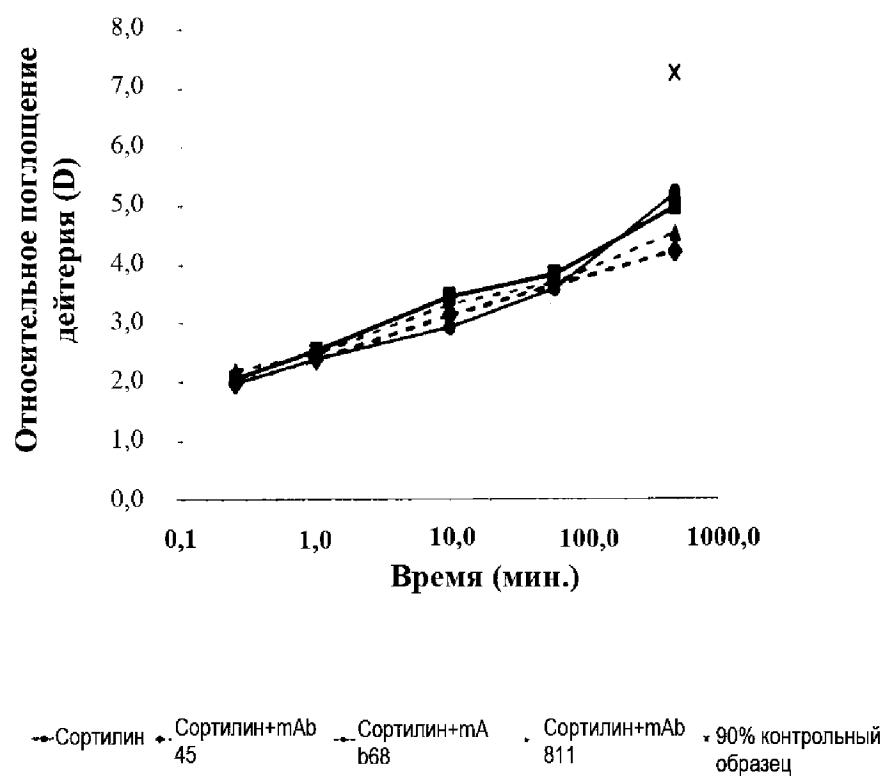


Фиг. 15а (3)



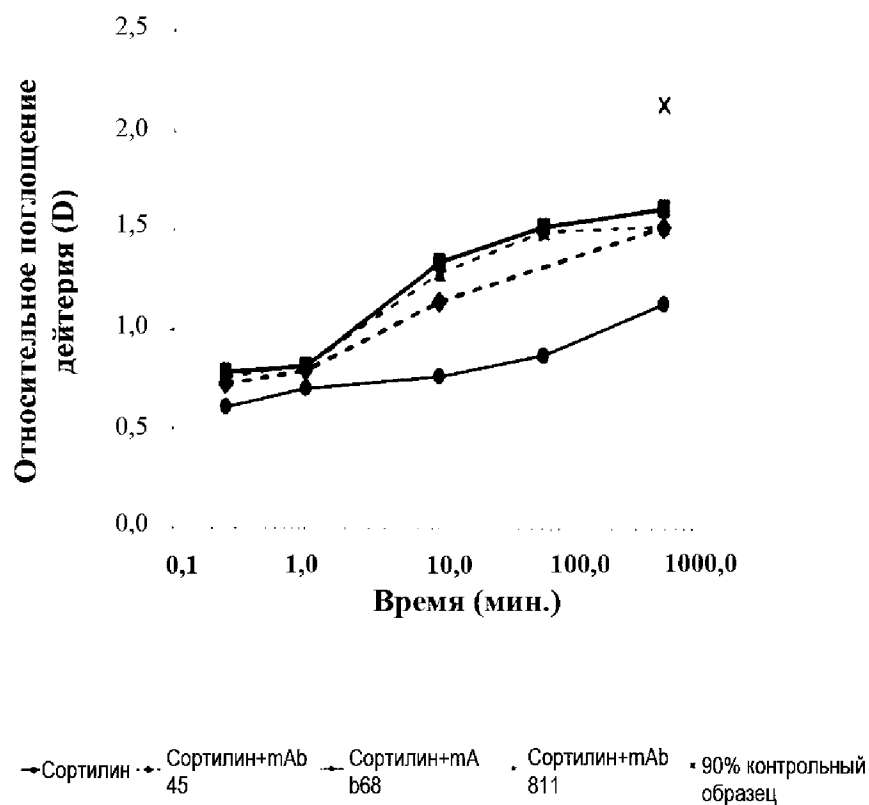
Фиг. 15а (4)

