

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 034312

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.28

(21) Номер заявки
201590627

(22) Дата подачи заявки
2013.10.08

(51) Int. Cl. **A61K 39/395 (2006.01)**
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, РАСПОЗНАЮЩИЕ АЛЬФА-СИНУКЛЕИН

(31) 61/711,204; 61/719,281; 61/840,432;
61/872,366

(32) 2012.10.08; 2012.10.26; 2013.06.27;
2013.08.30

(33) US

(43) 2015.07.30

(86) PCT/US2013/063945

(87) WO 2014/058924 2014.04.17

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ПРОТЕНА БИОСАЙЕНСИЗ
ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:
**Барбур Робин, Геймз Тиль Кейт Дора,
Ниджхар Тарлохан С. (US)**

(74) Представитель:
Клюкин В.А. (RU)

(56) WO-A2-2005047860
MIHARA, M. et al. CTLA4Ig Inhibits T Cell-
Dependent B-Cell Maturation In Murine Systemic
Lupus Erythematosus, J. Clin. Invest, July 2000, Vol.
106, No. 1; pages 91-101; page 97, second column,
first paragraph; Genbank supplement, page 1; DOI;
10.1172/JCI9244

HACKETT, J. et al. Recombinant Mouse-
Human Chimeric Antibodies As Calibrators In
Immunoassays That Measure Antibodies To
Toxoplasma gondii, J. Clin. Microbiol., May 1998,
Vol. 36, No. 5; pages 1277-1284; page 1277, second
column, fourth paragraph; page 1280, second column,
third paragraph; Genbank supplement, pages 1-2;
PMID: 9574691

YANG, H. et al. Structural Basis Of
Immunosuppression By The Therapeutic Antibody
Dacizumab, Cell Res., Dec. 2010, Vol. 20, No.
12; pages 1361-1371; page 1362, first column,
second paragraph to second column, fourth paragraph;
Genbank supplement, pages 1-3; DOI: 10.1038/
cr.2010.130

US-A1-20090202432

US-A1-20120204275

(57) Изобретение предусматривает антитело, которое связывается с человеческим альфа-синуклеином, содержит три участка CDR по определению Кабат (SEQ ID NO: 25-27) в легкой цепи и три участка CDR по определению Кабат (SEQ ID NO: 10-12) в тяжелой цепи. Антитела по изобретению применимы, например, для терапии и/или диагностики болезней, связанных с альфа-синуклеином, в частности с накоплением отложений белка альфа-синуклеина, в частности болезней телец Леви.

B1

034312

034312
B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

В соответствии с 35 U.S.C. (Сводом законов США), § 119(e), данная заявка претендует на положительный эффект заявок США на патенты №№ 61/711204, поданной 8 октября 2012 г., 61/719281, поданной 26 октября, 2012 г., 61/840432, поданной 27 июня 2013 г., и 61/872366, поданной 30 августа 2013 г.

Перечень последовательностей

Перечень последовательностей, включающий SEQ ID NOS: 1-40, приложен и включен в данную заявку полностью посредством отсылки.

Сведения о предшествующем уровне техники

Синуклеинопатии, известные также как болезни телец Леви, характеризуются дегенерацией дофаминергической системы, двигательными расстройствами, ухудшением когнитивных способностей и образованием телец Леви (LBs) и/или невритами Леви (McKeith et al., Neurology (1996) 47:1113-24). Синуклеинопатии включают болезнь Паркинсона (включая идиопатическую болезнь Паркинсона), диффузную болезнь телец Леви (DLBD), известную также как деменция с тельцами Леви (DLB), вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBV), объединенные болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, первичную вегетативную невропатию и множественную системную атрофию (MSA); например, оливопонтоцеребеллярную атрофию, стрионегральную дегенерацию и синдром Шая-Дреджера. Полагают, что некоторые немоторные признаки и симптомы являются предвестниками синуклеинопатии на продромальной стадии заболеваний (а именно во время пресимптоматического, субклинического, преклинического или премоторного периода). Такие ранние признаки включают, например, нарушение "быстрого" сна (сна с быстрым движением глаз) (RBD), потерю чувства запаха и констипацию (Mahowald et al., Neurology (2010) 75:488-489). Болезни телец Леви продолжают оставаться наиболее распространенной причиной двигательных расстройств и ухудшения познавательных способностей у пожилых людей (Galasko et al., Arch. Neural. (1994) 51:888-95).

Альфа-синуклеин является частью большого семейства белков, включая бета- и гамма-синуклеин и синоретин. Альфа-синуклеин проявляется в нормальном состоянии, и полагают, что он играет роль в пластичности нервной системы, в процессе познания и сохранения памяти. В некоторых исследованиях указано, что альфа-синуклеин играет центральную роль в патогенезе PD. Это белок может агрегироваться с образованием нерастворимых фибрилл в патологических условиях. Например, синуклеин аккумулируется в LBs (Spillantini et al., Nature (1997) 388:839-40; Takeda et al., J. Pathol. (1998) 152:367-72; Wakabayashi et al., Neurosci. Lett. (1997) 239:45-8). Мутации гена альфа-синуклеина сочетаются с редкими семейными формами паркинсонизма (Krüger et al., Nature Gen. (1998) 18:106-8; Polymatopoulos, et al., Science (1997) 276:2045-7). Чрезмерная экспрессия альфа-синуклеина в организме трансгенных мышей (Masliah et al., Science (2000) 287:1265-9) и дрозофил (Feany et al., Nature (2000) 404:394-8) моделирует некоторые патологические аспекты болезни телец Леви. Кроме того, было высказано предположение, что растворимые олигомеры синуклеина могут быть нейротоксичными (Conway et al., Proc Natl Acad Sci USA (2000) 97:571-576; Voiles et al., J. Biochem. (2003) 42:7871-7878). Аккумуляция альфа-синуклеина с подобными морфологическими и неврологическими изменениями у различных видов и на животных моделях, таких различных, как человеческая модель, мышиная модель и на муахах, дает возможность предположить, что эта молекула вносит свой вклад в развитие болезни телец Леви.

Сущность заявленного изобретения

Настоящее изобретение относится к антителу, содержащему три участка CDR по определению Кабат (SEQ ID NO: 25-27) в легкой цепи и три участка CDR по определению Кабат (SEQ ID NO: 10-12) в тяжелой цепи. Антитело может представлять собой мышиное, химерное, венированное или гуманизированное антитело. Изобретение также предусматривает моноклональное антитело, 5C1. 5C1 представляет собой мышиное антитело, характеризующееся зрелой вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 9, и зрелой вариабельной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 24. Антитело может представлять собой фрагмент Fab или одноцепочечный фрагмент Fv. Указанное антитело является антителом изотипа человеческого IgG1. Антитело необязательно может являться антителом изотипа человеческого IgG2 или изотипа IgG4.

Настоящее изобретение предусматривает антитело, содержащее зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную H4 (SEQ ID NO: 17), и зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную L3 (SEQ ID NO: 31), при этом это антитело специфически связывается с человеческим альфа-синуклеином. Некоторые такие антитела включают три CDRs из SEQ ID NO: 9 по системе нумерации Кабата и три CDRs из SEQ ID NO: 24 по системе нумерации Кабата. В некоторых антителах по меньшей мере одно из положений H11, H27, H30, H48 и H73 занято L, Y, T, I и K соответственно и по меньшей мере одно из положений L12 и L14 занято S. В некоторых антителах по меньшей мере одно из положений H67, H69, H91, H48 и H94 занято A, L, F и S соответственно. В некоторых антителах положения H67, H69 и H94 заняты A, L и S соответственно. В некоторых антителах положение H94 занято S. В некоторых антителах по меньшей мере одно из положений L2, L45, L49 и L87 занято V, K, N и F соответственно. В некоторых антителах положения L2, L49 и L87 заняты V, N и F со-

ответственно. Некоторые антитела содержат зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную H4 (SEQ ID NO: 17), и зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную L3 (SEQ ID NO: 31). Согласно некоторым вариантам любые различия в CDRs зрелой вариабельной области тяжелой цепи и зрелой вариабельной области легкой цепи из H4 и L3 (SEQ ID NOS: 17 и 31 соответственно) находятся в положениях H60-H65.

Некоторые антитела включают зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, показанную как H4 (SEQ ID NO: 17), и зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, показанную как L3 (SEQ ID NO: 31). Некоторые антитела включают зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, показанную как H5 (SEQ ID NO: 18), и зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, показанную как L3 (SEQ ID NO: 31).

Согласно любому из описанных выше вариантов антитело может иметь по меньшей мере одну мутацию в константной области. Мутация может уменьшать фиксацию комплемента или активацию за счет константной области. Указанное антитело может иметь мутацию в одном или более положениях 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 и 331 по системе нумерации EU (по Кабату). Такое антитело может содержать аланин в положениях 318, 320 и 322.

В любом из описанных выше антител вариабельная область зрелой тяжелой цепи может быть слитой с константной областью тяжелой цепи и зрелая константная область легкой цепи может быть слитой с константной областью легкой цепи.

В любом из описанных выше антител константная область тяжелой цепи может представлять собой мутантную форму константной области природного человеческого антитела, которая обладает пониженным связыванием с рецептором Fc γ относительно константной области природного человеческого антитела.

В любом из описанных выше антител константная область тяжелой цепи может представлять собой изотип человеческого IgG1. В некоторых антителах аллотип представляет собой Glm3. В некоторых антителах аллотип представляет собой Glm1.

Данное изобретение также предусматривает способ гуманизации антитела, который включает определение последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей мышиного антитела 5C1, синтез нукleinовой кислоты, кодирующей гуманизированную тяжелую цепь, содержащую CDRs тяжелой цепи мышиного антитела, и синтез нукleinовой кислоты, кодирующей гуманизированную легкую цепь, содержащую CDRs легкой цепи мышиного антитела, осуществление экспрессии этих нукleinовых кислот в хозяйской клетке с получением гуманизированного антитела.

Данное изобретение также предусматривает способ получения гуманизированной, химерной или "венированной" форм антитела 5C1, включающий культивирование клеток, трансформированных с помощью нукleinовых кислот, кодирующих тяжелую и легкую цепи антитела, таким образом, чтобы клетка секретировала антитело; и очистку антитела при выделении его из культуральной клеточной среды.

Данное изобретение предусматривает также способ получения клеточной линии, продуцирующей гуманизированную, химерную или "венированную" форму антитела 5C1, включающий введение вектора, кодирующего тяжелую и легкую цепи антитела, и селектируемого маркера в клетки; репродуцирование клеток в условиях, позволяющих выбрать клетки, имеющие повышенное количество копий вектора; выделение отдельных клеток из выбранных клеток и банкирование клеток, клонированных из единичной клетки на основе выхода антитела. Некоторые такие способы включают также репродуцирование клеток в селективных условиях и скрининг клеточных линий, экспрессирующих и секретирующих по меньшей мере 100 мг/л/10⁶ клеток/24 ч.

Настоящее изобретение предусматривает также способ лечения или проведения профилактики болезни телец Леви, включающий введение по эффективной схеме любого из упомянутых выше антител и тем самым осуществление лечения или профилактики заболевания.

При этом указанный способ тормозит снижение когнитивных функций у пациента.

Данное изобретение предусматривает также способ уменьшения образования телец Леви у пациента, страдающего от этого заболевания или рискующего заболеть этой болезнью, включающий введение пациенту эффективного количества любого из упомянутых выше антител.

Болезнь телец Леви может представлять собой болезнь Паркинсона. Согласно некоторым вариантам заболевание представляет собой нарушение быстрого сна REM (RBD). Согласно некоторым вариантам заболевание представляет собой деменцию с тельцами Леви (DLB) или множественную системную атрофию (MSA). Согласно некоторым способам у пациента ингибируется ухудшение познавательных способностей. Согласно некоторым вариантам уменьшается количество агрегатов нейритного и/или аксонального альфа-синуклеина. Согласно некоторым способам дистрофия нейритов у пациентов уменьшается. Согласно некоторым вариантам плотность синаптических соединений и/или плотность дендритных структур сохраняется. Согласно некоторым вариантам обеспечивается сохранение синаптофизина и/или MAP2 у пациента.

Антитела могут быть также использованы для ингибирования агрегации синуклеина или уменьше-

ния количества телец Леви или агрегатов синуклеина у пациента, уже больного болезнью телец Леви или рискующего заболеть этой болезнью, включающий введение пациенту эффективного количества антитела из числа любых описанных антител. Согласно некоторым способам заболевание представляет собой болезнь Паркинсона. Согласно некоторым способам у пациента ингибируется ухудшение познавательных способностей. Согласно некоторым способам уменьшается количество агрегатов нейритного и/или аксонального альфа-синуклеина. Согласно некоторым способам дистрофия нейритов у пациентов уменьшается. Согласно некоторым способам плотность синаптических соединений и/или плотность дендритных структур сохраняется. Согласно некоторым способам этот способ обеспечивает сохранение синаптофизина и/или MAP2 у пациента.

Настоящее изобретение предусматривает также способ обнаружения телец Леви у пациента, уже больного болезнью телец Леви или рискующего заболеть этой болезнью, включающий введение пациенту эффективного количества антитела из любых описанных антител, при этом антитело связывается с тельцами Леви, и детектирование связанного антитела у пациента. Такое антитело может быть меченым.

Настоящее изобретение предусматривает также выделенную нуклеиновую кислоту, вектор или векторы и хозяйские клетки, подходящие для кодирования любого из описанных выше антител.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены аминокислотные последовательности зрелой вариабельной области тяжелой цепи мышиного антитела 5C1. Области CDR согласно нумерации по Кабату подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

На фиг. 2 представлены аминокислотные последовательности зрелой вариабельной области легкой цепи мышиного антитела 5C1. Области CDR согласно нумерации по Кабату подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

На фиг. 3 показано влияние пассивной иммунотерапии на память с применением антитела 5C1 при проведении теста водного лабиринта Морриса.

На фиг. 4 показано влияние пассивной иммунотерапии на скорость и количество ошибок при проведении опыта с круглой перекладиной с применением антитела 5C1.

На фиг. 5 показаны результаты метода ELISA при определении аффинности различных гуманизированных антител 5C1.

На фиг. 6 показаны результаты аланин-сканирующего мутагенеза, использованного для определения эпитопа альфа-синуклеина, связанного с антителом 9E4. В верхней части чертежа показаны результаты вестерн-блоттинга альфа-синуклеина полной длины (полноразмерного) (дикого типа или отдельных точковых мутаций остатков 118-126, как показано), окрашенного антителом 9E4 (левая панель) или контрольным антителом 1H7 (правая панель). В нижней части чертежа показан эпитоп альфа-синуклеина, связанный с антителом 9E4.

На фиг. 7 показаны результаты аланин-сканирующего мутагенеза, использованного для определения эпитопа альфа-синуклеина, связанного с антителом 5C1. В верхней части чертежа показаны результаты вестерн-блоттинга полноразмерного альфа-синуклеина (дикого типа или отдельных точковых мутаций остатков 118-126, как показано), окрашенного антителом 5C1 (левая панель) или контрольным антителом 1H7 (правая панель). В нижней части чертежа показан эпитоп альфа-синуклеина, связанный антителом 5C1.

На фиг. 8 показаны результаты аланин-сканирующего мутагенеза, использованного для определения эпитопа альфа-синуклеина, связанного с антителом 5D12. В верхней части чертежа показаны результаты вестерн-блоттинга полноразмерного альфа-синуклеина (дикого типа или отдельных точковых мутаций остатков 118-126, как показано), окрашенного антителом 5D12 (левая панель) или контрольным антителом 1H7 (правая панель). В нижней части чертежа показан эпитоп альфа-синуклеина, связанный антителом 5D12.

На фиг. 9 показана шаростержневая модель аминокислот в альфа-синуклеине непосредственно вблизи сайтов связывания антител 9E4, 5C1 и 5D12.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет человеческий альфа-синуклеин дикого типа.

SEQ ID NO: 2 показывает домен неамилоидного компонента (NAC) альфа-синуклеина, описанного Jensen et al. (1995).

SEQ ID NO: 3 показывает домен неамилоидного компонента (NAC) альфа-синуклеина, описанного Ueda et al. (1993).

SEQ ID NO: 4 представляет остатки аминокислот в иммуногенном пептиде 5C1 в положениях 118-129 человеческого альфа-синуклеина.

VDPDNEAYEGGC

SEQ ID NO: 5 показывает нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи мышиного антитела 5C1 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид (подчеркнута).

ATGGAAAGGCACGGATCTTCTCTCCGTGTTACAGTAACGGAGGTGTCCA
CTCCCAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAACGTGCAAAACCTGGGACCTCAG
TGCAGATGTCCTGCAAGGCTCTGGCTACACCTTACTAATTACTGGATGAACTGGA
TAAGCAGGGCCTGGACAGGGCTGGAATGGATTGGGGCTACTAACCTAACAAAT
GGTTAATCTGACTACAATCAGAGGTTCAAGGACAAGGCCATTAACAGACACAA
ATCCTCCAATACAGCCTACATGCACCTGAGCAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCAGT
CTATTTCTGTGCAAGTGCGGGGACTTGCTTACTGGGCCAGGGACTGTGGTCAC
TGTCTCTGCA

SEQ ID NO: 6 показывает вариабельную область тяжелой цепи мышного антитела 5C1 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид (подчеркнута).