145-159 YRSEDYGKNFKDITD

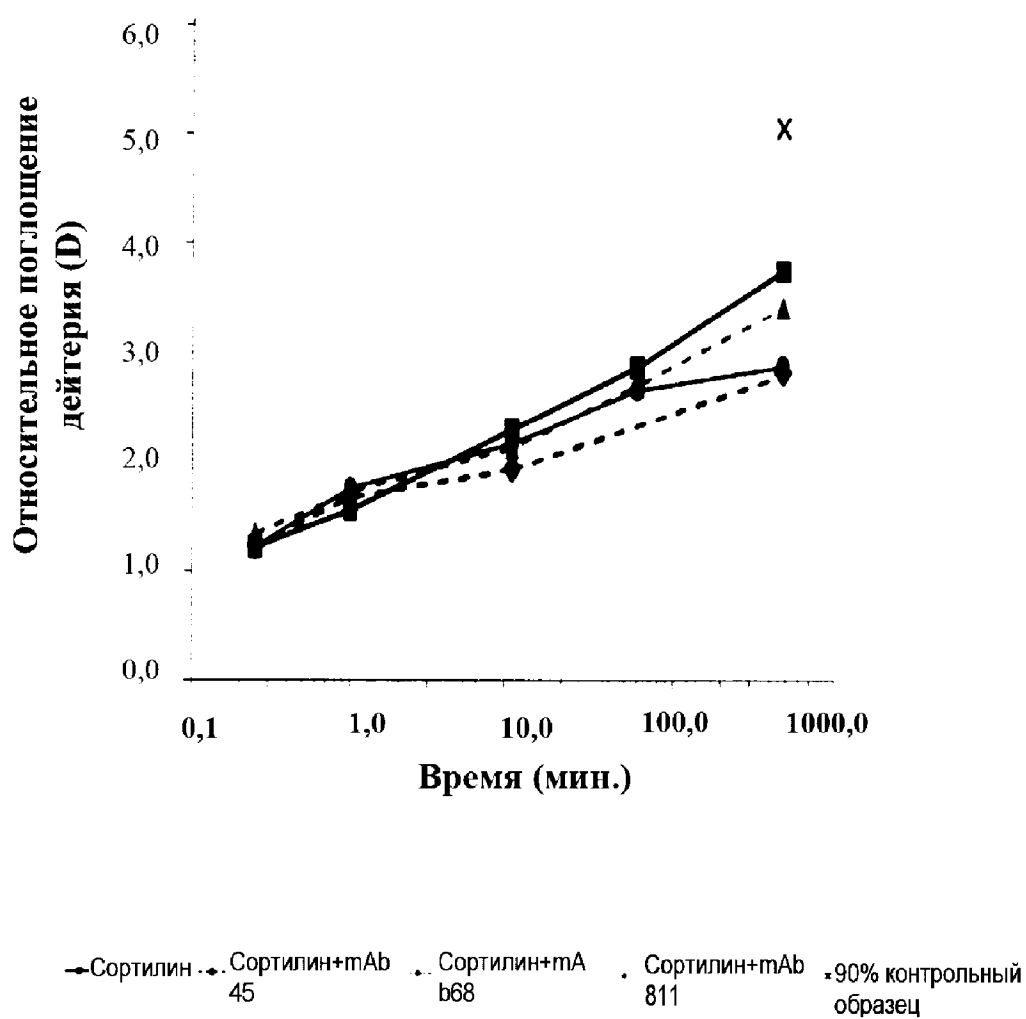


Фиг. 15а (5)

24/40
154-159 FKDITD

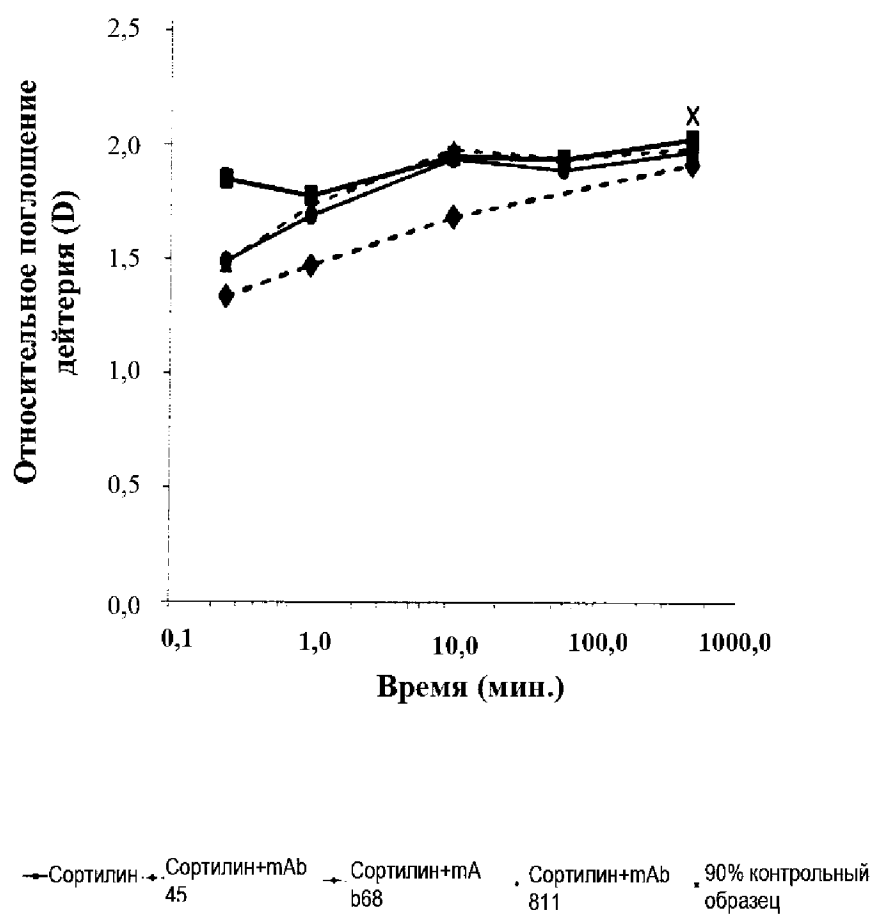


Фиг. 15а (6)