MERHWIFLFLSVTGGVHSQVQLQQSGAELAKPGTSVQMSCKASGYTFNYWM
NWIKARPGQGLEWIGATNPNNGYTDYNQRFKDKAILTADKSSNTAYMHLSLTSEDSA
VYFCASGGHLAYWGQGTIVTVSA

SEQ ID NO: 7 показывает вариабельную область легкой цепи мышного антитела 5C1 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид (подчеркнута).

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAG
CAGTGTATGTTGTGATGACCCAATTCCACTCTACCTGCTGTCACTCCTGGAGATCA
AGCCTCCATCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTCCATAGTAAAGGAAACACCTA
TTTACATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCAACAGGGT
TTCCAACCGATTCTGGGTCCACAGAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAG
ATTCACACTCAAGATCAGCGGAGTGGAGGCTGAAGATCTGGAGTTATTCCTGTT
CTCAAAGTGCACATGTCCTGGACGTTGGAGGACCAAGCTGAAATCAGA

SEQ ID NO: 8 показывает вариабельную область легкой цепи мышного антитела 5C1 с сигнальным пептидом (подчеркнут).

MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMTQIPLYLSVSPGDQASISCRSSQLFHSKGNTY
LHWYLQKPGQSPKLLINRVSNRFSGVPDFRSFGSGSGTDFTLKISGV EAEDLGVYFCQS A
HVPWTFGGGTKLEIR

SEQ ID NO: 9 показывает зрелую вариабельную область тяжелой цепи мышного антитела 5C1 с подчеркнутыми CDRs. Подчеркнутые CDRs показаны по Кабату, за исключением подчеркнутой CDRH1, показанной как компромисс нумерации по Кабату и номенклатуры Чотиа.

QVQLQQSGAELAKPGTSVQMSCKASGYTFNYWMNWI KARPGQGLEWIGATN
PNNNGYTDYNQRFKDKAILTADKSSNTAYMHLSLTSEDSA VYFCASGGHLAYWGQGT
VVTVSA

SEQ ID NO: 10 показывает последовательность CDR1 тяжелой цепи антитела 5C1.

NYWMN

SEQ ID NO: 11 показывает последовательность CDR2 тяжелой цепи антитела 5C1.

ATPNPNNGYTDYNQRFKD

SEQ ID NO: 12 показывает последовательность CDR3 тяжелой цепи антитела 5C1.

GGHLAY

SEQ ID NO: 13 показывает FR акцепторной человеческой VH (Acc#AAY42876.1).

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNNYAINVRQAPGQGLEWMMGGIPIFGTTTQAQKFQGRVTIT
ADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGNLNWLDPWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 14 показывает последовательность гуманизированного антитела 5C1H1.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFNYWMNWRQAPGQGLEWIGATNPNNNGYTDYNQRFKDR
TLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGHLAYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 15 показывает последовательность гуманизированного антитела 5C1H2.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFNYWMNWRQAPGQGLEWIGATNPNNNGYTDYNQRFKDR
TITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGHLAYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 16 показывает последовательность гуманизированного антитела 5C1H3.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFNYWMNWRQAPGQGLEWIGATNPNNNGYTDYNQRFKDR
TLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGHLAYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 17 показывает последовательность гуманизированного антитела 5C1H4.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFNYWMNWRQAPGQGLEWIGATNPNNNGYTDYNQRFKDR
TLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGHLAYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 18 показывает последовательность гуманизированного антитела 5C1H5.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFNYWMNWRQAPGQGLEWIGATNPNNNGYTDYNQRFKDR
TLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGHLAYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 19 показывает нуклеотидную последовательность, кодирующую гуманизированное антитело 5C1H1 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид (подчеркнута).

ATGGAGTTGGGCTGTCTGGCTGTTCTGGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAGTGCCAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCGGCGCGAGCTGAAGAAGCCCGCTCCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCCTCGGCTA
CACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCTGGAGTGGATCGGCG
CCACCAACCCAACAACCGCTACACCGACTACAAACCAGCGCTTAAGGACCGCGCACCGCCG
ACAAGTCCACCAACACCGCTACATGGAGCTGTCTCCCTGCGCTCGAGGAACCCGCGTGTACTACTG
CGCCCGCGCGGCCACCTGGCTACTGGGGCAGGGCACCCCTGGTGAACCGTGTCTCC

SEQ ID NO: 20 показывает нуклеотидную последовательность, кодирующую гуманизированное антитело 5C1H2 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид (подчеркнута).

ATGGAGTTGGGCTGTCTGGCTGTTCTGGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAGTGCCAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGCTCCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCCTCGGCTA
CACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCTGGAGTGGATCGGCG
CCACCAACCCAACAACCGCTACACCGACTACAAACCAGCGCTTAAGGACCGCGCACCGCCG
ACAAGTCCACCAACACCGCTACATGGAGCTGTCTCCCTGCGCTCGAGGAACCCGCGTGTACTACTG
CGCCCGCGCGGCCACCTGGCTACTGGGGCAGGGCACCCCTGGTGAACCGTGTCTCC

SEQ ID NO: 21 показывает нуклеотидную последовательность, кодирующую гуманизированное антитело 5C1H3 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид (подчеркнута).

ATGGAGTTGGGCTGTCTGGCTGTTCTGGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAGTGCCAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGCTCCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCCTCGGCTA
CACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCTGGAGTGGATCGGCG
CCACCAACCCAACAACCGCTACACCGACTACAAACCAGCGCTTAAGGACCGCGCACCGCCG
ACAAGTCCACCAACACCGCTACATGGAGCTGTCTCCCTGCGCTCGAGGAACCCGCGTGTACTACTG
CGCCCTCGCGCGGCCACCTGGCTACTGGGGCAGGGCACCCCTGGTGAACCGTGTCTCC

SEQ ID NO: 22 показывает нуклеотидную последовательность, кодирующую гуманизированное антитело 5C1H4 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид (подчеркнута).

ATGGAGTTGGGCTGTCTGGCTGTTCTGGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAGTGCCAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGCTCCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCCTCGGCTA
CACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCTGGAGTGGATCGGCG
CCACCAACCCAACAACCGCTACACCGACTACAAACCAGCGCTTAAGGACCGCGCACCGCCG
ACAAGTCCACCAACACCGCTACATGGAGCTGTCTCCCTGCGCTCGAGGAACCCGCGTGTACTACTG
CGCCCTCGCGCGGCCACCTGGCTACTGGGGCAGGGCACCCCTGGTGAACCGTGTCTCC

SEQ ID NO: 23 показывает нуклеотидную последовательность, кодирующую гуманизированное антитело 5C1H5 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид (подчеркнута).

ATGGAGTTGGGCTGTCTGGCTGTTCTGGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAGTGCCAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGCTCCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCCTCGGCTA
CACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCTGGAGTGGATCGGCG
CCACCAACCCAACAACCGCTACACCGACTACAAACCAGCGCTTAAGGACCGCGCACCGCCG
ACAAGTCCACCAACACCGCTACATGGAGCTGTCTCCCTGCGCTCGAGGAACCCGCGTGTACTACTG
CGCCAGCGCGGGCACCTGGCTACTGGGGCAGGGCACCCCTGGTGAACCGTGTCTCC

SEQ ID NO: 24 показывает последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи мышного антитела 5C1 с подчеркнутыми CDRs. Подчеркнутые CDRs показаны по системе нумерации Кабата.

DVVMTQIPLYLSVSPGDQASISCRSSOSLFHSKGNTYLYHWYLQKPGQSPKLLINR
VSNRFGSGVPDRFSGSGSGTDFILKISGVEADLGVYFCQSOSAHVPWT~~W~~FGGGTKLEIR

SEQ ID NO: 25 показывает последовательность CDR1 легкой цепи антитела 5C1.

RSSQSLFHSKGNTYLY

SEQ ID NO: 26 показывает последовательность CDR2 легкой цепи антитела 5C1.

RVSNRFS

SEQ ID NO: 27 показывает последовательность CDR3 легкой цепи антитела 5C1.

SQSAHVPWT

SEQ ID NO: 28 показывает FR акцепторной человеческой VL (Acc#CAB51293.1).

DIVMTQSPLSLPVTPGE~~P~~ASISCRSSOSLHSNGNYLDWYLQKPGQSPQLIYLGSNRASGV~~P~~DRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYCMQALCPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 29 показывает последовательность гуманизированного антитела 5C1L1.

DVVMTQSPLSLSVSPGE~~P~~ASISCRSSOSLHSKGNTYLYHWYLQKPGQSPKLLINRVSNRFSGVPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYFCQSOSAHVPWT~~W~~FGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 30 показывает последовательность гуманизированного антитела 5C1L2.

DIVMTQSPLSVSPGEPASISCRSSQLFHSKGNTYLHWYLQPKGQSPKLLIYRVSNRFSGVPDFSGSGSGT
 DFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 31 показывает последовательность гуманизированного антитела 5C1L3.
 DIVMTQSPLSVSPGEPASISCRSSQLFHSKGNTYLHWYLQPKGQSPQLLINRVSNRFSGVPDFSGSGSG

TDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 32 показывает последовательность гуманизированного антитела 5C1L4.
 DIVMTQSPLSVSPGEPASISCRSSQLFHSKGNTYLHWYLQPKGQSPQLLIYRVSNRFSGVPDFSGSGSGT

DFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 33 показывает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированное антитело 5C1L1 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид (подчеркнута).

ATGGACATGCGCGTGCCGCCAGCTGCTGGGCTGCTGATGCTGTGGGTGTCGGCTCCTCCGGGAC
 GTGGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCTGTCCGTGTCCTGGGAGGCCGCCATCTCCGCCCT
 CCTCCCAGTCCCTGTTCAACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTACCTGAGAACGGCCAGTC
 CCCAAGCTGCTGATCAACCGCGTGTCCAACCGCTTCTCCGGCGTGGCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGC
 TCCGGCACCGACTTCACCCCTGAAGATCTCCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTCTGCTCC
 CAGTCGGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGGCGGCCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 34 показывает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированное антитело 5C1L2 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид (подчеркнута).

ATGGACATGCGCGTGCCGCCAGCTGCTGGGCTGCTGATGCTGTGGGTGTCGGCTCCTCCGGGAC
 ATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCTGTCCGTGTCCTGGGAGGCCGCCATCTCCGCCCT
 CTCCCAGTCCCTGTTCAACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTACCTGAGAACGGCCAGTC
 CCCAAGCTGCTGATCTACCGCGTGTCCAACCGCTTCTCCGGCGTGGCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCT
 CGGCACCGACTTCACCCCTGAAGATCTCCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCTCCC
 AGTCGGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGGCGGCCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 35 показывает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированное антитело 5C1L3 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид (подчеркнута).

ATGGACATGCGCGTGCCGCCAGCTGCTGGGCTGCTGATGCTGTGGGTGTCGGCTCCTCCGGGAC
 GTGGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCTGTCCGTGTCCTGGGAGGCCGCCATCTCCGCCCT
 CCTCCCAGTCCCTGTTCAACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTACCTGAGAACGGCCAGTC
 CCCCAGCTGCTGATCAACCGCGTGTCCAACCGCTTCTCCGGCGTGGCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGC
 TCCGGCACCGACTTCACCCCTGAAGATCTCCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCTCC
 CAGTCGGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGGCGGCCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 36 показывает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированное антитело 5C1L4 с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид (подчеркнута).

ATGGACATGCGCGTGCCGCCAGCTGCTGGGCTGCTGATGCTGTGGGTGTCGGCTCCTCCGGGAC
 ATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCTGTCCGTGTCCTGGGAGGCCGCCATCTCCGCCCT
 CTCCCAGTCCCTGTTCAACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTACCTGAGAACGGCCAGTC
 CCCAGCTGCTGATCTACCGCGTGTCCAACCGCTTCTCCGGCGTGGCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCT
 CGGCACCGACTTCACCCCTGAAGATCTCCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCTCCC
 AGTCGGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGGCGGCCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 37 показывает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей типичную константную область человеческого IgG1.

GCCGCCACCAAGGGCCCATGGCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCG
 GCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGTAACCTCAGGCCTCG
 ACCAGCGCGTGCACACCTTCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
 CCGTGGCCCTCAGCAGCTGGGACCCAGACCCACATCTGCAACGTGAATCACAGGCCAGCAACACAA
 GGTGGACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA
 ACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACC
 CCTGAGGTACATGCGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGT
 GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGTCAGAACAGAACGGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
 GTGGTCAGCGTCTCCTACCGTCTGCACTGGACTGGCTGAATGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTC
 AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAG
 GTGTACACGCTGCCCTACCGGGAGGAGATGACCAAGAACCGAGGTCAAGCTGACCTGCTGGTCAA
 GGCTCTATCCACGCGACATCGCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC

```

ACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT
GGCAGCAGGGGAACGTCTTCATGCTCCGTATGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAAGA
GCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAATGA

```

SEQ ID NO: 38 показывает аминокислотную последовательность типичной константной области человеческого IgG1.

```

ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVWSWNSALTSVHFTPAVLQSSGLYLSVVTPSS
SLGTQTYICNVNHNPKSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVLFPPKPDKTLMSRTPEVTCVVVD
VSHEDEPKFNWYVGVEVHNVKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

```

SEQ ID NO: 39 показывает последовательность нуклеиновой кислоты, типичной константной области легкой цепи типа каппа человека.

```

ACTGTGGCTGCACCATCTGCTTCATCTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAACTGGAACCTGCCCTGT
TGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCA
ATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTCAACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA
CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACAGAGAAACACAAAGTCTACGCTCGCAAGTCACCCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCCGTACAAAGAGCTCAACAGGGGAGAGTGTAG

```

SEQ ID NO: 40 показывает аминокислотную последовательность типичной константной области легкой цепи типа каппа человека.

```

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

Определения

Основной структурной единицей антитела является тетramer, состоящий из подъединиц. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" цепь (молекулярная масса около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (молекулярная масса около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область, содержащую примерно от 100 до 110 или более аминокислот, в первую очередь отвечающих за распознавание антигена. После осуществления экспрессии вариабельная область обычно связывается с расщепляемым сигнальным пептидом. Вариабельная область без сигнального пептида иногда называется зрелой вариабельной областью. Таким образом, зрелая вариабельная область легкой цепи означает вариабельную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, в основном отвечающую за эффекторную функцию. Константная область может включать любую или все участки из CH1 области, линейной области тяжелой цепи (шарнира), CH2 области и CH3 области.

Легкие цепи делятся на цепи типа каппа и типа лямбда. Тяжелые цепи классифицируются на гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон цепи и определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. В легкой и тяжелой цепях вариабельные и константные области соединяются областью "J" из примерно 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь включает также область "D" из примерно 10 или более аминокислот (см. Fundamental Immunology (Paul, W., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7) (эта публикация включена полностью для всех целей в данную заявку посредством отсылки).

Вариабельные области каждой пары зрелых легкой/тяжелой цепей образуют сайт связывания антитела. Так, интактное антитело содержит два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител оба сайта связывания являются одинаковыми. Все цепи характеризуются одинаковой общей структурой относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, называемыми также определяющими комплементарность областями или CDRs. CDRs из двух цепей каждой пары выровнены с каркасными областями, способствующими связыванию со специфическим epitопом. От N-конца до С-конца и легкая, и тяжелая цепи включают области FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот в каждую область осуществляется в соответствии с номенклатурой по Кабату, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991) или по Чотиа (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., 'Nature' 342:878-883 (1989)). Кабат создал широко распространенную систему нумерации (нумерация по Кабату), в которой соответствующие остатки между различными тяжелыми цепями или различными легкими цепями получают один и тот же номер (например, обозначение H83 означает положение 83 по системе Кабата в зрелой вариабельной области тяжелой цепи; точно так же обозначение L36 означает положение 36 по системе Кабата в зрелой вариабельной области легкой цепи). Нумерация по Кабату используется по всему тексту данной заявки при указании положений в вариабельной области антитела, если ясно не указано иное.

Термин "антитело" включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Обычно фрагменты антител конкурируют с интактным телом, из которого они получены для специфического связывания с мишенью. Фрагменты включают отдельные тяжелые цепи, Fab, Fab', F(ab')2, F(ab)c, Fv, одноцепочечные антитела и отдельные доменные антитела. Единичные (вариабельные) доменные антитела включают

VH области, отделенные от их партнеров VL (или наоборот) в случае обычных антител (Ward et al., 1989, *Nature* 341: 544-546), а также в VH области (иногда известные как VHN) из видов, таких как Camelidae или хрящевые рыбы (например, акула-нянька), в которых VH области не связаны с VL областями (см., например, заявку WO 94/04678). Единичные доменные антитела, в которых одна цепь отделена от своих природных партнеров, иногда называют однодоменными антителами, и отдельные доменные антитела, полученные из Camelidae или хрящевых рыб, иногда называют нанотелами. В отдельных однодоменных антителях могут или не могут содержаться константные области или части константных областей. Например, природная вариабельная область антител из Camelidae включает VHN вариабельную область и CH₂, и CH₃ константные области. Отдельные доменные антитела, такие как нанотела, могут подвергаться гуманизации, как и обычные антитела. Доменные антитела получаются обычно из антител человеческого происхождения. Фрагменты антител могут быть получены с применением рекомбинантных методов или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

Термин "антитело" включает также биспецифическое антитело и/или гуманизированное антитело. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, содержащее две разных пары тяжелой и легкой цепей и два различных сайта связывания (см., например, Songsivilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelnik et al., *J. Immunol.* 148:1547-53 (1992)). В некоторых биспецифических антителах две разные пары тяжелой и легкой цепей включают пару тяжелой и легкой цепей гуманизированного антитела 5C1 и пару тяжелой и легкой цепей, которая является специфической по отношению к другому эпитопу альфа-синуклеина, отличному от того, который связан с 5C1.

В некоторых биспецифических антителах одна пара тяжелая цепь/легкая цепь является гуманизированным антителом 5C1, как будет описано ниже, и пара тяжелая цепь/легкая цепь происходит из антитела, которое связывается с рецептором, экспрессированным на поверхности гем(ат)оэнцефалического барьера, таким как рецептор инсулина, инсулиноподобный фактор роста (IGF), лептиновый рецептор или липопротеиновый рецептор или рецептор трансферрина (Friden et al., *PNAS* 88:4771-4775, 1991; Friden et al., *Science* 259:373-377, 1993). Такое биспецифическое антитело может проходить через гем(ат)оэнцефалический барьер за счет трансцитоза, опосредованного рецепторами. Всасывание биспецифического антитела мозгом может быть увеличено при получении его методами генной инженерии антитела с пониженным сродством к рецептору гемоэнцефалического барьера. Пониженное сродство к рецептору привело к более широкому распределению антитела в мозгу (см., например, Atwal et al. *Sci. Transl. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu et al. *Sci. Transl. Med.* 3, 84ra44, 2011).

Примерами биспецифических антител могут также быть (1) антитело с двойным вариабельным доменом (DVD-Ig), где каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два вариабельных домена в tandemе, соединенных коротким пептидом (Wu et al., *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) tandemное димерное антитело, которое представляет собой слияние двух одноцепочечных диател, приводящее к тетравалентному биспецифическому антителу, которое имеет два сайта связывания для каждого антигена-мишени; (3) димер антитела, который является комбинацией scFvs с диателом, что приводит к образованию мультивалентной молекулы; (4) так называемая молекула "ключ-замок", полученная по принципу "димеризации и докинга" в протеинкиназе A, которая при применении к Fabs может привести к получению трехвалентного биспецифического связывающего белка, состоящего из двух идентичных фрагментов Fab, связанных с другим фрагментом Fab; (5) так называемая Scorpion (скорпион) молекула, содержащая, например, два фрагмента scFvs, слитые с обоими концами человеческой Fc-области. Примеры платформ, используемых для получения биспецифических антител, включают BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab и Mab2 (F-STAR), IgG1 с фрагментом Fc (компания Xencor) или DuoBody (на основе обмена Fab, Genmab).

Термин "антиген" обозначает молекулу, с которой специфически связывается антитело.

Термин "эпитоп" относится к части молекулы антигена, с которой связывается антитело. В случае белковых антигенов эпитоп может быть образован из заменимых аминокислот или незаменимых аминокислот, расположенных рядом, путем фолдинга одного или более белков с образованием третичной структуры. Эпитопы, полученные из заменимых аминокислот, обычно сохраняются при действии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, полученные при фолдинге с образованием третичной структуры, обычно исчезают при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает 2, 3 и более типично по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в виде уникальной пространственной конформации. Методы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, кристаллографический рентгеновский метод и двухразмерный ядерный магнитный резонанс; см., например, Epitope Mapping Protocols, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Эпитоп может включать C-концевой остаток или N-концевой остаток. Эпитоп также может включать, но необязательно, свободную аминогруппу полипептида или свободную карбоксильную группу полипептида. Таким образом, эпитоп может включать C-концевой остаток или N-концевой остаток, но необязательно включает свободную карбоксильную группу или свободную аминогруппу соответственно. Специфичность связывания антитела иногда определяется рядом аминокислот. Если, например, говорят, что

антитело связывается с эпитопом в аминокислотах 118-126 последовательности SEQ ID NO: 1, это означает, что эпитоп находится в аминокислотах в указанном интервале положений, включая те положения, которые определяют внешние границы интервала. Это необязательно означает, что каждая аминокислота в этом интервале составляет часть эпитопа. Так, например, эпитоп в аминокислотах 118-126 последовательности SEQ ID NO: 1 может состоять из аминокислот 118-124, 119-125, 120-126, 120-124 или 120-122, среди других сегментов последовательности SEQ ID NO: 1.

Антитела, которые распознают одинаковые или перекрывающиеся эпитопы, можно идентифицировать простым методом иммуноанализа, показывающим способность одного антитела конкурировать в процессе связывания другого антитела с антигеном-мишенью. Эпитоп антитела можно также определить методом кристаллографического рентгеноструктурного анализа связывания антитела с его антигеном для идентификации контактирующих остатков (эпитоп определяется по остаткам, вступающим в контакт). Или же два антитела имеют один и тот же эпитоп, если все мутации аминокислот в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого антитела. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые мутации аминокислот, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого антитела.

Конкурентность антител определяется путем анализа, в котором испытуемое антитело ингибитирует специфическое связывание эталонного антитела с распространенным антигеном; см., например, Junghans et al. (1990), Cancer Res. 50:1495. Испытуемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток испытуемого антитела (например, по меньшей мере 2x, 5x, 10x, 20x или 100x) ингибирует связывание эталонного антитела по меньшей мере на 50, 75, 90, 95, 98 или 99% по данным метода анализа конкурентного связывания. Антитела, идентифицированные методом конкурентного анализа (конкурирующие антитела) включают антитела, которые связываются с тем же самым эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, достаточно близко расположенным к эпитопу, связанному эталонным антителом, чтобы возникло стерическое затруднение.

Антитела согласно данному изобретению обычно связываются с их обозначенной мишенью с константой аффинности, составляющей по меньшей мере 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или 10^{10} M⁻¹. Такое связывание является специфическим потому, что оно заметно больше по величине и отличается от неспецифического связывания, возникающего по меньшей мере с одной мишенью. Специфическое связывание может быть результатом образования связей между конкретными функциональными группами или конкретной пространственной структурой (например, типа ключ-замок), в то время как неспецифическое связывание обычно является результатом действия ван-дер-ваальсовских сил. Однако специфическое связывание вовсе необязательно подразумевает, что моноклональное антитело связывается с одной и только одной мишенью.

При сравнении последовательностей антител степень идентичности последовательностей определяется для последовательностей антител, максимально выровненных по системе нумерации Кабат. После выравнивания, если область антитела (например, целая зрелая вариабельная область тяжелой или легкой цепи) сравнивается с такой же областью эталонного антитела, степень идентичности между областями изучаемого и эталонного антитела представляет собой количество положений, занятых одной и той же аминокислотой в обеих сравниваемых областях антител, деленное на общее количество выровненных положений двух областей, при этом гэпы не считаются, и умноженное на 100 для получения величины в процентах.

С целью классификации аминокислотных замен на консервативные или неконсервативные аминокислоты группируют следующим образом: группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile; группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr; группа III (кислые боковые цепи): asp, glu; группа IV (основные боковые цепи): asn, gln, his, lys, arg; группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепей): gly, pro; и группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe. Консервативные замены включают замены между аминокислотами одного и того же класса. Неконсервативные замены составляют замены члена одного из этих классов на член другого класса.

Моноклональные антитела обычно бывают в выделенном виде. Это означает, что антитело является обычно по меньше мере на 50% вес./вес. чистым, без мешающих белков и других загрязнений, образующихся при его получении или очистке, но это не исключает возможности того, что агент соединяется с избытком фармацевтически приемлемого носителя (носителей) или с другим носителем, предназначенным для облегчения его применения. Иногда моноклональные антитела являются по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% вес./вес. чистыми от агрегатов или фрагментов таких моноклональных антител или других белков и загрязняющих веществ. Некоторые такие моноклональные антитела могут включать агрегаты или фрагменты, но они являются по меньшей мере на 99% чистыми от других белков и загрязняющих веществ.

Композиции или способы, использующие один или более перечисленных элементов, могут включать другие элементы, которые конкретно не указаны. Например, композиция, которая содержит антитело, может включать одно антитело или это антитело в комбинации с другими ингредиентами.

Указание на интервал величин подразумевает все целые числа в этом интервале и все подинтерва-

лы, определяемые целыми числами в указанном интервале.

Если иное не следует из контекста, термин "примерно" охватывает величины с учетом ошибки измерения (SEM) указанной величины.

Статистическая значимость обозначается $p \leq 0.05$.

Термин "пациент" включает человека или другого млекопитающего, которые получают или профилактическое, или терапевтическое лечение.

Считается, что субъект находится в группе повышенного риска заболеть какой-либо болезнью, если у него есть по меньшей мере один известный фактор риска (например, генетический, биохимический, отягощенная наследственность, ситуационная реакция), который означает, что этот субъект в большей степени подвержен риску развития этой болезни, чем субъекты, у которых нет такого фактора.

Термин "симптом" относится к субъективному доказательству наличия заболевания, такому как изменившаяся походка, что замечено пациентом. Термин "признак" относится к объективному доказательству наличия заболевания, которое отмечено пациентом.

Термин "когнитивная функция" относится к мозговым функциям, таким как любая или все из функций внимания, памяти, речи и понимания языка, решения проблем и проявления внимания к окружению и самому себе.

Термины "повышенная когнитивная функция" или "улучшенная когнитивная функция" относятся к улучшению исходного состояния, например уточненному диагнозу или в результате начала лечения. "Ухудшение когнитивной функции" относится к ухудшению функции по отношению к исходному состоянию.

Используя животные модели, такие как крысиная или мышиная, можно измерить когнитивную функцию с применением таких методов, как метод лабиринта, когда субъекты используют пространственную информацию (например, в водном лабиринте Морриса, круговом лабиринте Барнса, радиальном восьмирукавном лабиринте, Т-образном лабиринте и других), метод условно-рефлекторного замирания, метод активного избегания, метод освещенного открытого поля, измерение активности в темноте, метод приподнятого крестообразного лабиринта, метод двухкамерного опытного исследования или тест принудительного плавания.

У людей когнитивная функция может быть измерена при проведении одного или более стандартизованных тестов. Примеры тестов или анализов для определения когнитивной функции были описаны (см. Ruoppila and Suutama, Scand. J. Soc. Med. Suppl. 53, 44-65, 1997) и включают стандартизованные психометрические тесты (см., например, Wechsler Memory Scale, the Wechsler Adult Intelligence Scale, Raven's Standard Progressive Matrices, Schaeie-Thurstone Adult Mental Abilities Test), нейропсихологические тесты (см., например, Luria-Nebraska), метакогнитивные самооценки (см., например, Metamemory Questionnaire), оценку визуально-пространственных способностей (см., например, тест с чертежами Поппельрейтера, узнавание времени, тест с рисованием сотовой структуры, тест с рисованием и стиранием ячеистой структуры (Honeycomb Drawing and Cancellation), скрининг когнитивных способностей (см., например, Folstein's Mini Mental State Test) и проверка длительности реакции. Другие стандартные тесты изучения когнитивных способностей включают применение шкалы оценки тяжести болезни Альцгеймера - одраздела оценки когнитивного статуса (ADAS-cog); шкалы оценки изменений клиницистом на основании опроса и данных помощника пациента (CIBIC-plus шкала); шкалы оценки повседневной деятельности при болезни Альцгеймера в ходе совместного исследования (ADCS-ADL); минитеста для оценки психического состояния; применение нейропсихиатрического опросника (NPI); применение шкалы тяжести деменции (CDR); Кембриджской системы оценки когнитивных функций (CANTAB) или герiatricкой шкалы клинической оценки SANDOZ (SCAG), струп-тест, тест с построением маршрута, исследование по Векслеру и CogState компьютеризованные когнитивные тесты. Кроме того, когнитивная функция может быть измерена с использованием позитронной эмиссионной томографии (PET), функциональной магнитно-резонансной томографии (fMRI), однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT) или любого другого метода формирования изображения, который позволяет измерять функцию мозга.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

I. Общие сведения.

Настоящее изобретение предусматривает антитело, которое связывается с человеческим альфа-синуклеином, содержащее три участка CDR по определению Кабат (SEQ ID NO: 25-27) в легкой цепи и три участка CDR по определению Кабат (SEQ ID NO: 10-12) в тяжелой цепи. Антитело может представлять собой мышиное, химерное, венированное или гуманизированное антитело. Моноклональное антитело согласно изобретению связывается с эпиподом альфа-синуклеина (то есть эпиподом 118-126 альфа-синуклеина). Антитела согласно изобретению пригодны, например, для лечения расстройств, связанных с аккумуляцией альфа-синуклеина, особенно с аккумуляцией в тельцах Леви. Такие расстройства включают болезнь телец Леви, такую как болезнь Паркинсона, диффузную болезнь телец Леви (DLBD), вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBV), объединенные болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, первичную вегетативную невропатию и множественную системную атрофию (MSA). Антитела по изобретению пригодны также для диагностики болезней телец Леви.

II. Молекулы-мишени.

Природный человеческий альфа-синуклеин дикого типа представляет собой пептид, содержащий 140 аминокислот со следующей аминокислотной последовательностью:

```
MDVFMKGSLKAEGVVAAAEEKTQQGVAEAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHG  
VATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAATGFVKKDQLGKNEEGAP  
QEGLIEDMPVDPNEAYEMPSEEGYQDYEPEA (SEQ ID NO: 1)
```

(Uéda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11282-6, 1993; регистрационный номер в коллекции GenBank: P37840). Этот белок имеет три распознаваемых домена, повторяющийся домен КТКЕ, охватывающий аминокислоты 1-61, домен NAC (неамилоидный компонент), охватывающий аминокислоты от примерно 60 до 95, и С-концевой кислый домен из аминокислот от 98 до 140. Jensen et al. (1995) сообщили, что NAC содержит аминокислотную последовательность:

```
EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAATGFV (SEQ ID NO: 2)
```

(Jensen et al., Biochem. J. 310:1: 91-94; регистрационный номер в коллекции GenBank S56746). Однако Uéda et al. (1993) сообщили, что NAC содержит аминокислотную последовательность:

```
KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGS (SEQ ID NO: 3)
```

(Uéda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11282-6).

Если из контекста не следует иное, ссылка на альфа-синуклеин или его фрагменты охватывает природные человеческие аминокислотные последовательности дикого типа, указанные выше, и их человеческие аллельные варианты, особенно те, которые связаны с болезнью телец Леви (например, E46K, A30P и A53T, при этом первая буква указывает аминокислоту в последовательности SEQ ID NO: 1, число обозначает положение кодона в последовательности SEQ ID NO: 1 и вторая буква обозначает аминокислоту в аллельном варианте). Такие варианты могут содержаться в отдельности или в любой комбинации. Индуцированные мутации E83Q, A90V, A76T, которые способствуют агрегации альфа-синуклеина, также могут содержаться индивидуально или в комбинации друг с другом и/или с аллельными вариантами человека E46K, A30P и A53T.

III. Болезни телец Леви.

Болезни телец Леви (LBD) характеризуются дегенерацией дофаминергической системы, двигательными расстройствами, ухудшением когнитивных способностей и образованием телец Леви (LBs) (McKeith et al., Neurology (1996) 47:1113-24). Тельца Леви представляют собой сферические отложения белка, обнаруженные в нервных клетках. Их наличие в мозгу нарушает нормальную функцию мозга, прерывая действие химических мессенджеров, включая ацетилхолин и дофамин. Болезни телец Леви включают болезнь Паркинсона (включая идиопатическую болезнь Паркинсона), диффузную болезнь телец Леви (DLBD), известную также как деменция с тельцами Леви (DLB), вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBV), объединенные болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, первичную вегетативную невропатию и множественную системную атрофию (MSA; например, оливопонтокореллярную атрофию, стрионегральную дегенерацию и синдром Шая-Дреджера). При наличии DLBD у больных наблюдаются симптомы и болезни Альцгеймера, и болезни Паркинсона. DLBD отличается от болезни Паркинсона в основном положением телец Леви. При DLBD тельца Леви образуются в основном в коре головного мозга. В случае болезни Паркинсона они образуются в основном в черной субстанции (черном веществе). Другие болезни телец Леви включают первичную вегетативную невропатию и дисфагию телец Леви, случайную LBD, наследственную LBD (например, мутации гена альфа-синуклеина, генного локуса PARK3 и PARK4).

IV. Антитела.

A. Специфичность связывания и функциональные свойства.

Антитело согласно изобретению связывается с человеческим альфа-синуклеином, содержит три участка CDR по определению Кабат (SEQ ID NO: 25-27) в легкой цепи и три участка CDR по определению Кабат (SEQ ID NO: 10-12) в тяжелой цепи. Антитело 5C1 является примером антитела по изобретению, у которого зрелые вариабельные области тяжелой и легкой цепей обозначаются как SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 24 соответственно. Настоящее изобретение предусматривает также антитела, которые имеют функциональные свойства, такие как уменьшение образования нейронных агрегатов альфа-синуклеина, улучшение когнитивной функции и/или сохранение плотности синаптических соединений и/или дендритной плотности.

Другие антитела, обладающие такой специфичностью связывания, могут быть получены путем иммунизации мышей с помощью альфа-синуклеина или его фрагмента (например, фрагмента, включающего аминокислотные остатки 118-126 или их часть) и скрининга полученных антител на связывание их с альфа-синуклеином, необязательно при конкуренции с антителом 5C1. Для получения антитела, имеющего тот же эпитоп, что и антитело 5C1, предпочтительно использовать фрагмент антитела. Антитела можно также подвергнуть скринингу на их действие: (1) скринингу альфа-синуклеином в моделях грызунов, подвергнутых анализу, характеризующему поведение, например тесту в водном лабиринте Морриса (MWM) или тесту с горизонтальными перекладинами с круглым сечением, и/или подвергнутых иммунологическим анализам для детектирования альфа-синуклеина, агрегации альфа-синуклеина, синап-

тофизина, MAP2 и/или PSD95 в ткани мозга; (2) на моделях грызунов или других животных, не являющихся людьми, на заболевание, характеризующееся аккумуляцией альфа альфа-синуклеина с использованием анализов, характеризующих поведение, например теста в водном лабиринте Морриса (MWM) или теста с горизонтальными перекладинами с круглым сечением, и/или иммунологических анализов для детектирования альфа-синуклеина, агрегации альфа-синуклеина, синаптофизина, MAP2 и/или PSD95 в ткани мозга; и/или (3) на людей с состоянием, связанным с аккумуляцией альфа-синуклеина, с применением анализов, характеризующих поведение. Альтернативно или в добавление к вышесказанному, антитела можно подвергнуть скринингу против мутантных форм альфа-синуклеина для идентификации антитела с таким же или похожим профилем связывания, что и у антитела 5C1 в коллекцию мутационных изменений. Мутации могут представлять собой систематическую замену аланином (или серином, если аланин уже имеется) одного остатка за один раз или с более широким пространственным интервалом на всем протяжении альфа-синуклеина или его участка, на котором, как известно, находится эпитоп (например, в остатках 118-126).

Фиг. 6-8 и пример 6 характеризуют эпитоп антитела 5C1 между остатками 118-126 в сравнении с двумя другими антителами, а именно 9E4 и 5D12. Аланин-сканирующий мутагенез позволяет определить действие мутирующих индивидуальных аминокислот, одной в определенный момент времени, между положениями 118 и 126 альфа-синуклеина. Профиль относительных изменений сродства к связыванию (аффинности) (другими словами, вклада в связывание), вызванных мутацией различных аминокислот в положениях 118-126, характеризует эпитоп. Для антитела 5C1 мутагенез любого из остатков в положениях 120-122 значительно снижал связывание. Мутации в положениях 123 и 124 значительно снижали связывание, но не в такой степени, как в любом из положений 120-122. Мутации в положениях 118, 119, 125 или в положении 126 приводили еще к меньшему связыванию, по существу не меняли его. Для простоты влияние мутаций можно приблизительно разделить на три категории: практически полное снижение связывания в положениях 120-122 (не определяется по негативному контролю), практически отсутствие снижения связывания в положениях 118, 119, 125 и 126 (не определяется по позитивному контролю) и промежуточное снижение сродства к связыванию в положениях 123 и 124. Таким образом, эпитоп антитела 5C1 может быть приблизительно охарактеризован как линейный эпитоп, состоящий из или практически состоящий из остатков 120-124 последовательности SEQ ID NO: 1, при этом остатки 120-122 вносят самый большой вклад в связывание. Данное изобретение предусматривает антитела, имеющие эпитоп 5C1, охарактеризованный любыми признаками, описанными в данном параграфе. Некоторые антитела характеризуются эпитопом, состоящим практически из остатков 120-122, но без остатков 119-120, что означает, что каждый из остатков 120-122 в большой степени влияет на связывание, чем любой другой остаток, и остатки 119 и 120 не влияют на связывание, например, при использовании аланин-сканирующего метода в примере. Остатки 123 и 124 могут или не могут незначительно влиять на связывание в таких антителах.

В случае антитела 5D12 эпитоп характеризуется при проведении аланин-сканирующего мутагенеза следующим образом. Мутации в любом из положений 120-122 фактически отменяли связывание. Мутации в положениях 118, 119, 123 и 124, по существу, снижали связывание, но не так значительно, как в любом из положений 120-122. Мутации в положении 125 или 126 приводили к еще меньшему снижению связывания, оно практически не менялось. Для простоты влияние мутаций можно приблизительно разделить на три категории: практически полное снижение связывания в положениях 120-122 (не определяется по негативному контролю), практически отсутствие снижения связывания в положениях 125 и 126 (не определяется по позитивному контролю) и промежуточное снижение сродства к связыванию в положениях 118, 119, 123 и 124. Эпитоп антитела 5D12, таким образом, может быть охарактеризован как линейный эпитоп, состоящий или по существу состоящий из остатков 118-124 последовательности SEQ ID NO: 1, при этом остатки 120-122 вносят самый большой вклад в связывание. Данное изобретение предусматривает другие антитела, имеющие эпитоп 5D12, охарактеризованный любыми признаками, описанными в данном параграфе или описанными в примере 6.

Точно так же эпитоп антитела 9E4 может быть охарактеризован мутациями остатков в положениях 122 и 125, каждая снижает связывание в большей степени, чем мутации любого из остатков в положениях 118-121, 123, 124 или 126. Для простоты влияние мутаций можно приблизительно разделить на две категории: практически полное снижение связывания в положениях 120 и 125 и практически отсутствие снижения связывания в положениях 118-121, 123, 124 или 126. Эпитоп антитела 9E4 может, таким образом, быть охарактеризован как конформационный эпитоп, в котором остатки 122 и 125 обеспечивают точки контакта (или самый большой вклад в связывание) с антителом 9E4. Данное изобретение предусматривает другие антитела, имеющие эпитоп 9E4, охарактеризованный любыми признаками, описанными в данном параграфе или описанными в примере 6. Антитело может не быть ни антителом 9E4 или другим антителом, включающим те же CDRs, что и 9E4, ни антителом, содержащим по меньшей мере пять CDRs по Кабату по меньшей мере с 85%-ной идентичностью соответствующим CDRs в антителе 9E4.

Антитела, обладающие специфичностью связывания выбранного мышного антитела (например, 5C1), также могут быть получены с использованием варианта метода фагового дисплея; см. Winter, WO

92/20791. Это метод особенно подходит для получения человеческих антител. При осуществлении этого метода в качестве исходного материала применяется или вариабельная область тяжелой цепи, или вариабельная область легкой цепи. Если, например, в качестве исходного материала выбирают вариабельную область легкой цепи, конструируется фаговая библиотека, в которой члены включают ту же самую вариабельную область легкой цепи (а именно мышный исходный материал) и другую вариабельную область тяжелой цепи. Вариабельную область тяжелой цепи можно, например, получить из библиотеки реаранжированных вариабельных областей тяжелой цепи иммуноглобулинов человека. Затем выбирают фаг, обнаруживающий сильное специфическое связывание с альфа-синуклеином (например, по меньшей мере $10^8 M^{-1}$ и предпочтительно по меньшей мере $10^9 M^{-1}$). Вариабельная область тяжелой цепи от этого фага служит исходным материалом для конструирования дополнительной фаговой библиотеки. В этой библиотеке каждый фаг имеет ту же самую вариабельную область тяжелой цепи (а именно область, идентифицированную из первой библиотеки) и другую вариабельную область легкой цепи. Вариабельные области легких цепей могут быть получены, например, из библиотеки реаранжированных вариабельных областей легких цепей человека. Затем снова выбирают фаг, проявляющий сильное специфическое связывание с альфа-синуклеином. Полученные антитела обычно обладают той же или похожей специфичностью в отношении эпитопа, что и мышный исходный материал.

Другие антитела могут быть получены мутагенезом кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи антитела, такого как 5C1. Соответственно моноклональные антитела, у которых аминокислотные последовательности вариабельных областей зрелых тяжелой и/или легкой цепи по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны аминокислотным последовательностям антитела 5C1 и которые сохраняют свои функциональные свойства и/или которые отличаются от соответствующего антитела небольшим количеством функционально не связанных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или инсерций, также охвачены настоящим изобретением.

Данное изобретение включает также моноклональные антитела, содержащие некоторые или все (например, 3-5 и предпочтительно 6) CDRs, полностью или частично из 5C1. Такие антитела могут включать вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит по меньшей мере две и обычно все CDRs, полностью или частично из вариабельной области легкой цепи антитела 5C1. Предпочтительные антитела включают и тяжелые, и легкие цепи. CDR считается соответствующей CDR антитела 5C1, когда она содержит не более 4, 3, 2 или 1 замен, инсерций или делеций, за исключением того, что CDRH2 (по системе нумерации Кабата) может иметь не более 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен, инсерций или делеций. У таких антител аминокислотные последовательности вариабельных областей зрелых тяжелой и легкой цепей по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 96%, 97, 98 или 99% идентичны таким аминокислотным последовательностям 5C1, и они сохраняют свои функциональные свойства и/или отличаются от 5C1 от соответствующего антитела небольшим количеством функционально не связанных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или инсерций, также охвачены настоящим изобретением.

Предпочтительные антитела обладают функциональной активностью, похожей на активность 5C1, например они уменьшают нейритную и/или аксонную агрегацию альфа-синуклеина, уменьшают нейритную дистрофию, улучшают когнитивную функцию, возвращают, излечивают или ингибируют уменьшение когнитивных способностей и/или сохраняют или увеличивают плотность синаптических соединений и/или плотность дендритов.

В. Химерные и "венированные" антитела.

Данное изобретение предусматривает также химерные и "венированные" формы нечеловеческих антител, в частности антитела 5C1.

Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые вариабельные области тяжелой и легкой цепей нечеловеческого антитела (например, мышного) соединены с константными областями человеческих легкой и тяжелой цепей. Обычно константные области легкой и тяжелой цепей имеют человеческое происхождение, но константные области могут также происходить из других видов организмов, не являющихся людьми, когда это необходимо (например, для облегчения тестирования нечеловеческого антитела в подходящей животной модели). Такие антитела почти или полностью сохраняют специфичность связывания мышного антитела и могут включать примерно две трети последовательностей человека благодаря константным областям человека.

Венированное антитело представляет собой вид гуманизированного антитела, который сохраняет некоторые и обычно все CDRs и некоторые из остатков каркасной области вариабельного участка нечеловеческого антитела, но в нем заменены другие остатки каркасной области вариабельного участка, которые могут вносить вклад в В- или Т-клеточные эпитопы, например экспонированные остатки (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991) заменены остатками из соответствующих положений последовательности человеческого антитела. В результате получается антитело, в котором CDRs полностью или частично происходят из нечеловеческого антитела, и каркасные области вариабельных областей нечеловеческого антитела сделаны более человекоподобными путем замен.

С. Гуманизированные антитела.

Гуманизированные антитела 5C1 специфически связываются с человеческим альфа-синуклеином. Аффинность некоторых гуманизированных антител (например, Ка) может быть, например, в пять раз

или в два раза меньше аффинности мышного антитела 5C1. Некоторые гуманизированные антитела обладают аффинностью, превышающей аффинность мышного антитела 5C1. Предпочтительные гуманизированные антитела связываются с тем же эпитопом и/или конкурируют с мышным антителом 5C1 за связывание с человеческим альфа-сингулеином.

Гуманизированное антитело представляет собой генетически сконструированное антитело, в котором CDRs от нечеловеческого "донорного" антитела (например, мышного 5C1) привиты на последовательности человеческого "акцепторного" антитела (см., например, Queen, патенты США 5530101 и 5585089; Winter, патент США 5225539, Carter, патент США 6407213, Adair, патенты США 5859205, 6881557, Foote, патент США 6881557). Последовательности акцепторного антитела могут быть, например, последовательностью зрелого человеческого антитела, сочетанием таких последовательностей, консенсусной последовательностью человеческого антитела или последовательностью зародышевой линии. Таким образом, гуманизированное антитело 5C1 представляет собой антитело, включающее некоторые или все CDRs, происходящие полностью или почти полностью из мышного антитела 5C1, и последовательности каркасных областей вариабельного участка, и константные области, если они имеются, происходят полностью или почти полностью из последовательностей человеческого антитела. Аналогично, тяжелая цепь гуманизированного антитела имеет по меньшей мере две и обычно все три CDRs, полностью или почти полностью происходящие из тяжелой цепи донорного антитела и последовательности каркасной области вариабельного участка тяжелой цепи, и константные области, если они имеются, происходят почти полностью из каркасной области вариабельного участка тяжелой цепи антитела человека и последовательностей константной области. Аналогично, легкая цепь гуманизированного антитела имеет по меньшей мере две и обычно все три CDRs, полностью или почти полностью происходящие из легкой цепи донорного антитела и последовательности каркасной области вариабельного участка легкой цепи, и константные области, если они имеются, происходят почти полностью из каркасной области вариабельного участка легкой цепи антитела человека и последовательностей константной области. В отличие от нанотел и dAbs гуманизированное антитело включает гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. В соответствующих CDRs предпочтительно по меньшей мере 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков (согласно системе нумерации по Кабату) идентичны. Последовательности каркасной области вариабельного участка в цепи антитела или константная область в цепи антитела, по существу, происходят из последовательности каркасной области вариабельного участка человеческого антитела или константной области человеческого антитела соответственно, когда по меньшей мере 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков (согласно системе нумерации по Кабату) идентичны.