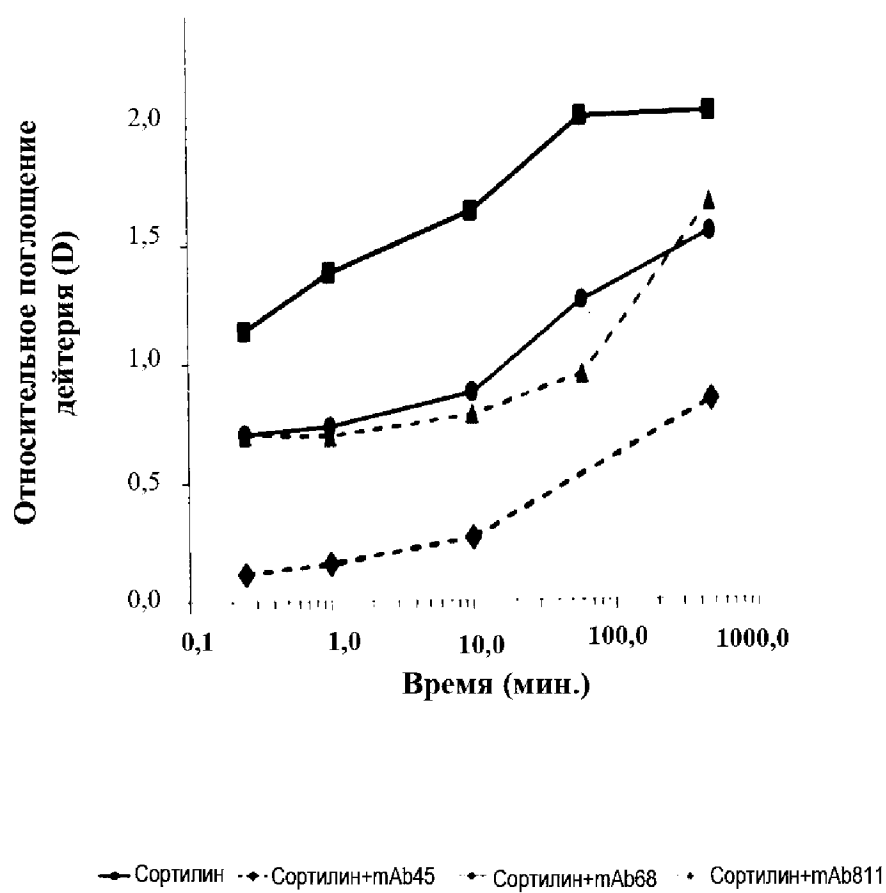


Фиг. 15b (1)

26/40
588-592 FTESF

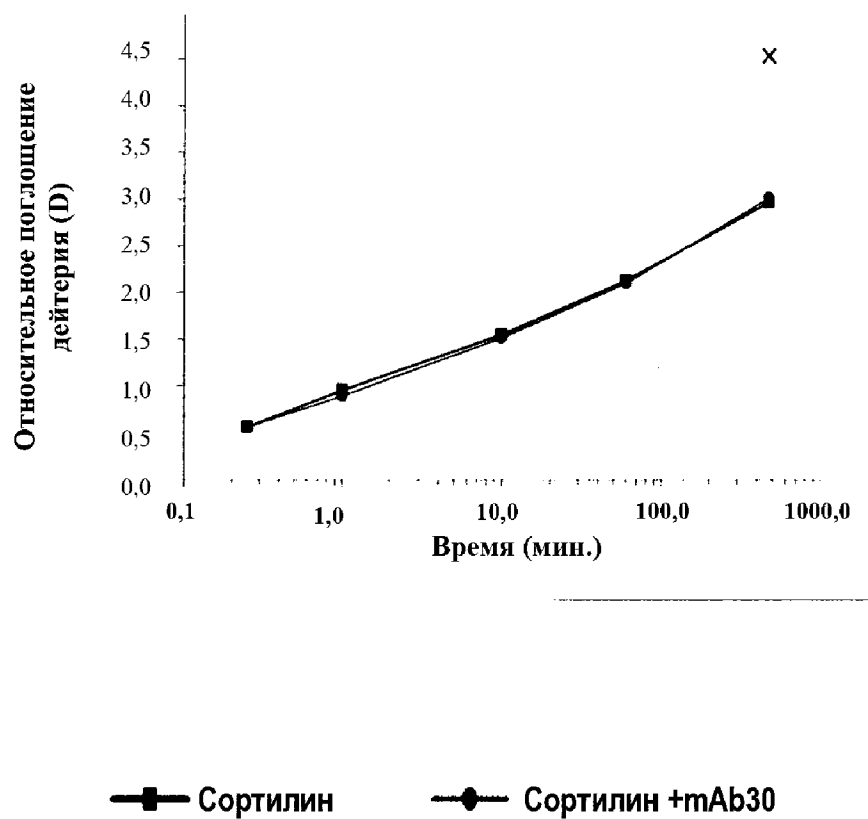


Фиг. 15b (2)



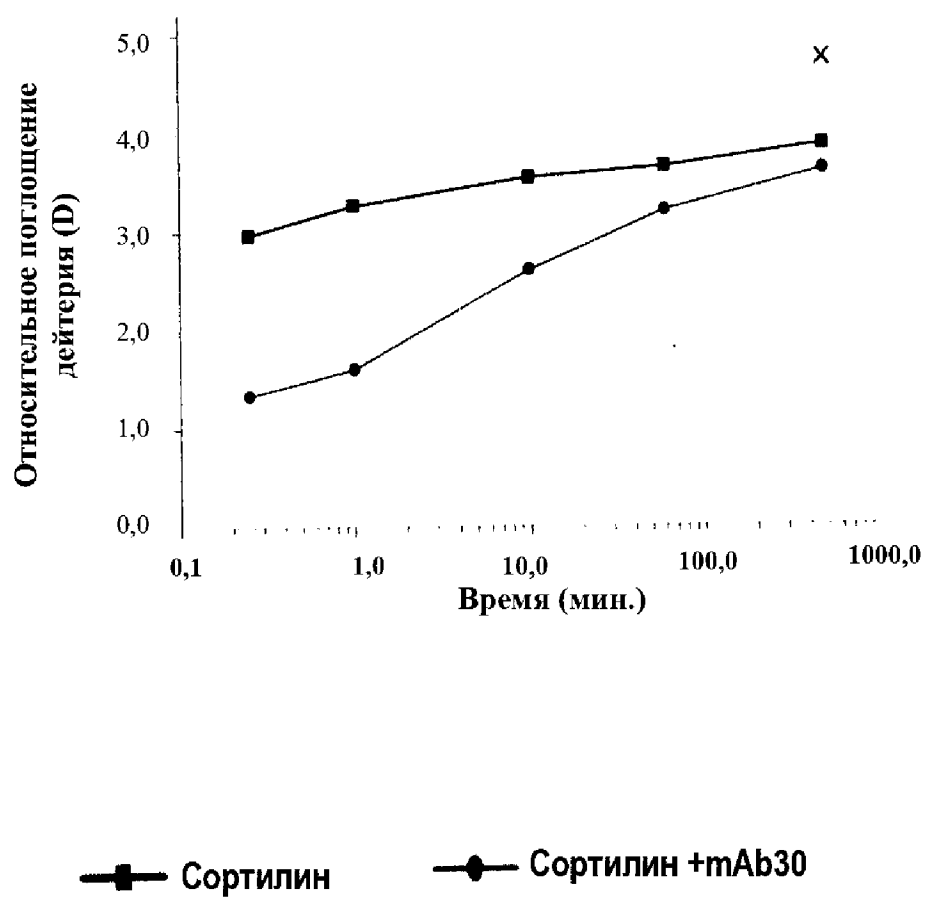
Фиг. 15b (3)