Хотя гуманизированные антитела часто содержат все шесть CDRs (предпочтительно определенные согласно Кабату) из мышного антитела, они могут быть также получены с меньшим количеством CDRs (по меньшей мере с 3, 4 или 5 CDRs) из мышного антитела (см., например, Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320:415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000).

В некоторых антителах только часть CDRs, а именно набор остатков CDR, требующихся для связывания, заканчивающихся определяющими специфичность остатками (SDRs) (Kashmiri et al., Methods (2005) 36(1):25-34), требуется для сохранения связывания в гуманизированном антителе. Остатки CDR, не контактирующие с антигеном и находящиеся не среди SDRs, могут быть идентифицированы на основе предыдущих исследований (например, один или более остатков или все остатки из H60-H65 в CDRH2 иногда не требуются) из областей SDRs в нумерации по Кабату, лежащих вне гипервариабельных петель по Чотиа (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987), путем молекулярного моделирования и/или эмпирически, как описано в публикации Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004. В таких гуманизированных антителах в положениях, в которых отсутствуют один или более остатков донорных CDR или в которых отсутствует вся донорная область CDR, аминокислота, занимающая такое положение, может быть аминокислотой, занимающей соответствующее положение (согласно нумерации по Кабату) в последовательности акцепторного антитела. Число таких замен акцепторных аминокислот на донорные аминокислоты для включения в CDRs отражает баланс конкурирующих аспектов. Такие замены являются потенциально преимущественными при уменьшении количества аминокислот мышного антитела и соответствующего уменьшения потенциальной иммуногенности. Однако замены могут также вызвать изменения аффинности, а значительного снижения аффинности предпочтительно избегать.

Последовательности человеческого акцепторного антитела человеческого происхождения могут быть выбраны из многих последовательностей известных человеческих антител для обеспечения высокой степени идентичности последовательностей (например, 65-85%-ная идентичность) каркасных областей вариабельного участка человеческого акцепторного антитела и соответствующих каркасных областей вариабельной области в цепи донорного антитела.

Для осуществления замен могут быть выбраны некоторые аминокислоты из остатков каркасной области вариабельной области человеческого антитела, выбор производят на основе их возможного влияния на конформацию CDR и/или способность связывания с антигеном. Изучение такого возможного влияния проводят путем моделирования, проверки характеристик аминокислот в определенных положениях или путем эмпирического наблюдения за влиянием замены или мутагенезом конкретных аминокислот.

Например, когда аминокислоты в остатке в каркасной области мышевой вариабельной области и в остатке в каркасной области выбранного вариабельного участка человеческого происхождения отличаются, аминокислота в каркасной области человеческого происхождения может быть заменена эквивалентной аминокислотой каркасной области мышевого антитела, когда обоснованно ожидается, что аминокислота:

- (1) непосредственно связывается с антигеном нековалентными силами;
- (2) прилегает к CDR;

(3) иначе взаимодействует с CDR (например, находится на расстоянии примерно 6 Å от CDR-области), (например, идентифицирована путем моделирования легкой или тяжелой цепи на разрешенной структуре гомологичной цепи известного иммуноглобулина); и

- (4) является остатком, находящимся на границе раздела (интерфейса) VL-VH.

Остатки каркасной области из классов (1)-(3), описанных в патенте США Queen, № 5530101, иногда называют каноническими и вспомогательными (верньерными). Остатки каркасной области, которые помогают определить конформацию петли CDR, иногда называются каноническими остатками (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987), Thornton & Martin J. Mol. Biol., 263, 800-815, 1996). Остатки каркасной области, которые поддерживают конформацию петли связывания с антигеном и играют роль в "тонкой регуляции" связывания антитела с антигеном, иногда называются вспомогательными остатками (Foote & Winter, 1992, J. Mol. Bio. 224, 487-499).

Другие остатки каркасной области, являющиеся кандидатами для проведения замен, представляют собой остатки, создающие потенциальный сайт гликозилирования. Другими кандидатами для проведения замен являются аминокислоты каркасной области человеческого происхождения, которые необычны для человеческого иммуноглобулина в этом положении. Эти остатки аминокислот могут быть заменены остатками аминокислот из эквивалентного положения мышевого донорного антитела или из эквивалентных положений более типичных иммуноглобулинов человеческого происхождения.

Настоящее изобретение предусматривает гуманизированные формы мышевого антитела 5C1. Это мышевое антитело содержит зрелые вариабельные области тяжелой и легкой цепей, включающие аминокислотные последовательности, составляющие SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 24 соответственно. Данное изобретение предусматривает пять зрелых гуманизированных вариабельных областей тяжелой цепи: H1, SEQ ID NO: 14; H2, SEQ ID NO: 15; H3, SEQ ID NO: 16; H4, SEQ ID NO: 17 и H5, SEQ ID NO: 18. Настоящее изобретение предусматривает также четыре зрелые гуманизированные вариабельные области легкой цепи: L1, SEQ ID NO: 29; L2, SEQ ID NO: 30; L3, SEQ ID NO: 31 и L4, SEQ ID NO: 32. Предусмотрены также антитела, которые включают любые перестановки этих зрелых вариабельных областей тяжелых и легких цепей, а именно H1L2, H1L3, H1L4, H2L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L1, H3L2, H3L3, H3L4, H4L1, H4L2, H4L3, H4L4, H5L1, H5L2, H5L3 или H5L4. Вариант H4L3, который включает восемь обратных мутаций в тяжелой цепи и пять обратных мутаций в легкой цепи, имеет величину аффинности к альфа-синуклеину (измеренную при помощи системы Biacore), которая примерно вдвое превышает величины аффинностей двух антител 5C1 - мышевого и химерного; см. табл. 3, приведенную ниже. По данным метода ELISA вариант H4L3 обладает аффинностью к альфа-синуклеину, которая практически равна этому показателю у химерного антитела (без учета ошибки опыта) и превосходит аффинность мышевого антитела 5C1; см. фиг. 5. Кроме того, вариант H5L3, который включает шесть обратных мутаций в тяжелой цепи и пять обратных мутаций в легкой цепи, обладает аффинностью к человеческому альфа-синуклеину (измеренной при помощи системы Biacore), которая примерно в четыре раза превышает величины аффинности мышевого и химерного антител 5C1; см. табл. 3 ниже. Вариант H3L4, который включает девять обратных мутаций в тяжелой цепи и две обратные мутации в легкой цепи, также характеризовался аффинностью к человеческому альфа-синуклеину (измеренной при помощи метода ELISA), которая практически такая же, как у химерного антитела 5C1 (без учета ошибки опыта), и варианты H3L3 и H3L1, каждый из которых включает девять обратных мутаций в тяжелой цепи и пять и шесть обратных мутаций в легкой цепи соответственно, характеризовались аффинностью к человеческому альфа-синуклеину, которая превышала аффинность мышевого антитела 5C1 (по данным метода ELISA).

Данное изобретение предусматривает также варианты H4L3 гуманизированного антитела 5C1, в которых последовательности в зрелых гуманизированных вариабельных областях тяжелой цепи по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичны последовательностям в H4 (SEQ ID NO: 17) и последовательности в зрелых гуманизированных вариабельных областях легкой цепи по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичны последовательностям в L3 (SEQ ID NO: 31). В некоторых таких антителах сохраняются по меньшей мере одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или все тринадцать обратных мутаций в H4L3. Данное изобретение предусматривает также варианты H5L3 гуманизированного антитела 5C1, в которых последовательности в зрелых гуманизированных вариабельных областях тяжелой цепи по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичны последовательностям в H5 (SEQ ID NO: 18) и последовательности в зрелых гуманизированных вариабельных областях легкой цепи по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичны последовательностям в L5 (SEQ ID NO: 31). В некоторых таких антителах сохраняются по меньшей мере одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или все одиннадцать обратных мутаций в H5L3.

Настоящее изобретение предусматривает также варианты H3L4 гуманизированного антитела 5C1, в которых последовательности в зрелых гуманизированных вариабельных областях тяжелой цепи по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичны последовательностям в H3 (SEQ ID NO: 16) и последовательности в зрелых гуманизированных вариабельных областях легкой цепи по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичны последовательностям в L4 (SEQ ID NO: 32). В некоторых таких антителах сохраняются по меньшей мере одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или все одиннадцать обратных мутаций в H3L4. В некоторых антителах по меньшей мере одно из положений в H11, H27, H30, H48 и H73 в Vh области занято аминокислотами L, Y, T, I и K соответственно. В некоторых антителях положения в H11, H27, H30, H48 и H73 в Vh области заняты аминокислотами L, Y, T, I и K соответственно. В некоторых антителях по меньшей мере одно из положений H67, H69, H91 и H94 в Vh области занято аминокислотами A, L, F и S соответственно, как и в варианте H4. В некоторых антителях положение H94 занято аминокислотой S, например, в варианте H5. В некоторых антителях положения H67, H69, H91 и H94 в Vh области заняты аминокислотами A, L, F и S соответственно, например, как в варианте H3. В некоторых антителях по меньшей мере одно из положений L12 и L14 в Vk области занято аминокислотой S, как, например, в L3 и L4. В некоторых антителях оба положения L12 и L14 в Vk области заняты аминокислотой S, как в вариантах L3 и L4. В некоторых антителях по меньшей мере одно из положений L2, L45, L49 и L87 в Vk области занято аминокислотами V, K, N и F соответственно. В некоторых антителях положения L2, L49 и L87 в Vk области заняты аминокислотами V, N и F соответственно, как в варианте L3. В некоторых антителях положения L2, L45, L49 и L87 в Vk области заняты аминокислотами V, K, N и F соответственно, как в варианте L1. Области CDR таких гуманизированных антител могут быть идентичны или практически идентичны областям CDR H4L3 или H5L3, которые являются такими же, как в мышном донорном антителе. Области CDR могут быть определены в соответствии с обычными системами нумерации (например, по Чотиа), но предпочтительно согласно системе нумерации по Кабату.

Одной из возможностей дополнительной вариации в вариантах гуманизированного антитела 5C1 являются дополнительные обратные мутации в каркасных участках вариабельных областей. Многие из остатков в каркасных участках, не контактирующие с CDRs в гуманизированном mAb, могут содержать замены аминокислот из соответствующих положений донорного мышного mAb или других мышных или человеческих антител, и даже многие потенциальные остатки, контактирующие с CDR, также поддаются введению замен, или даже аминокислоты в CDRs могут быть изменены, например, при помощи остатков, находящихся в соответствующем положении человеческой акцепторной последовательности, используемой для доставки каркасных участков вариабельных областей. Кроме того, например, для тяжелой и/или легкой цепи могут быть использованы альтернативные акцепторные последовательности человеческого происхождения. Если используют другие акцепторные последовательности, одну или более обратных мутаций, рекомендованных выше, можно не осуществлять, потому что соответствующие донорные и акцепторные остатки уже являются теми же самыми без обратной мутации. Например, когда используют акцепторную последовательность тяжелой цепи, в которой положение H11 уже занято аминокислотой L, положение H48 уже занято аминокислотой I и/или положение H73 уже занято аминокислотой K, соответствующая(ие) обратная(ие) мутация(мутации) не является необходимой. Точно так же, когда используют акцепторную последовательность легкой цепи, в которой положение L12 и/или L14 занято аминокислотой S, соответствующая(ие) обратная(ие) мутация(мутации) не является необходимой.

Настоящее изобретение включает также гуманизированные антитела, в которых последовательности зрелых вариабельных областей легких и тяжелых цепей по меньше мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям зрелых вариабельных областей легких и тяжелых цепей гуманизированных 5C1 H1L1, H1L2, H1L3, H1L4, H2L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L1, H3L2, H3L3, H4L1, H4L2, H4L4, H5L1, H5L2 или H5L4. CDR области в таких гуманизированных антителах могут быть идентичны или практически идентичны CDR в мышном донорном антителе. Области CDR могут быть определены в соответствии с обычными системами нумерации (например, по Чотиа), но предпочтительно согласно системе нумерации по Кабату.

D. Выбор константной области.

Вариабельные области тяжелых и легких цепей химерных, гуманизированных (включая "венированные") или человеческих антител могут быть связаны по меньшей мере с частью константной области, достаточной для взаимодействия с Fc рецептором. Константная область обычно является человеческой, но, если это необходимо, можно выбрать константную область нечеловеческого происхождения.

Выбор константной области зависит частично от того, желательно ли получить антитело-зависимый комплемент и/или опосредованную клеточную цитотоксическую активность. Например, человеческие изотопы IgG1 и IgG3 обладают комплемент-опосредованной цитотоксичностью, в то время как человеческие изотипы IgG2 и IgG4 имеют низкую комплемент-опосредованную цитотоксичность или вообще ее не имеют. Константная область человеческого иммуноглобулина IgG1, подходящая для включения в антитела по изобретению, может содержать последовательность SEQ ID NO: 38. Константные области легкой цепи могут быть областями лямбда или каппа. Человеческая константная область легкой цепи каппа, подходящая для включения в антитела по изобретению, может содержать последовательность

SEQ ID NO: 40. Антитела могут экспрессироваться в виде тетramerов, содержащих две легких и две тяжелых цепи в виде отдельных тяжелых цепей, в виде отдельных легких цепей, в виде фрагментов Fab, Fab', F(ab')2 или Fv, или одноцепочечных антител, в которых вариабельные области тяжелых и легких цепей связаны через сплайсер.

Человеческие константные области характеризуются аллотипической вариацией и изоаллотипической вариацией между отдельными субъектами. То есть константные области могут быть разными у разных субъектов в одном или более полиморфном положениях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотка, распознающая изоаллотип, связывается с неполиморфной областью одного или более других изотипов. Человеческая константная область включает константную область с любым природным аллотипом или любой перестановкой остатков, занимающих полиморфные положения в природных аллотипах, или содержащую до 3, 5 или 10 замен для ослабления или усиления эффекторной функции, как описано ниже.

Одна или несколько аминокислот на аминоконце или карбоксиконце легкой и/или тяжелой цепи, такая как С-концевой лизин тяжелой цепи, может отсутствовать или быть дериватизирована в части молекул или во всех молекулах. Замены могут быть произведены в константных областях для ослабления или усиления эффекторной функции, например комплемент-опосредованной цитотоксичности (см., например, Winter et al., патент США № 5624821; Tso et al., патент США № 5834597 и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), или для пролонгирования периода полужизни в организме человека (см., например, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Примеры замен включают Gln в положении 250 и/или Leu в положении 428 (в этом параграфе для константной области используется система нумерации EU) для увеличения периода полужизни антитела. Замена в любом или во всех положениях 234, 235, 236 и/или 237 снижает аффинность к рецепторам Fc γ , в частности к рецептору Fc γ RI (см., например, патент США № 6624821). Замена аланином в положениях 234, 235 и 237 человеческого иммуноглобулина IgG1 может быть использована для ослабления эффекторных функций. Положения 234, 236 и/или 237 в человеческом антителе IgG2 могут быть заменены аланином и положение 235 - глутамином (см., например, патент США № US 5624821). В некоторых случаях применяется мутация в одном или более положениях 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 и 331 (по системе нумерации EU) человеческого антитела IgG1. В других случаях используется мутация в одном или более положениях 318, 320 и 322 (по системе нумерации EU) человеческого IgG1. Согласно некоторым аспектам изобретения изотип представляет собой человеческое антитело IgG2 или IgG4.

E. Человеческие антитела.

Человеческие антитела к альфа-синуклеину получают различными методами, описанными ниже. Некоторые человеческие антитела выбраны после экспериментов по конкурентному связыванию или другим способом таким образом, чтобы они обладали специфичностью к тому же, или перекрывающемуся с ним, эпигеному, что и 5C1. Можно также проводить скрининг человеческих антител на специфичность к конкретному эпигеному, используя в качестве иммуногена только фрагмент альфа-синуклеина (например, аминокислотные остатки 118-126), или проводить скрининг антител к совокупности делекционных мутантов альфа-синуклеина. Одним из способов получения человеческих антител является методика с использованием триом (Oestberg et al., Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, патент США № 4634664 и Engleman et al., патент США № 4634666). Другой метод включает иммунизацию трансгенных мышей, экспрессирующих гены человеческого иммуноглобулина, таких мышей как XenoMouse®, AlivaMab Mouse или Veloceimmune Mouse (см., например, Lonberg et al., международную заявку WO 93/1222, патент США № 5877397, патент США № 5874299, патент США № 5814318, патент США № 5789650, патент США № 5770429, патент США № 5661016, патент США № 5633425, патент США № 5625126, патент США № 5569825, патент США № 5545806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, и международную заявку WO 91/10741). Другим методом является фаговый дисплей (см., например, Dower et al., международная заявка WO 91/17271 и McCafferty et al., международная заявка WO 92/01047, патент США № 5877218, патент США № 5871907, патент США № 5858657, патент США № 5837242, патент США № 5733743 и патент США № 5565332). Этими методами получают библиотеки на основе фага, члены которых визуализируют различные антитела на своей внешней поверхности. Антитела обычно визуализируются в виде фрагментов Fv или Fab. Антитела из фаг-дисплейной библиотеки с заданной специфичностью выбирают аффинным обогащением по пептиду альфа-синуклеина или его фрагменту. Другой метод представляет собой секвенирование ДНК из человеческих В клеток согласно общим протоколам, представленным в Reddy et al., Nat Biotechnol 2010 Sept 28(9):965-9 (Epub 2010 Aug 29) и в заявках на патент США №№ 20110053803, 20100099103, 20100291066, 20100035763 и 20100151471. Коротко говоря, В клетки можно получать от человека с подозрением на антитела к альфа-синуклеину, например у человека, иммунизированного альфа-синуклеином, его фрагментами, более протяженными полипептидами, содержащими альфа-синуклеин, или их фрагментами, или с подозрением на антидицитические антитела. Затем мРНК антител из В клеток подвергают обратной транскрипции в кДНК и секвенируют, применяя, например, технологию 454 секвенирования (высокопроизводительного пиросеквенирования). После получения последовательно-

стей цепей каждого антитела цепи можно объединять попарно (например, с использованием биоинформатики), клонировать, экспрессировать и подвергать скринингу на заданные свойства.

F. Экспрессия рекомбинантных антител.

Известен целый ряд способов получения химерных и гуманизированных антител с применением линии клеток, экспрессирующих антитело (например, клеточной линии гибридом). Например, вариабельные области антител можно клонировать и секвенировать общезвестными способами. В соответствии с одним способом вариабельную область тяжелой цепи VH клонируют методом RT-PCR с использованием мРНК из гибридомных клеток. Для последовательности лидерного пептида VH области применяют консенсусные праймеры, включающие инициирующий кодон в качестве 5'-праймера и 3'-праймер, специфический к g2b константным областям. Примеры праймеров описаны в опубликованной заявке на патент США № 2005/0009150 на имя Schenk et al. (далее "Schenk"). Можно сравнивать последовательности множественных независимых клонов, чтобы убедиться, что в процессе амплификации не введены никакие изменения. Последовательность области VH также можно определять или подтверждать посредством секвенирования VH фрагмента, полученного с использованием 5' RACE RT-PCR и 3' g2b-специфического праймера.

Вариабельную область легкой цепи VL можно клонировать методом, аналогичным клонированию области VH. Согласно одному методу создают набор консенсусных праймеров, предназначенных для амплификации VL областей, с целью гибридизации с VL областью, включающую инициирующий кодон и 3'-праймер, специфический к Ck области, расположенной 3' от V-J сегмента. Согласно второму методу для клонирования кДНК, кодирующей VL, применяют методологию 5'RACE RT-PCR. Примеры праймеров представлены в Schenk, supra. Клонированные последовательности затем объединяют с последовательностями, кодирующими человеческие (или другие, нечеловеческого происхождения) константные области. Примеры последовательностей, кодирующих человеческие константные области, включают SEQ ID NO: 37, которая кодирует константную область человеческого IgG1, и SEQ ID NO: 39, которая кодирует константную область легкой каппа-цепи человеческого иммуноглобулина.

Согласно одному способу вариабельные области тяжелой и легкой цепей модифицировали таким образом, чтобы кодировались донорные последовательности сплайс-сайта в направлении 3' от соответствующих VDJ или VJ сегментов, и клонировали в вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, такой как pCMV-hγ1 для тяжелой цепи и pCMV-Mcl для легкой цепи. Эти векторы кодируют человеческие γ1 и Ck константные области в виде экзонных фрагментов 3' от встроенной кассеты экспрессии вариабельной области. После подтверждения корректности последовательностей векторы экспрессии тяжелой и легкой цепей можно котрансфектировать в клетки СНО для продуцирования химерных антител. Кондиционированную среду собирают через 48 ч после трансфекции и анализируют, применяя вестерн-блоттинг для определения продуцирования антитела или метод ELISA для анализа связывания с антигеном. Химерные антитела являются гуманизированными, как описано выше.

Химерные, венированные и человеческие антитела обычно получают методами экспрессии рекомбинантных белков. Конструкции рекомбинантных нуклеиновых кислот обычно включают последовательность, ответственную за регуляцию экспрессии (регуляторную последовательность), функционально связанную с последовательностями, кодирующими цепи антитела, включая природный(е) или гетерологичный(е) регуляторный(е) элемент(ы) экспрессии, такой как промотор. После того как вектор введен в соответствующего хозяина, хозяина сохраняют в условиях, пригодных для высокоуровневой экспрессии нуклеотидных последовательностей и сбора и очистки перекрестно-реактивных антител.

Эти экспрессионные векторы обычно могут реплицироваться в организме хозяина либо в виде эпизом, либо как составной элемент хромосомной ДНК клетки-хозяина. Обычно экспрессионные векторы содержат селективные маркеры, например маркер резистентности к ампициллину или к гигромицину, чтобы обеспечить обнаружение клеток, трансформированных с использованием заданных последовательностей ДНК.

E. coli представляет собой один из прокариотических организмов (хозяев), пригодных для клонирования последовательностей ДНК, кодирующих полипептиды по настоящему изобретению. Микроорганизмы, такие как дрожжи, также применимы для экспрессии. Клетки дрожжей *Saccharomyces* представляют собой клетки-хозяева с подходящими векторами, имеющими нужные последовательности, отвечающие за регуляцию экспрессии, ориджин репликации, последовательности терминации экспрессии и т.п. Типичные промоторы включают промотор 3'-фосфоглицерат киназы и других гликолитических ферментов. Индуцируемые промоторы дрожжей включают, среди прочих, промоторы алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома С и ферментов, отвечающих за утилизацию мальтозы и галактозы.

Клетки млекопитающих представляют собой клетки-хозяева для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты; см. Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). Разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки и включающих линии клеток СНО, различные линии клеток COS, клетки HeLa, L клетки, линии почечных клеток человеческих эмбрионов и линии миеломных клеток. Клетки могут представлять собой клетки нечеловеческого происхождения. Экспрессионные векторы для этих клеток могут включать регуляторные последовательности (последовательности регуляции экспрессии), такие

как ориджин репликации, промотор, энхансер (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)), и сайты с информацией, необходимой для процессирования, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты аденилирования и последовательности терминации транскрипции. Регуляторные последовательности могут включать промоторы эндогенных генов, генов цитомегаловируса, SV40, адено-вирусов, вируса бычьей папилломы и т.п.; см. Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992).

Или же последовательности, кодирующие антитело, можно включать в трансгены для введения в геном трансгенного животного и последующей экспрессии в молоке трансгенного животного (см., например, патент США № 5741957, патент США № 5304489, патент США № 5849992). Подходящие трансгены включают кодирующие последовательности для легкой и/или тяжелой цепей, функционально связанные с промотором и энхансером специфического гена железы млекопитающего, например казеина или лактоглобулина.

Векторы, содержащие сегменты ДНК, можно трансфенировать в клетку-хозяина методами, зависящими от типа хозяина. Например, трансфекцию посредством хлорида кальция обычно применяют для прокариотических клеток, тогда как обработку фосфатом кальция, электропорацию, лиофекцию, биолистику (биобаллистику) или вирусную трансфекцию можно применять для других клеток-хозяев. Другие способы трансформации клеток млекопитающих включают применение полибрена, слияние протопластов, липосомы, электропорацию и микроинъекцию. Для получения трансгенных животных трансгены можно вводить в оплодотворенные яйцеклетки (ооциты) с помощью микроинъекций или их можно включать в геном эмбриональных стволовых клеток и ядро таких клеток переносить в безъядерные ооциты.

После введения вектора(ов), кодирующего(их) тяжелую и легкую цепи, в клеточную культуру пул клеток можно подвергать скринингу на продуктивность роста и качество продукции в бессыворточной среде. Затем можно проводить FACS-клонирование единичных клеток из клеточных пулов с наивысшей продуктивностью для получения моноклональных линий. Можно использовать пулы, специфическая продуктивность которых выше 50 или 100 пг на клетку в день, что соответствует титрам продуктов выше 7.5 г/л культуры. Можно проводить тестирование антител, продуцируемых клонами из единичных клеток, определяя мутность, фильтрационные свойства, проводить анализы PAGE, IEF, УФ-сканирование, HP-SEC, углевод-олигосахаридное картирование, масс-спектрометрический анализ и анализ связывания, такой как ELISA или Biacore. После этого выбранный клон можно поместить в многочисленные виали (консервировать) и хранить в замороженном состоянии до момента употребления.

Экспрессированные антитела можно затем очищать в соответствии со стандартными методами, известными в данной области, включая захват белка A, очистку методом ВЭЖХ (HPLC), колоночную хроматографию, электрофорез в геле и т.п. (см. в целом Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Можно применять методологию промышленного производства, включающую кодон-оптимизацию, отбор промоторов, элементов транскрипции и терминаторов, клонирование единичных клеток в бессыворточной среде, консервацию клеток, применение селективных маркеров для амплификации числа копий, СНО терминатор, клонирование единичных клеток в бессыворточной среде, повышение титра белков (см., например, патент США № 5786464, патент США № 6114148, патент США № 6063598, патент США № 7569339, международные заявки W02004/050884, W02008/012142, W02008/012142, W02005/019442, W02008/107388 и W02009/027471 и патент США № 5888809).

G. Скрининг антител.

Можно осуществлять несколько анализов антител, включая анализы связывания, функциональные анализы, скрининг на животных моделях заболеваний, ассоциируемых с отложениями белка альфа-синуклеина, и клинические испытания. В анализах связывания определяют специфическое связывание и, необязательно, аффинность и эпитопную специфичность к альфа-синуклеину (или к его фрагменту, такому как аминокислотные остатки 118-126). Такие анализы иногда осуществляют в формате конкурентного анализа с типичным антителом, таким как 5C1. Необязательно, в этом анализе либо антитело, либо мишень-альфа-синуклеин является иммобилизованным. Функциональные анализы можно осуществлять на клеточных моделях, включая клетки, естественно экспрессирующие альфа-синуклеин или трансфицированные с использованием ДНК, кодирующей альфа-синуклеин или его фрагмент. Подходящие клетки включают нейроны. Можно осуществлять скрининг клеток на пониженные уровни альфа-синуклеина (например, с применением вестерн-блоттинга или иммунопреципитацией клеточных экстрактов или супернатантов), пониженные уровни агрегированного альфа-синуклеина (например, с применением иммуногистохимических и/или методов конфокальной микроскопии), и/или на пониженную токсичность, обусловленную альфа-синуклеином.

Скрининг на животных моделях проводят с целью проверить способность антитела осуществлять терапевтическое или профилактическое лечение на животной модели объективных признаков или симптомов, имитирующих человеческое заболевание, обусловленное отложениями белка альфа-синуклеина, такое как болезнь телес Леви (LBD). Соответствующие объективные признаки или симптомы, которые можно контролировать, включают равновесие при движении, координацию и когнитивные нарушения. Степень нарушения функций можно определять путем сравнения с соответствующим контролем, таким

как равновесие при движении, координация или когнитивное нарушение у контрольных животных, получавших контрольное антитело (например, соответствующее по изотипу контрольное антитело), плацебо или вообще не получавших никакого лечения. В организме трансгенных или других животных моделей с болезнью телец Леви может экспрессироваться трансген, кодирующий человеческий альфа-синуклеин. Для того чтобы упростить тестирование на животных моделях, можно использовать антитела, имеющие константную область, присущую животной модели. Можно сделать вывод, что гуманизированный вариант антитела будет эффективным, если соответствующее мышевое антитело или химерное антитело является эффективным у желаемой животной модели, а гуманизированное антитело имеет сходную аффинность связывания (например, с разницей в 1,5, 2 или 3 раза, в пределах ошибки опыта).

Клинические испытания проводят на людях с заболеванием, обусловленным отложениями белка альфа-синуклеина, с целью определить безопасность и активность (антител).

Н. Нукleinовые кислоты.

В настоящем изобретении предусматриваются также нукleinовые кислоты, кодирующие любую из описанных выше тяжелых и легких цепей. Как правило, нукleinовые кислоты кодируют также сигнальный пептид, связанный со зрелыми тяжелой и легкой цепями. Соответствующие примеры сигнальных пептидов включают аминокислотные остатки 1-19 последовательности SEQ ID NO: 6 (кодируемые нуклеотидами 1-57 последовательности SEQ ID NO: 5) и аминокислотные остатки 1-19 последовательности SEQ ID NO: 8 (кодируемые нуклеотидами 1-57 последовательности SEQ ID NO: 7). Кодирующие последовательности нукleinовых кислот могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями, чтобы гарантировать экспрессию кодирующих последовательностей, таких как промотор, энхансер, сайт связывания рибосом, сигнал терминации транскрипции и т.п. Нукleinовые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть в виде выделенных нукleinовых кислот или их можно клонировать в один или более векторов. Нукleinовые кислоты можно синтезировать, например, твердофазным синтезом или PCR (ПЦР) перекрывающихся олигонуклеотидов. Нукleinовые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть соединены в виде одной непрерывной нукleinовой кислоты, например, в экспрессионном векторе, или могут быть раздельными, например каждая клонирована в свой собственный экспрессионный вектор.

V. Терапевтическое применение.

В настоящем изобретении предусматривается несколько способов лечения или профилактики болезни телец Леви (LBD) у пациентов с риском развития такого заболевания. Пациенты, подлежащие лечению, включают субъектов с риском развития LBD, но не проявляющих симптомы, а также пациентов, у которых в настоящее время наблюдаются симптомы или ранние признаки синуклеинопатий, например замедление ЭЭГ (EEG), нейропсихиатрические проявления (депрессия, деменция, галлюцинации, тревога, апатия, ангедония), вегетативные изменения (ортостатическая гипотензия, нарушения нормальной работы мочевого пузыря, недержание кала, повышенное слюноотделение, дисфагия, сексуальная дисфункция, изменения мозгового кровообращения), изменения чувственного восприятия (аномальные восприятие обонятельных, болевых ощущений, аномальное распознавание цвета), нарушения сна (поведенческие расстройства (RBD, ПРБ) фазы быстрого сна (REM, БДГ), синдром усталых ног/периодическое движение конечностей во сне, гиперсomnia, инсомния) и разнообразные другие признаки и симптомы (усталость, диплопия, нечеткость зрения, себорея, потеря/прибавка в весе). Следовательно, способы по настоящему изобретению можно применять профилактически по отношению к субъектам с генетически обусловленным повышенным риском развития LBD. Такие субъекты включают субъектов, имеющих родственников с таким заболеванием, и субъектов с повышенным риском развития заболевания по определению с помощью генетических или биохимических маркеров. Генетические маркеры повышенного риска развития PD включают мутации в генах альфа-синуклеина или паркина, UCHL1 и CYP2D6; в частности, мутации в положениях 30 и 53 гена альфа-синуклеина. Субъектов, страдающих в настоящее время болезнью Паркинсона, можно определять по их клиническим проявлениям, включая трепет покоя, мышечную тугоподвижность, брадикинезию и постуральную неустойчивость.

У бессимптомных пациентов лечение можно начинать в любом возрасте (например, в 10, 20, 30 лет). Однако, как правило, нет необходимости начинать лечение до достижения пациентами возраста 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение обычно включает многократный прием доз в течение некоторого периода времени. Лечение можно контролировать, анализируя антителенную реакцию или реакции активированных Т-клеток или В-клеток на терапевтический агент (например, процессыированную форму пептида альфа-синуклеина) во времени. Если реакция ослабевает, то показана бустерная доза.

В настоящем изобретении предусматриваются способы лечения или профилактики болезни телец Леви у пациента посредством введения композиций антитела в условиях, которые вызывают эффективную терапевтическую реакцию у пациента (например, уменьшение нейритных и/или аксональных агрегатов альфа-синуклеина, уменьшение нейритной дистрофии, улучшение когнитивной функции и/или реверсию, лечение или торможение снижения когнитивных способностей) у пациента. В некоторых способах области нейритной дистрофии в нейропиле неокортика и/или в подкорковых узлах можно уменьшить на 10, 20, 30, 40% или более по сравнению с контролем.

Обычно у пациентов, страдающих болезнью телец Леви или с повышенным риском развития болез-

ни телец Леви, наблюдаются когнитивные нарушения, прогрессирующее ухудшение когнитивной функции, морфологические изменения мозга и изменения цереброваскулярной функции. В настоящем изобретении предусматриваются способы торможения снижения когнитивных способностей у таких пациентов.