28/40
563-572 TRDPIYFTGL



Фиг. 16а (1)

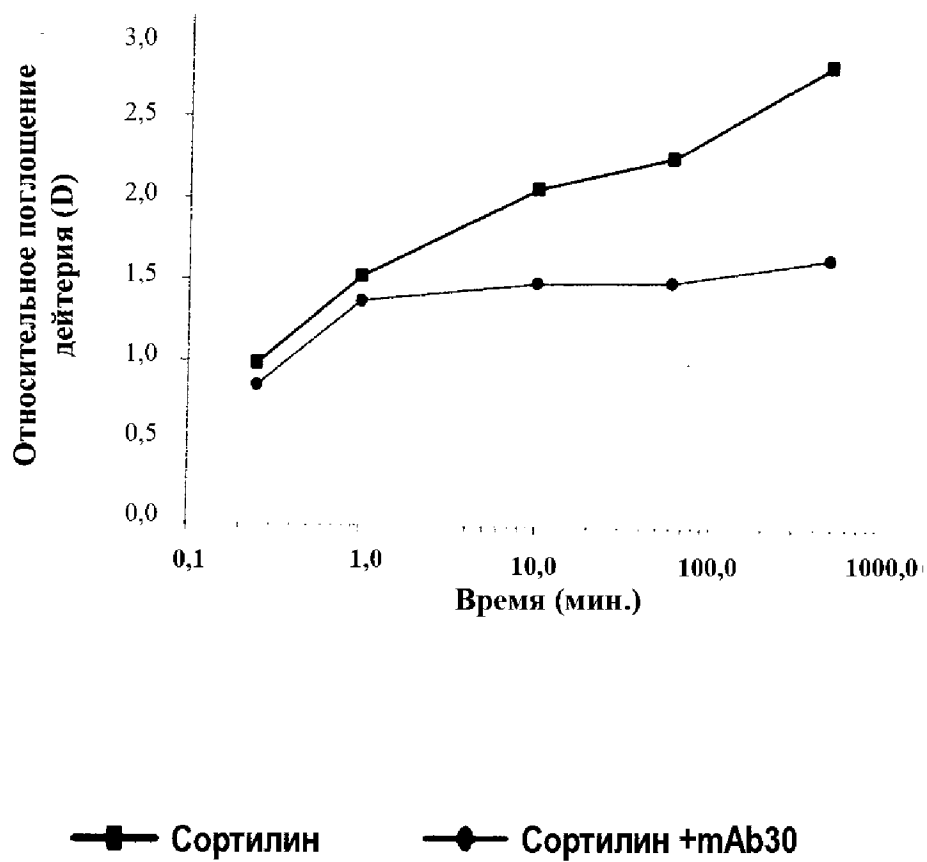
617-629 YTIWLAHSTDPE



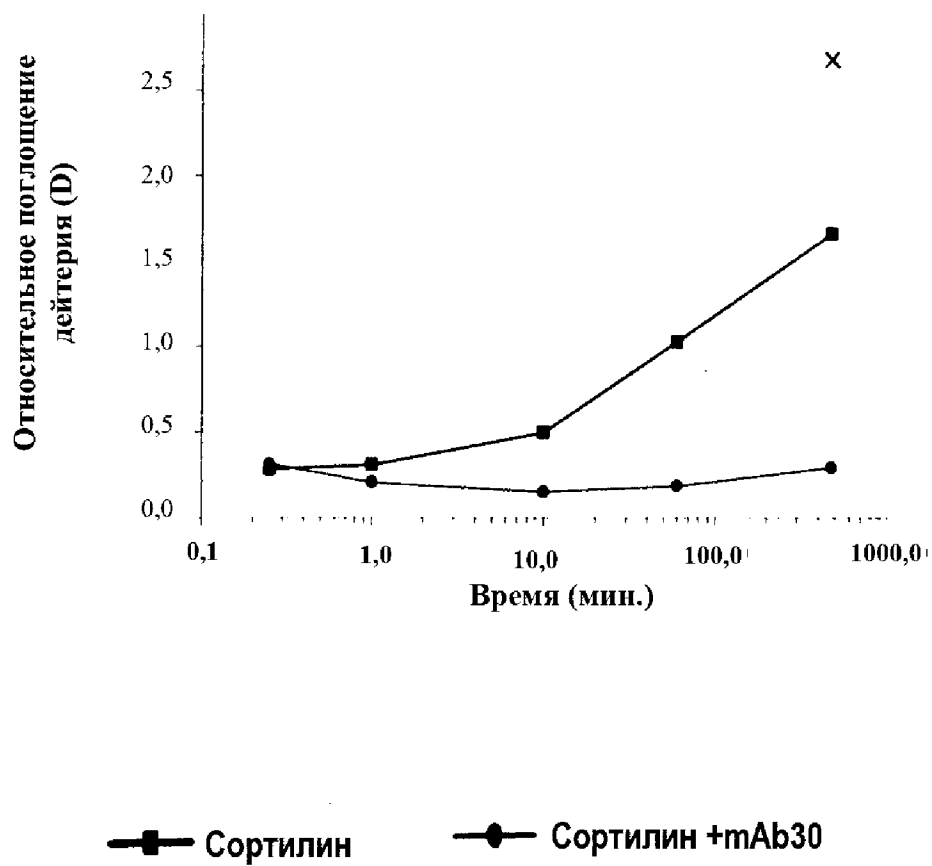
Фиг. 16а (2)

30/40

630-637 YEDGCILG

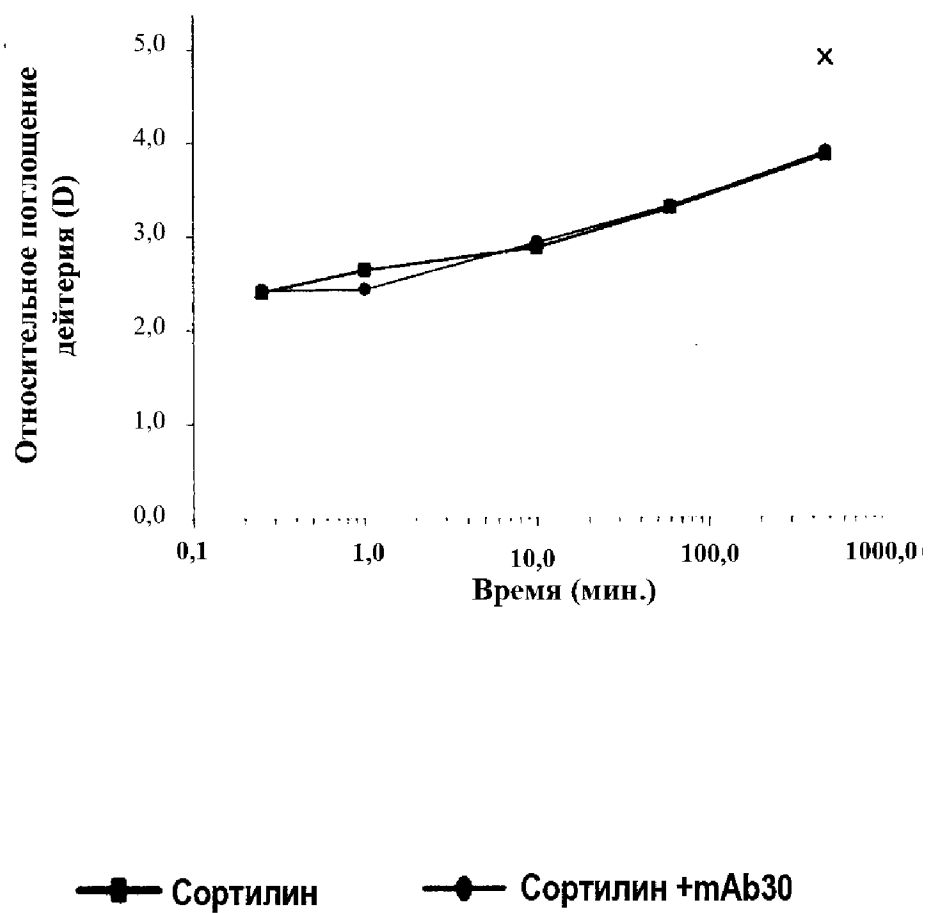


Фиг. 16а (3)

31/40
637-642 GYKEQF

Фиг. 16а (4)

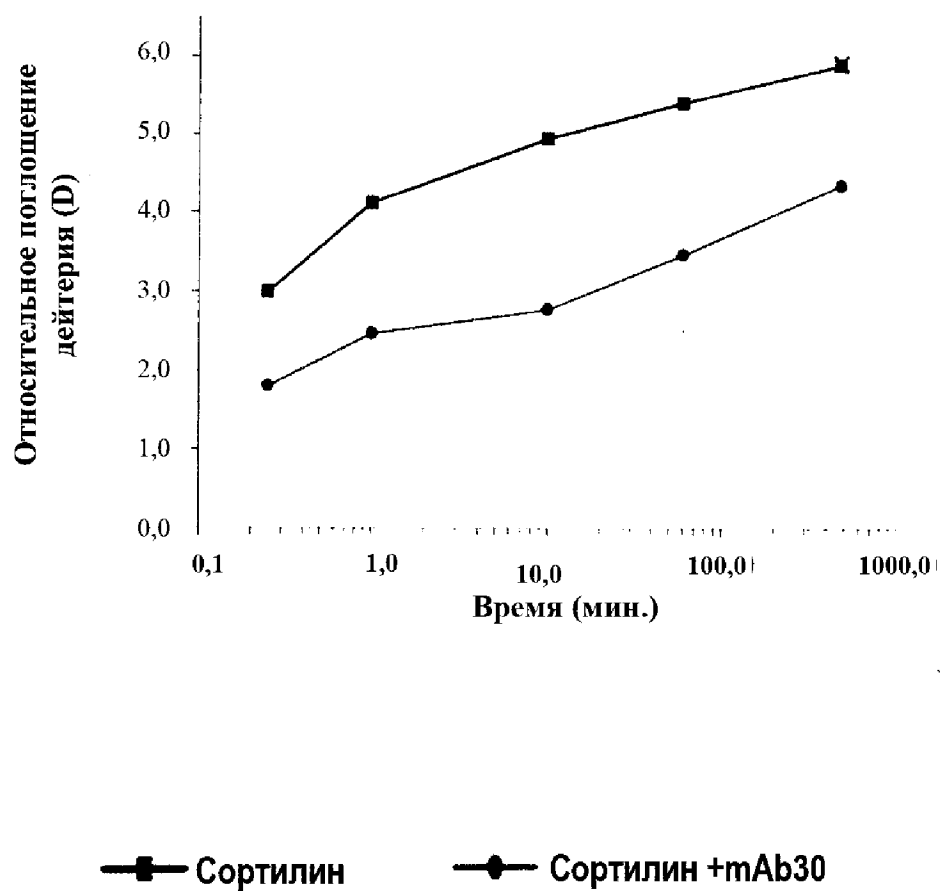
646-656 RKSSVCQNGRD



Фиг. 16а (5)