В настоящем изобретении предусматриваются также способы сохранения или повышения синаптической плотности и/или плотности дендритной структуры. Показатель изменений синаптической плотности или плотности дендритной структуры можно количественно определять с использованием маркеров образования синапса (синаптофизин) и/или дендритов (MAP2). В некоторых способах синаптическую плотность или плотность дендритной структуры можно восстановить до уровня синаптической плотности или плотности дендритной структуры у здорового человека. В некоторых способах уровень синаптической плотности или плотности дендритной структуры у пациента можно повысить на 5, 10, 15, 20, 25, 30% или более по сравнению с контролем.

VI. Фармацевтические композиции и способы терапии.

Для применения с целью профилактики антитело или его композицию вводят пациенту, подвергенному заболеванию, или, иначе, с повышенным риском развития заболевания, по схеме лечения (доза, частота и способ введения), эффективной для снижения риска, уменьшения тяжести или задержки появления по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В некоторых случаях профилактического применения схема (лечения) является эффективной для торможения или замедления аккумуляции альфа-синуклеина и процессированных фрагментов в головном мозге, и/или для ингибиования или замедления их токсического действия и/или для ингибирования или замедления развития расстройства поведения. При терапевтическом применении антитело вводят пациенту с подозрением на болезнь телец Леви, или уже страдающему деменцией с тельцами Леви, по схеме (доза, частота и способ введения), позволяющей эффективно уменьшать интенсивность или, по меньшей мере, ингибировать дальнейшее прогрессирование по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В некоторых случаях терапевтического применения схема позволяет эффективно снижать или, по меньшей мере, тормозить дальнейшее повышение уровней альфа-синуклеина и процессированных фрагментов, обусловленных ими токсичности и/или расстройства поведения.

Схема считается эффективной с терапевтической или профилактической точки зрения, если эта схема лечения позволяет отдельному пациенту достичь результата более благоприятного, чем средний результат в контрольной группе аналогичных пациентов, не пролеченных способами по изобретению, или если у пролеченных пациентов демонстрируются более благоприятные результаты по сравнению с контрольными пациентами в контролируемом клиническом испытании (например, фаза II, фаза II/III или фаза III испытаний) при уровне значимости $p < 0.05$ или 0.01 или даже 0.001.

Эффективные дозы варьируются в зависимости от множества различных факторов, включая способ введения, целевую область (введения), физиологическое состояние пациента, включая тип болезни телец Леви, от того, является ли пациент носителем АроE, является ли пациент человеком или животным, от других вводимых лекарственных средств и от того, является лечение профилактическим или терапевтическим.

Обычный интервал доз антител составляет от примерно 0.01 до 5 мг/кг, чаще от 0.1 до 3 мг/кг или 0.15-2 мг/кг или 0.15-1.5 мг/кг массы тела пациента. Такие дозы антитела можно вводить ежедневно, через день, раз в неделю, раз в две недели, раз в месяц, раз в три месяца или в соответствии с другой схемой, определяемой эмпирическим путем. Типичный вариант терапии включает введение многократных доз в течение продолжительного периода времени, например, по меньшей мере, в течение шести месяцев. Другие типичные схемы лечения включают введение один раз каждые две недели или один раз каждые 3-6 месяцев.

Антитела можно вводить в периферическую нервную систему (т.е. способом, при котором для достижения нужной области мозга вводимое или индуцируемое антитело проходит через гематоэнцефалический барьер). Способы введения включают местный, внутривенный, пероральный, подкожный, внутриартериальный, внутричерепной, интракальвальный (субарахноидальный), интраперитонеальный (внутрибрюшинный), интраназальный или внутримышечный. Важными способами являются внутривенный и подкожный способы введения антител. Инъекции чаще всего осуществляют в мышцы руки или ноги. Согласно некоторым методам инъекции антител вводят непосредственно в конкретную ткань, в которой скапливаются (аккумулируются) отложения, например, в виде внутричерепной (интракраниальной) инъекции.

Фармацевтические композиции для парентерального введения могут быть стерильными и, по существу, изотоническими и приготовленными в условиях GMP (надлежащей медицинской практики). Фармацевтические композиции могут предусматриваться в виде единичной дозированной лекарственной формы (т.е. в виде дозы для однократного введения). Фармацевтические композиции могут быть приготовлены с применением одного или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципIENTов или вспомогательных веществ. Состав зависит от выбранного способа введения. Для инъекции антитела можно приготовить в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически приемлемых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера, или в физиологическом растворе NaCl или в аце-

татном буфере (для уменьшения дискомфорта в месте инъекции). Раствор может содержать вспомогательные вещества, такие как супенсирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Или же антитела могут быть в лиофилизированном виде для восстановления перед употреблением подходящим носителем, например стерильной апирогенной водой.

Схемы по настоящему изобретению могут осуществляться в комбинации с другим агентом, эффективным для терапии или профилактики заболевания, подлежащего лечению. Например, при болезни Паркинсона в комбинации со схемами лечения по настоящему изобретению можно применять иммунотерапию против альфа-синуклеина (международная заявка WO/2008/103472), леводопу, агонисты дофамина, ингибиторы СОМТ, ингибиторы МАО-В, мидантан (амантадин) или холинолитические средства.

VII. Другие применения.

Описанные выше антитела можно применять для обнаружения альфа-синуклеина в процессе установления клинического диагноза, или лечения, или проведения исследования. Антитела могут также продаваться в качестве реагентов для лабораторных исследований, связанных с детекцией клеток, несущих альфа-синуклеин, и их реакций на различные раздражители. Для такого применения моноклональные антитела могут быть меченными с помощью флуоресцентных молекул, спин-меченых молекул, ферментов или радиоизотопов и могут предусматриваться в виде набора со всеми реагентами, необходимыми для проведения анализа на альфа-синуклеин. Антитела можно также применять для очистки альфа-синуклеина, например, аффинной хроматографией.

Антитела можно применять для обнаружения LBs у пациента. Такие способы применимы для установления или подтверждения диагноза PD или другого заболевания, ассоциированного с присутствием LBs в головном мозге, или предрасположенности к нему. Например, эти способы можно применять для (лечения) пациентов с симптомами деменции. Если у пациента имеются LBs, то пациент, по-видимому, страдает болезнью телец Леви, такой как болезнь Паркинсона. Эти способы можно также применять для бессимптомных пациентов. Присутствие телец Леви или других аномальных отложений альфа-синуклеина указывает на предрасположенность к заболеванию с проявлением симптомов в будущем. Эти способы применимы также для контроля за прогрессированием заболевания и/или за реакцией на лечение у пациентов, у которых ранее была диагностирована болезнь телец Леви.

Способы по изобретению можно осуществлять, вводя антитело, а затем детектируя антитело после его связывания. При необходимости очистки можно избежать, если использовать фрагмент антитела, не содержащий полноразмерной константной области, такой как Fab. Согласно некоторым способам одно и то же антитело может служить как в качестве терапевтического, так и в качестве диагностического агента.

Для диагностики (например, визуализации *in vivo*) антитела можно вводить пациенту с помощью внутривенной инъекции или непосредственно в головной мозг пациента с помощью интракраниальной инъекции или просверливания отверстия в черепе. Доза реагента должна быть в тех же интервалах, что и в способах терапии. Как правило, антитело является меченым, хотя в некоторых способах антитело не является меченым, и для связывания антитела применяется вторичный меченный агент. Выбор метки зависит от способа детекции. Например, флуоресцентная метка применима для оптического метода обнаружения. Парамагнитные метки пригодны для томографического метода обнаружения без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки можно также обнаруживать методами PET (ПЭТ, позитронной эмиссионной томографии) или SPECT (ОФЭКТ, однофотонной эмиссионной компьютерной томографии).

Диагностику проводят, сравнивая число, размер и/или интенсивность меченых локусов с соответствующими фоновыми величинами (базовыми, исходными величинами). Фоновые (исходные) величины могут представлять собой средние уровни в популяции не страдающих болезнью субъектов. Фоновые (исходные) величины могут также представлять собой предыдущие уровни у того же самого пациента. Например, фоновые величины можно определять у пациента перед началом лечения, а затем полученные значения можно сравнивать с фоновыми значениями. Уменьшение величины по сравнению с фоном говорит о положительном отклике на лечение.

Антитела можно применять для получения антидиотипических антител, (см., например, Greenspan & Bona, FASEB J. 7(5): 437-444, 1989 и Nissinoff, J. Immunol. 147:2429-2438, 1991). Такие антидиотипические антитела можно применять в исследованиях по фармакокинетике, фармакодинамике, биораспределению, а также в исследованиях клинических реакций "антитела человека к человеческим антителам" (НАА) у субъектов, получавших антитела. Например, антидиотипические антитела специфически связывают вариабельную область гуманизированных антител 5C1 и поэтому могут применяться для обнаружения гуманизированных антител 5C1 в фармакокинетических исследованиях и способствовать количественному определению антител человека к человеческим антителам (НАА) у пролеченных субъектов.

VIII. Наборы.

Также в изобретении предусматриваются наборы, включающие антитело, специфическое к альфа-синуклеину, и инструкции по применению. Такие наборы можно применять, например, для осуществления диагностических способов, описанных выше. Набор может также включать метку. Также набор

обычно содержит информацию с указаниями по пользованию набором. Информация может включать также диаграмму или другую соответствующую схему, в которой устанавливается взаимосвязь между уровнями определяемой метки и уровнями антител к альфа-синуклеину. Термин "информация" относится к любому написанному или задокументированному материалу, который прикреплен, или иным образом прилагается к набору во время его изготовления, транспортировки, продажи или применения. Например, термин "информация" включает рекламные листки и брошюры, упаковочные материалы, инструкции, аудио- и видеокассеты, а также текст, напечатанный непосредственно на наборах.

В изобретении предусматриваются также диагностические наборы для осуществления визуализации *in vivo*. Обычно такие наборы содержат антитело, связывающееся с эпигопом альфа-синуклеина, описанным в настоящей заявке. Антитело может быть меченным, или в набор входит вторичный меченный реагент. Набор может включать инструкции по осуществлению *in vivo* визуализации.

Все заявки на патент, интернет-сайты, другие публикации, регистрационные номера в коллекциях и т. п., процитированные выше и ниже, включены в данную заявку полностью для всех целей посредством отсылок в той степени, как если бы каждая отдельная публикация была конкретно и в отдельности указана для такого включения. Если различные версии последовательности связаны с номерами регистрации в разное время, подразумевается такая версия, которая относится к номеру регистрации на действительную дату подачи этой заявки. Действительная дата подачи заявки означает более раннюю дату подачи или дату подачи приоритетной заявки, относящуюся к регистрационному номеру. Точно так же, если разные версии публикации, Интернет-сайта или т. п. опубликованы в разное время, подразумевается самая последняя опубликованная версия на действительную дату подачи заявки, если не указано иное. Любые признак, стадия, элемент, вариант или аспект изобретения могут быть использованы в комбинации с любыми другими, если не указано иное. Хотя данное изобретение было описано подробно для иллюстрации и примера для ясности и понимания, очевидно, что в объеме формулы изобретения могут быть осуществлены некоторые изменения и модификации

Примеры

Пример 1. Выделение мышиного 5C1.

Мышиное антитело 5C1 получали, инъецируя мышам пептидный коньюгат, содержащий пептидный иммуноген VDPDNEAYEGGC (SEQ ID NO: 14), связанный с овечьим антителом к мышенному иммуноглобулину. Пептид, который включает остатки 118-126 альфа-синуклеина (α -syn), слитые с С-концевым GGC пептидом, соединяли с овечьим антителом к мышенному иммуноглобулину через малеинидный линкер, связанный с С-концевым цистeinовым остатком.

Пример 2. Пассивная иммунизация с помощью антител к альфа-синуклеину.

С целью проверки эффекта антител к альфа-синуклеину на животной модели болезни телец Леви применяли различные антитела к альфа-синуклеину для пассивной иммунизации мышей. В эксперименте участвовали самки 3-4-месячных мышей дикого типа, мышей, нокаутных по гену альфа-синуклеина, и мышей, трансгенных по альфа-синуклеину (линия 61) (n=14/группа). Тестированные антитела включали 9E4 (IgG1, эпипот: аминокислоты 118-126 альфа-синуклеина); 5C1 (IgG1, иммуноген: аминокислоты 118-126 альфа-альфа-синуклеина, цис-линкер); 5D12 (IgG2, иммуноген: аминокислоты 118-126 альфа-синуклеина, п-линкер); 1H7 (IgG1, эпипот: аминокислоты 91-99 альфа-синуклеина) и 27-1 (IgG1 контрольное антитело).

Мыши получали дозу антитела 10 мг/кг в течение 5 месяцев, всего 21 инъекцию. Кроме того, животным делали инъекции лентивируса (LV), экспрессирующего человеческий альфа-синуклеин (дикого типа, wt), посредством одностороннего введения человеческого альфа-синуклеина (wt) в гиппокамп.

В эксперименте участвовали антитела к альфа-синуклеину от компании Chemicon (эпипот: полноразмерный альфа-синуклеин), компании Millipore (эпипот: полноразмерный альфа-синуклеин) и ELADW 105 (эпипот: аминокислоты 121-124 альфа-синуклеина, предпочтительно с альфа-синуклеином, процесированном по остаткам 122-124).

Конечные критерии оценки.

Титры антител проверяли перед окончанием эксперимента. Поведение оценивали с использованием теста водного лабиринта Морриса (MWM) и тестов с горизонтальными перекладинами с круглым сечением (ходжение по балке). В teste с круглыми перекладинами (round beam test) оценивается равновесие при движении (моторное равновесие), координация и походка с использованием двух перекладин разного диаметра. Перекладина А (тренировочная балка, перекладина) больше в диаметре, поэтому по ней легче ходить. Перекладина D (балка для испытаний) меньше в диаметре, следовательно, по ней труднее ходить. Тест водного лабиринта проводили на 10 неделе и непосредственно перед окончанием эксперимента. По окончании эксперимента мышей умерщвляли и определяли неврологические показатели для агрегации альфа-синуклеина, синаптофизина и MAP2. Также были получены биохимические характеристики для альфа-синуклеина, PSD95 синаптофизина. Также было осуществлено введение нескольких меток и меток для конфокальной микроскопии с использованием синаптических, нейрональных и глиальных маркеров.

Результаты.

Полученные результаты показали, что все антитела, за исключением 5D12, вызывали заметное

снижение аккумуляции α -syn и сохранение плотности синапсов и плотности дендритной структуры, а также давали положительный результат в тесте MWM. Антитело 9E4 проявляло активность в испытаниях как *in vitro*, так и *in vivo*, а также в поведенческих тестах. В частности, данные показывают, что антитела к альфа-синуклеину могут уменьшить нейритные/аксональные агрегаты альфа-синуклеина.

Результаты поведенческих тестов.

Антитела 5C1 и 9E4 улучшали результаты теста водного лабиринта у трансгенных по альфа-синуклеину мышей, как и 1H7, хотя и в меньшей степени; см. фиг. 3. Напротив, антитело 5D12 не улучшало результаты теста водного лабиринта у трансгенных по альфа-синуклеину мышей. Что касается теста с горизонтальными круглыми перекладинами (балками), то антитела 9E4 и 1H7 улучшали выполнение тестов как по скорости, так и по числу ошибок, тогда как антитела 5D12 и 5C1 не улучшали выполнения; см. фиг. 4. Данные представлены на фиг. 4 как число смещений (сползаний)/10 см (т.е. "ошибки") и отношение пройденного расстояния, деленное на время, потраченное на прохождение этого расстояния (т.е. "скорость", измеряемая в единицах 10 см/с).

Результаты неврологических измерений.

Антитела 5C1, 9E4 и 1H7 снижали ELADW-105 позитивную дистрофию аксонов (нейритов), тогда как антитело 5D12 не снижало. У мышей, трансгенных по альфа-синуклеину, антитело 9E4 снижало область нейтрофилла на 43% в новой коре (неокортексе) и на 40% в подкорковых (базальных) ядрах по сравнению с контрольными мышами (т.е. мышами, получавшими 27-1 IgG1 контрольное антитело). Антитело 9E4 также сохраняло окрашивание на синаптофизин и MAP2 в новой коре и в подкорковых ядрах.

Пример 3. Секвенирование вариабельных доменов 5C1.

мРНК выделяли из и очищали от клеточного осадка 5C1 гибридомных клеток, используя набор для выделения мРНК QIAGEN® OLIGOTEX® mRNA kit. Затем очищенную мРНК транскрибировали в кДНК, используя антисмысловой праймер олиго dT и набор INVITROGEN® SUPERSCRIPT® II kit. Нуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей 5C1, амплифицировали при использовании кДНК методом ПЦР, применяя вырожденные праймеры для VH и VL смысловых цепей и ген-специфический (CH/CL) праймер для антисмыловой цепи. Продукты ПЦР, которые были выполнены с целью включать последовательность сигнального пептида, вариабельный домен и константный домен (вплоть до праймера антисмыловой цепи), очищали выделением из геля, клонировали в вектор по тупым концам или в TA вектор, а затем секвенировали. Последовательности устанавливали на основании анализа по меньшей мере 3 независимых клонов, имеющих открытую рамку считывания, начиная с метионина и через вариабельную область в константной области.

Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи 5C1, имеет последовательность SEQ ID NO: 5. Последовательность соответствующего белка (фиг. 1), которая включает последовательность сигнального пептида в положениях 1-19 (подчеркнута), представлена ниже