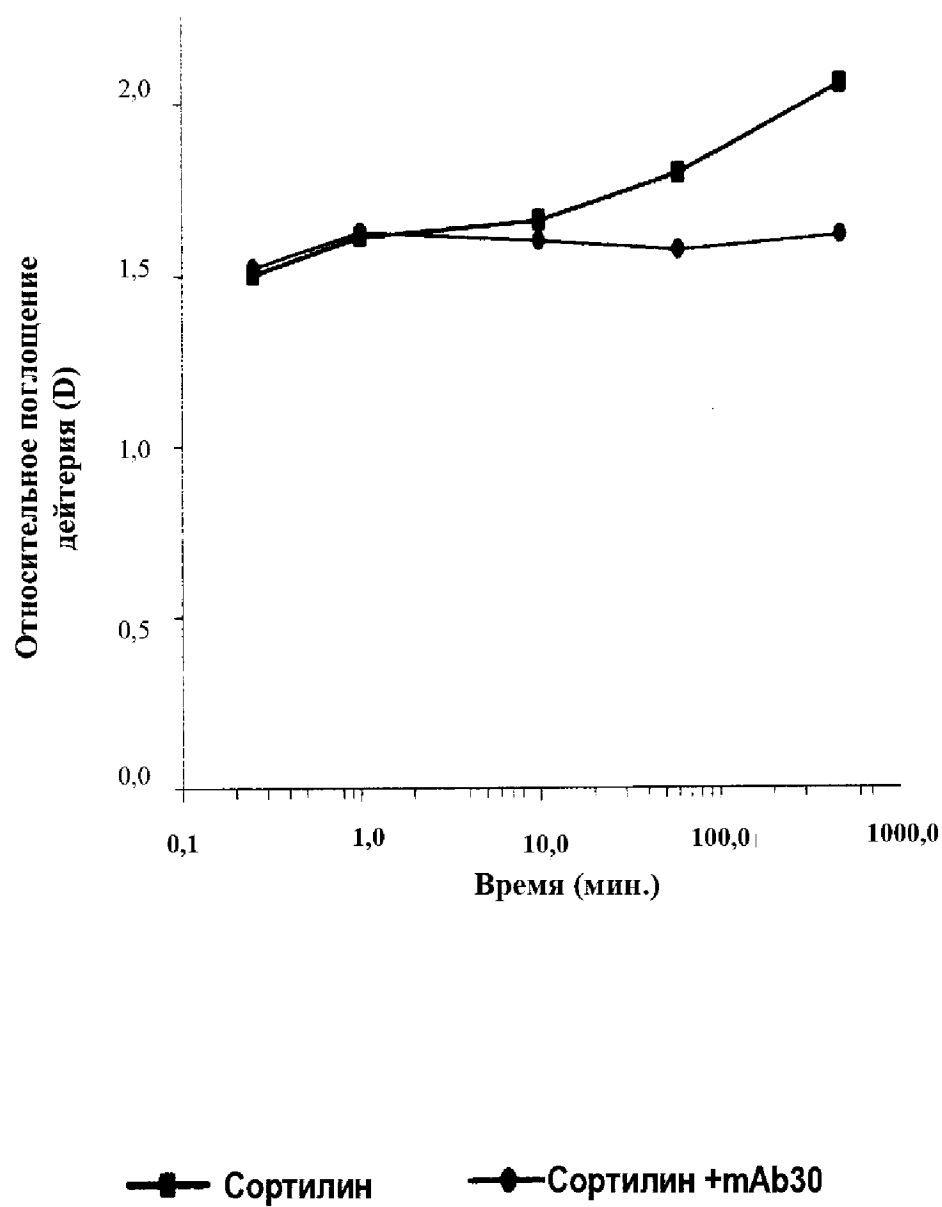
33/40

657-667 YVVTQPSICL



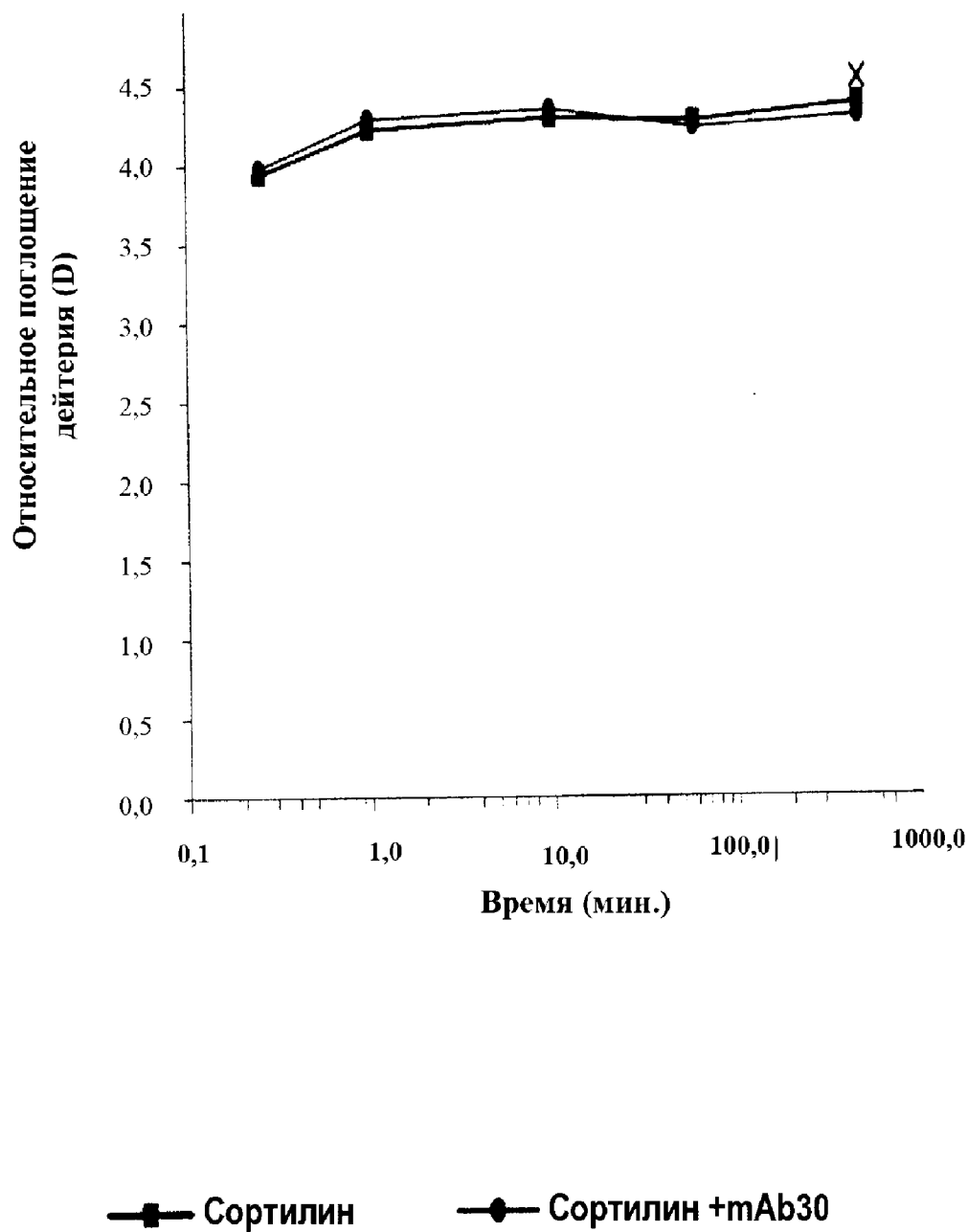
Фиг. 16а (6)

668-672 CSLED



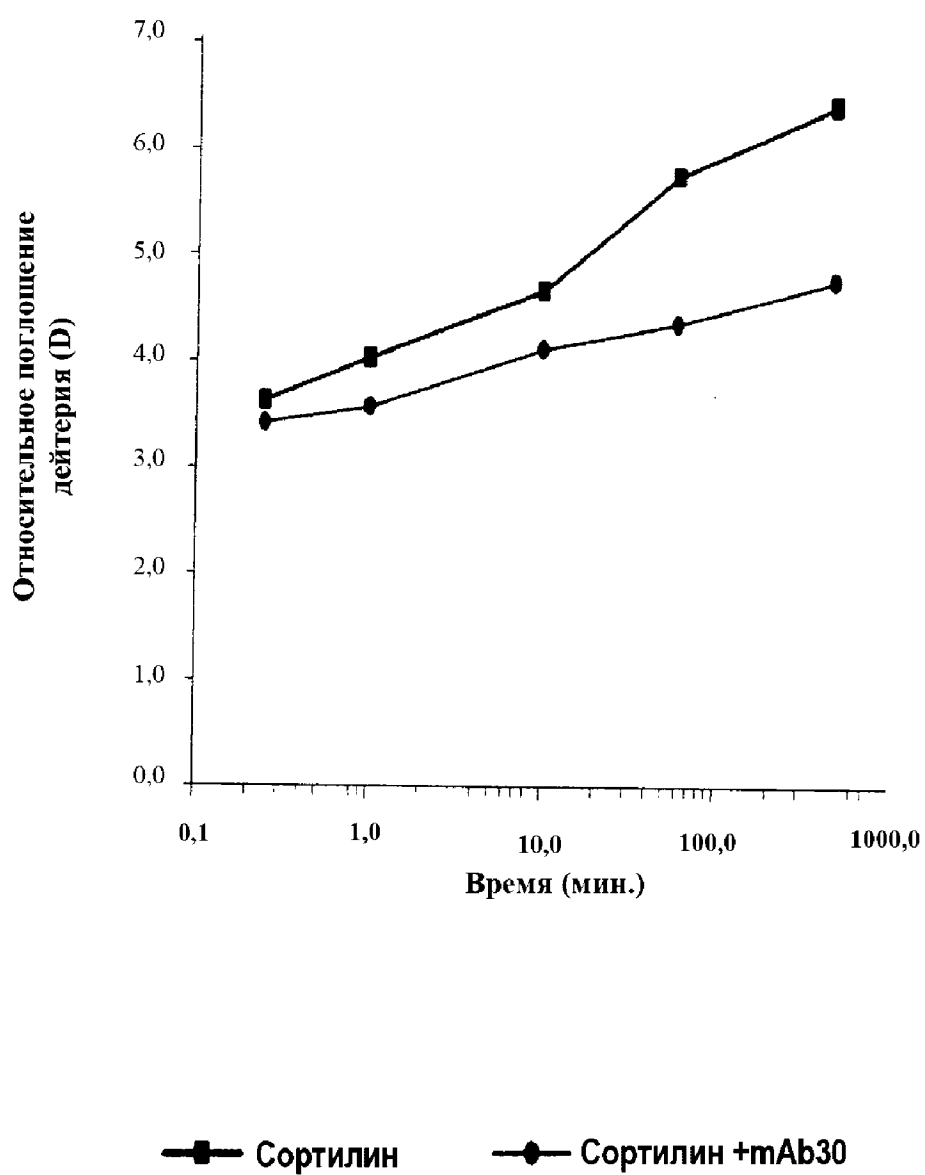
Фиг. 16b (1)

704-714 YGREEHLTTNG

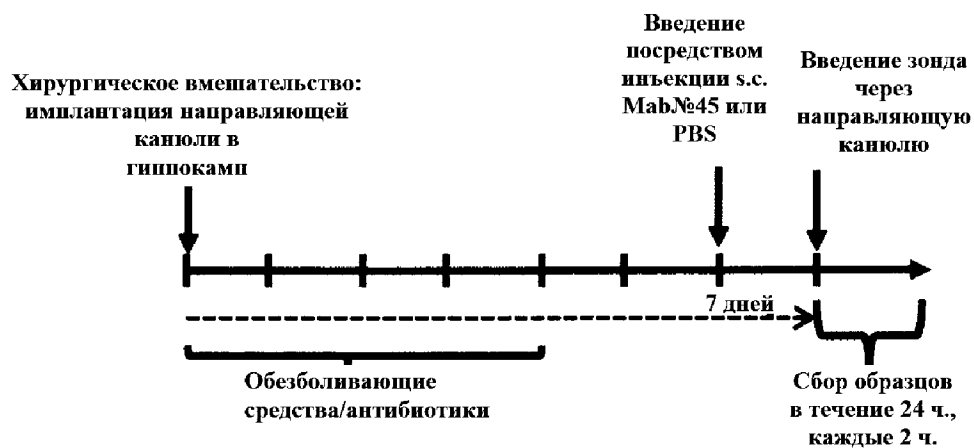


Фиг. 16b (2)

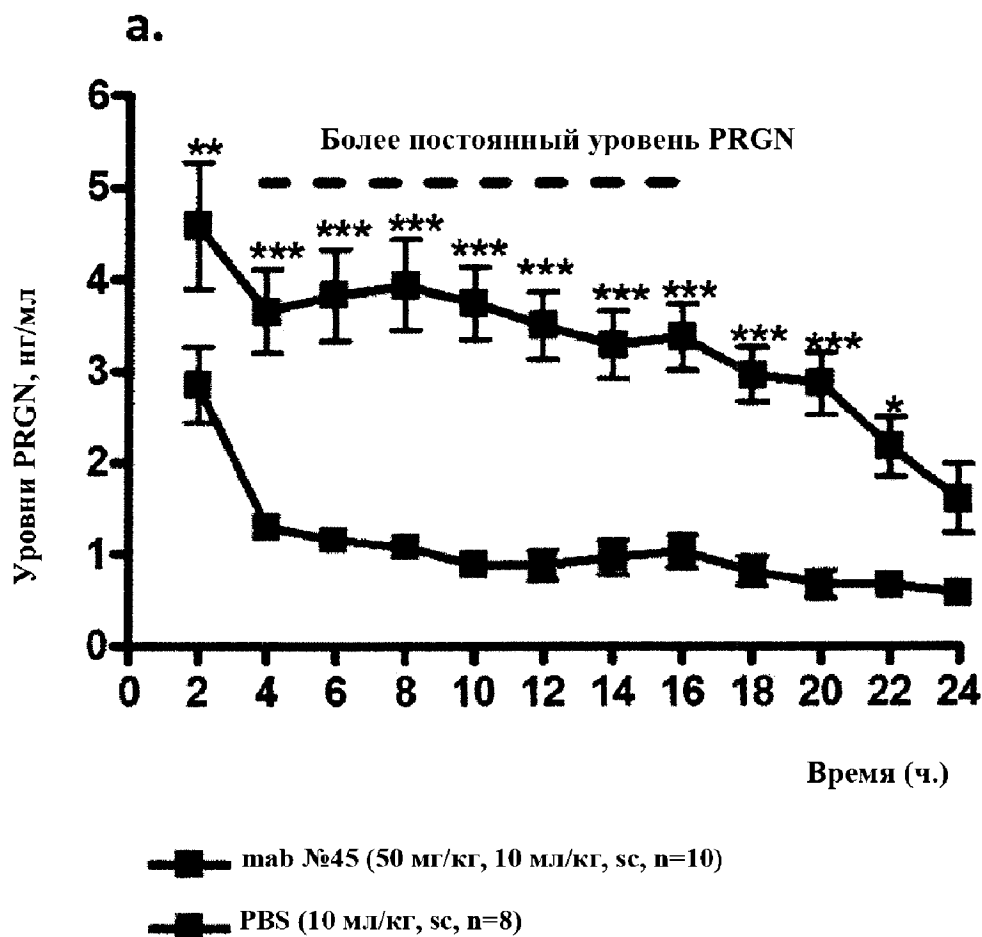
715-728 YRKIPGDKCQGGVN



Фиг. 16b (3)



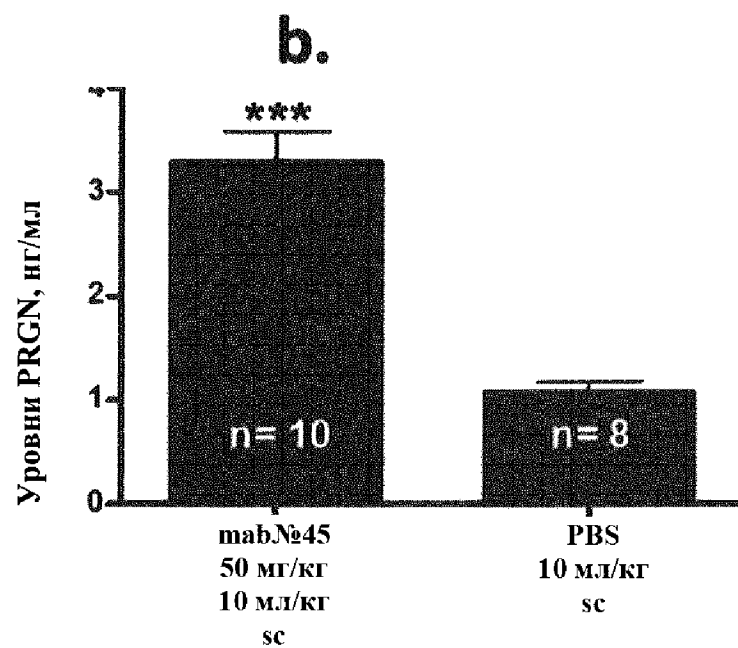
Фиг. 17



данные: средн. знач. $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, mab №45 по сравнению с PBS, двухфакторный ANOVA с последующим апостериорным тестом Бонферрони

Фиг. 18а

39/40



24 --> 48 ч. после введения доз

Данные: средн. знач. $\pm$ SEM; *** $p < 0,001$, mab№45 по сравнению с PBS, t-критерий

Фиг. 18b

C.

Время (ч.)	mab№45			PBS		
	Y	SEM	N	Y	SEM	N
2	4,587163	0,684416	10	2,854475	0,411770	8
4	3,654225	0,453960	10	1,303813	0,129774	8
6	3,826151	0,499164	10	1,157348	0,103958	8
8	3,941664	0,495235	10	1,084373	0,102409	8
10	3,744573	0,396738	10	0,885935	0,139000	8
12	3,498750	0,369875	10	0,880561	0,161299	8
14	3,287708	0,362766	10	0,966836	0,190743	8
16	3,372367	0,365127	10	1,031850	0,180413	8
18	2,962828	0,298671	10	0,817940	0,158949	8
BS, 20	2,868518	0,343551	10	0,681344	0,153457	8
22	2,173472	0,322407	10	0,673761	0,122029	8
24	1,604464	0,377046	10	0,583756	0,123556	8

Фиг. 18с