```
MERHWIFLFLLSVTGGVHSQVQLQQSGAELAKPGTSVQMSCKASGYTFNTNYWMNWIKARPGQQ
LEWIGATNPNNNGYTDYNQRFKDKAILTADKSSNTAYMHLSLTSEDSAVYFCASGGHLAYWGQGTVVTV
SA (SEQ ID NO: 6)
```

Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область легкой цепи 5C1, имеет последовательность SEQ ID NO: 7. Последовательность соответствующего белка (фиг. 2), которая включает последовательность сигнального пептида в положениях 1-19 (подчеркнута), представлена ниже

```
MKLIPVRLYLMEWIPASSSDVYMTQIPLYSVSPGDQASISCRSSQSLFHSKGNTYLNHWYLQKPGQ
SPKLLINRVSNRFGVPDRFSGSGSTDFTLKISGVAEIDLGVYFCQSAAHVPWTGGGTKEIR (SEQ ID
NO: 8)
```

Аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи антитела 5C1 (SEQ ID NO: 9) представлена в табл. 1 (см. ниже), а соответствующая аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи антитела 5C1 (SEQ ID NO: 24) показана в табл. 2 (см. ниже). Везде используется нумерация по Kabat.

Пример 4. Гуманизация мышного 5C1.

Анализ участков CDR области Vh 3H6 выявил участок CDR-H1, содержащий 5 остатков (SEQ ID NO: 10), участок CDR-H2, содержащий 17 остатков (SEQ ID NO: 11), и участок CDR-H3, содержащий 6 остатков (SEQ ID NO: 12). Аналогичный анализ CDRs области Vk 3H6 выявил участок CDR-L1, содержащий 16 остатков (SEQ ID NO: 25), участок CDR-L2, содержащий 7 остатков (SEQ ID NO: 26), и участок CDR-L3, содержащий 9 остатков (SEQ ID NO: 27).

Анализ остатков в области контакта между участками Vk и Vh 5C1 показал, что большинство остатков представляют собой остатки, которые обычно находятся в этой области.

Поиск в основной базе данных белковых последовательностей NCBI позволил отобрать подходящие человеческие каркасные области, к которым следует привить CDRs мышного антитела 5C1. Для Vk была выбрана человеческая легкая цепь каппа, код доступа в NCBI CAB51293.1 (GI:5578786; SEQ ID NO: 28). Для Vh была выбрана тяжелая цепь человеческого Ig AAY42876.1 (GL66096557; SEQ ID NO: 13).

Дизайн типичных гуманизированных Vh и Vk областей с обратными мутациями на основе выбранных человеческих каркасных областей показан в табл. 1 и 2 соответственно.

Дизайн типичных гуманизированных Vh областей.

Было создано пять различных гуманизированных вариантов области Vh 5C1, H1, H2, H3, H4 и H5. При отборе обратных мутаций в конечном счете особое внимание было обращено на остатки H1 1, H27, H30, H48, H67, H69, H73, H91 и H94. В каждой из конструкций гуманизированной области Vh наблюдалась обратная мутация остатков H11, H27, H30, H48 и H73 в остатки L, Y, T, I и K соответственно, так как остатки образовывали часть CDR-H1 согласно определению Chothia (H27 и H30), или соответствующие остатки в человеческой каркасной последовательности представляют собой редко встречающиеся остатки (V в положении H11, M в положении H48 и E в положении H73). Для варианта H1 (SEQ ID NO: 14) осуществляли обратную мутацию дополнительных остатков H67 и H69 (в A и L соответственно), чтобы сохранить, фиксировать упаковку участка CDR. В варианте H2 (SEQ ID NO: 15) не осуществляли никаких дополнительных обратных мутаций (т.е. обратные мутации в положениях H67 и H69 в варианте H1 были исключены). В варианте H3 (SEQ ID NO: 16) осуществлялись дополнительные обратные мутации остатков H67, H69, H91 и H94 (в A, L, F и S соответственно). Обратные мутации H67, H69 и H94 осуществляли с целью сохранить упаковку участка CDR, тогда как обратная мутация H91 остатка в области контакта Vh/Vk, проводилась с целью проверить его воздействие на интерфейс (область контакта). В варианте H4 (SEQ ID NO: 17) осуществлялась обратная мутация дополнительных остатков H67, H69 и H94 (в A, L и S соответственно). Следовательно, вариант H4 отличается от H3 тем, что обратная мутация в H91 отменяется. В варианте H5 (SEQ ID NO: 18) обратная мутация остатка H94 (в S) также осуществлялась с целью сохранить упаковку участка CDR.

Таблица 1

Гуманизированные области Vh 5C1

| Kabat # | Порядковый # | FR или CDR | Минимальный 5C1 (SEQ ID NO: 9) | Hu VH Акцептор FR (SEQ ID NO: 13) | 5C1 H1 (SEQ ID NO: 14) | 5C1 H2 (SEQ ID NO: 15) | 5C1 H3 (SEQ ID NO: 16) | 5C1 H4 (SEQ ID NO: 17) | 5C1 H5 (SEQ ID NO: 18) |
|---------|--------------|------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | | Acc#AAY 42876.1 | | | | | |
| 1 | 1 | Fr1 | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q |
| 2 | 2 | Fr1 | V | V | V | V | V | V | V |
| 3 | 3 | Fr1 | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q |
| 4 | 4 | Fr1 | L | L | L | L | L | L | L |
| 5 | 5 | Fr1 | Q | V | V | V | V | V | V |
| 6 | 6 | Fr1 | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q |
| 7 | 7 | Fr1 | S | S | S | S | S | S | S |
| 8 | 8 | Fr1 | G | G | G | G | G | G | G |
| 9 | 9 | Fr1 | A | A | A | A | A | A | A |
| 10 | 10 | Fr1 | E | E | E | E | E | E | E |
| 11 | 11 | Fr1 | L | V | L | L | L | L | L |
| 12 | 12 | Fr1 | A | K | K | K | K | K | K |
| 13 | 13 | Fr1 | K | K | K | K | K | K | K |
| 14 | 14 | Fr1 | P | P | P | P | P | P | P |
| 15 | 15 | Fr1 | G | G | G | G | G | G | G |
| 16 | 16 | Fr1 | T | S | S | S | S | S | S |
| 17 | 17 | Fr1 | S | S | S | S | S | S | S |
| 18 | 18 | Fr1 | V | V | V | V | V | V | V |
| 19 | 19 | Fr1 | Q | K | K | K | K | K | K |
| 20 | 20 | Fr1 | M | V | V | V | V | V | V |
| 21 | 21 | Fr1 | S | S | S | S | S | S | S |
| 22 | 22 | Fr1 | C | C | C | C | C | C | C |
| 23 | 23 | Fr1 | K | K | K | K | K | K | K |
| 24 | 24 | Fr1 | A | A | A | A | A | A | A |
| 25 | 25 | Fr1 | S | S | S | S | S | S | S |

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|--------|---|---|---|---|---|---|---|
| 26 | 26 | Fr1 | G | G | G | G | G | G | G |
| 27 | 27 | Fr1 | Y | G | Y | Y | Y | Y | Y |
| 28 | 28 | Fr1 | T | T | T | T | T | T | T |
| 29 | 29 | Fr1 | F | F | F | F | F | F | F |
| 30 | 30 | Fr1 | T | N | T | T | T | T | T |
| 31 | 31 | CDR-H1 | N | N | N | N | N | N | N |
| | | CDR-H1 | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| 32 | 32 | CDR-H1 | W | A | W | W | W | W | W |
| | | CDR-H1 | M | I | M | M | M | M | M |
| 34 | 34 | CDR-H1 | N | N | N | N | N | N | N |
| | | CDR-H1 | - | - | - | - | - | - | - |
| 35A | 35B | CDR-H1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | | CDR-H1 | - | - | - | - | - | - | - |
| 36 | 36 | Fr2 | W | W | W | W | W | W | W |
| 37 | 37 | Fr2 | I | V | V | V | V | V | V |
| 38 | 38 | Fr2 | K | R | R | R | R | R | R |
| 39 | 39 | Fr2 | A | Q | Q | Q | Q | Q | Q |
| 40 | 40 | Fr2 | R | A | A | A | A | A | A |
| 41 | 41 | Fr2 | P | P | P | P | P | P | P |
| 42 | 42 | Fr2 | G | G | G | G | G | G | G |
| 43 | 43 | Fr2 | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q |
| 44 | 44 | Fr2 | G | G | G | G | G | G | G |
| 45 | 45 | Fr2 | L | L | L | L | L | L | L |
| 46 | 46 | Fr2 | E | E | E | E | E | E | E |
| 47 | 47 | Fr2 | W | W | W | W | W | W | W |
| 48 | 48 | Fr2 | I | M | I | I | I | I | I |
| 49 | 49 | Fr2 | G | G | G | G | G | G | G |
| 50 | 50 | CDR-H2 | A | G | A | A | A | A | A |
| | | CDR-H2 | T | I | T | T | T | T | T |
| 51 | 51 | CDR-H2 | N | I | N | N | N | N | N |
| | | CDR-H2 | P | P | P | P | P | P | P |
| 52B | 52C | CDR-H2 | - | - | - | - | - | - | - |
| | | CDR-H2 | - | - | - | - | - | - | - |
| 53 | 54 | CDR-H2 | N | I | N | N | N | N | N |

| 54 | 55 | CDR-H2 | N | F | N | N | N | N | N |
|-----|----|--------|---|---|---|---|---|---|---|
| 55 | 56 | CDR-H2 | G | G | G | G | G | G | G |
| 56 | 57 | CDR-H2 | Y | T | Y | Y | Y | Y | Y |
| 57 | 58 | CDR-H2 | T | T | T | T | T | T | T |
| 58 | 59 | CDR-H2 | D | T | D | D | D | D | D |
| 59 | 60 | CDR-H2 | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| 60 | 61 | CDR-H2 | N | A | N | N | N | N | N |
| 61 | 62 | CDR-H2 | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q |
| 62 | 63 | CDR-H2 | R | K | R | R | R | R | R |
| 63 | 64 | CDR-H2 | F | F | F | F | F | F | F |
| 64 | 65 | CDR-H2 | K | Q | K | K | K | K | K |
| 65 | 66 | CDR-H2 | D | G | D | D | D | D | D |
| 66 | 67 | Fr3 | K | R | R | R | R | R | R |
| 67 | 68 | Fr3 | A | V | A | V | A | A | V |
| 68 | 69 | Fr3 | I | T | T | T | T | T | T |
| 69 | 70 | Fr3 | L | I | L | I | L | L | I |
| 70 | 71 | Fr3 | T | T | T | T | T | T | T |
| 71 | 72 | Fr3 | A | A | A | A | A | A | A |
| 72 | 73 | Fr3 | D | D | D | D | D | D | D |
| 73 | 74 | Fr3 | K | E | K | K | K | K | K |
| 74 | 75 | Fr3 | S | S | S | S | S | S | S |
| 75 | 76 | Fr3 | S | T | T | T | T | T | T |
| 76 | 77 | Fr3 | N | N | N | N | N | N | N |
| 77 | 78 | Fr3 | T | T | T | T | T | T | T |
| 78 | 79 | Fr3 | A | A | A | A | A | A | A |
| 79 | 80 | Fr3 | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| 80 | 81 | Fr3 | M | M | M | M | M | M | M |
| 81 | 82 | Fr3 | H | E | E | E | E | E | E |
| 82 | 83 | Fr3 | L | L | L | L | L | L | L |
| 82A | 84 | Fr3 | S | S | S | S | S | S | S |
| 82B | 85 | Fr3 | S | S | S | S | S | S | S |
| 82C | 86 | Fr3 | L | L | L | L | L | L | L |
| 83 | 87 | Fr3 | T | R | R | R | R | R | R |
| 84 | 88 | Fr3 | S | S | S | S | S | S | S |

| | | | | | | | | | |
|------|-----|--------|---|---|---|---|---|---|---|
| 85 | 89 | Fr3 | E | E | E | E | E | E | E |
| 86 | 90 | Fr3 | D | D | D | D | D | D | D |
| 87 | 91 | Fr3 | S | T | T | T | T | T | T |
| 88 | 92 | Fr3 | A | A | A | A | A | A | A |
| 89 | 93 | Fr3 | V | V | V | V | V | V | V |
| 90 | 94 | Fr3 | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| 91 | 95 | Fr3 | F | Y | Y | F | Y | Y | Y |
| 92 | 96 | Fr3 | C | C | C | C | C | C | C |
| 93 | 97 | Fr3 | A | A | A | A | A | A | A |
| 94 | 98 | Fr3 | S | R | R | R | S | S | S |
| 95 | 99 | CDR-H3 | G | E | G | G | G | G | G |
| 96 | 100 | CDR-H3 | G | G | G | G | G | G | G |
| 97 | 101 | CDR-H3 | H | N | H | H | H | H | H |
| 98 | | CDR-H3 | - | L | - | - | - | - | - |
| 99 | | CDR-H3 | - | N | - | - | - | - | - |
| 100 | | CDR-H3 | - | W | - | - | - | - | - |
| 100A | 102 | CDR-H3 | L | L | L | L | L | L | L |
| 100B | | CDR-H3 | - | - | - | - | - | - | - |
| 100C | | CDR-H3 | - | - | - | - | - | - | - |
| 100D | | CDR-H3 | - | - | - | - | - | - | - |
| 100E | | CDR-H3 | - | - | - | - | - | - | - |
| 100F | | CDR-H3 | - | - | - | - | - | - | - |
| 100G | | CDR-H3 | - | - | - | - | - | - | - |
| 100H | | CDR-H3 | - | - | - | - | - | - | - |
| 100I | | CDR-H3 | - | - | - | - | - | - | - |
| 100J | | CDR-H3 | - | - | - | - | - | - | - |
| 100K | | CDR-H3 | - | - | - | - | - | - | - |
| 101 | 103 | CDR-H3 | A | D | A | A | A | A | A |
| 102 | 104 | CDR-H3 | Y | P | Y | Y | Y | Y | Y |
| 103 | 105 | Fr4 | W | W | W | W | W | W | W |
| 104 | 106 | Fr4 | G | G | G | G | G | G | G |
| 105 | 107 | Fr4 | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q |
| 106 | 108 | Fr4 | G | G | G | G | G | G | G |
| 107 | 109 | Fr4 | T | T | T | T | T | T | T |
| 108 | 110 | Fr4 | V | L | L | L | L | L | L |
| 109 | 111 | Fr4 | V | V | V | V | V | V | V |
| 110 | 112 | Fr4 | T | T | T | T | T | T | T |
| 111 | 113 | Fr4 | V | V | V | V | V | V | V |
| 112 | 114 | Fr4 | S | S | S | S | S | S | S |
| 113 | 115 | Fr4 | A | S | S | S | S | S | S |

Примеры нуклеотидных последовательностей, кодирующих 5C1 H1, H2, H3, H4 и H5, представлены в SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22 и 23 соответственно.

Дизайн типичных гуманизированных Vk областей.

Было создано четыре различных гуманизированных варианта области Vk 5C1, L1, L2, L3 и L4. При отборе обратных мутаций в конечном счете особое внимание было обращено на остатки L2, L12, L14, L45, L49 и L87. В каждой из конструкций гуманизированной области Vk наблюдалась обратная мутация остатков L12 и L14 в S, потому что соответствующие остатки в человеческой каркасной последовательности (P и T соответственно) являются редко встречающимися остатками. Для варианта L1 (SEQ ID NO: 29) осуществляли обратную мутацию дополнительных остатков L2, L45, L49 и L87 (в V, K, N и F соответственно). L2 является каноническим/CDR-взаимодействующим остатком; L45 осуществляет переход полярности/заряда с мышиных на человеческие каркасные последовательности (K в Q) и, следовательно, может влиять на фолдинг; L49 представляет собой остаток из зоны Верньера и L87 представляет собой остаток в области контакта Vh/Vk. В варианте L2 (SEQ ID NO: 30) наблюдалась обратная мутация дополнительного остатка L45 в K. Таким образом, по сравнению с L1 были исключены обратные мутации в остатках L2, L49 и L87. В варианте L3 (SEQ ID NO: 31) обратные мутации осуществляли в остатках L2, L45 и L87 (в V, N и F соответственно). Следовательно, по сравнению с L1, исключалась обратная мутация в остатке L45. В варианте L4 (SEQ ID NO: 32) не осуществлялось никаких обратных мутаций дополнительных остатков (т.е. осуществлялись только обратные мутации остатков L12 и L14).

Таблица 2
Гуманизированные 5C1 Vk области

| Kabat # | Порядковый # | FR или CDR | Мышиный 5C1 VL (SEQ ID NO: 24) | Hu Vk Акцептор Fr (SEQ ID NO: 28) | 5C1 L1 (SEQ ID NO: 29) | 5C1 L2 (SEQ ID NO: 30) | 5C1 L3 (SEQ ID NO: 31) | 5C1 L4 (SEQ ID NO: 32) |
|---------|--------------|------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | | Acc# CAB51293.1 | | | | |
| 1 | 1 | Fr1 | D | D | D | D | D | D |
| 2 | 2 | Fr1 | V | I | V | I | V | I |
| 3 | 3 | Fr1 | V | V | V | V | V | V |
| 4 | 4 | Fr1 | M | M | M | M | M | M |
| 5 | 5 | Fr1 | T | T | T | T | T | T |
| 6 | 6 | Fr1 | Q | Q | Q | Q | Q | Q |
| 7 | 7 | Fr1 | I | S | S | S | S | S |
| 8 | 8 | Fr1 | P | P | P | P | P | P |
| 9 | 9 | Fr1 | L | L | L | L | L | L |
| 10 | 10 | Fr1 | Y | S | S | S | S | S |
| 11 | 11 | Fr1 | L | L | L | L | L | L |
| 12 | 12 | Fr1 | S | P | S | S | S | S |
| 13 | 13 | Fr1 | V | V | V | V | V | V |
| 14 | 14 | Fr1 | S | T | S | S | S | S |
| 15 | 15 | Fr1 | P | P | P | P | P | P |
| 16 | 16 | Fr1 | G | G | G | G | G | G |
| 17 | 17 | Fr1 | D | E | E | E | E | E |
| 18 | 18 | Fr1 | Q | P | P | P | P | P |
| 19 | 19 | Fr1 | A | A | A | A | A | A |
| 20 | 20 | Fr1 | S | S | S | S | S | S |
| 21 | 21 | Fr1 | I | I | I | I | I | I |
| 22 | 22 | Fr1 | S | S | S | S | S | S |
| 23 | 23 | Fr1 | C | C | C | C | C | C |
| 24 | 24 | CDR-L1 | R | R | R | R | R | R |
| 25 | 25 | CDR-L1 | S | S | S | S | S | S |
| 26 | 26 | CDR-L1 | S | S | S | S | S | S |
| 27 | 27 | CDR-L1 | Q | Q | Q | Q | Q | Q |
| 27A | 28 | CDR-L1 | S | S | S | S | S | S |
| 27B | 29 | CDR-L1 | L | L | L | L | L | L |
| 27C | 30 | CDR-L1 | F | L | F | F | F | F |
| 27D | 31 | CDR-L1 | H | H | H | H | H | H |

| | | | | | | | | |
|-----|----|--------|---|---|---|---|---|---|
| 27E | 32 | CDR-L1 | S | S | S | S | S | S |
| 27F | | CDR-L1 | - | - | - | - | - | - |
| 28 | 33 | CDR-L1 | K | N | K | K | K | K |
| 29 | 34 | CDR-L1 | G | G | G | G | G | G |
| 30 | 35 | CDR-L1 | N | Y | N | N | N | N |
| 31 | 36 | CDR-L1 | T | N | T | T | T | T |
| 32 | 37 | CDR-L1 | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| 33 | 38 | CDR-L1 | L | L | L | L | L | L |
| 34 | 39 | CDR-L1 | H | D | H | H | H | H |
| 35 | 40 | Fr2 | W | W | W | W | W | W |
| 36 | 41 | Fr2 | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| 37 | 42 | Fr2 | L | L | L | L | L | L |
| 38 | 43 | Fr2 | Q | Q | Q | Q | Q | Q |
| 39 | 44 | Fr2 | K | K | K | K | K | K |
| 40 | 45 | Fr2 | P | P | P | P | P | P |
| 41 | 46 | Fr2 | G | G | G | G | G | G |
| 42 | 47 | Fr2 | Q | Q | Q | Q | Q | Q |
| 43 | 48 | Fr2 | S | S | S | S | S | S |
| 44 | 49 | Fr2 | P | P | P | P | P | P |
| 45 | 50 | Fr2 | K | Q | K | K | Q | Q |
| 46 | 51 | Fr2 | L | L | L | L | L | L |
| 47 | 52 | Fr2 | L | L | L | L | L | L |
| 48 | 53 | Fr2 | I | I | I | I | I | I |
| 49 | 54 | Fr2 | N | Y | N | Y | N | Y |
| 50 | 55 | CDR-L2 | R | L | R | R | R | R |
| 51 | 56 | CDR-L2 | V | G | V | V | V | V |
| 52 | 57 | CDR-L2 | S | S | S | S | S | S |
| 53 | 58 | CDR-L2 | N | N | N | N | N | N |
| 54 | 59 | CDR-L2 | R | R | R | R | R | R |

| 55 | 60 | CDR-L2 | F | A | F | F | F | F |
|----|----|--------|---|---|---|---|---|---|
| 56 | 61 | CDR-L2 | S | S | S | S | S | S |
| 57 | 62 | Fr3 | G | G | G | G | G | G |
| 58 | 63 | Fr3 | V | V | V | V | V | V |
| 59 | 64 | Fr3 | P | P | P | P | P | P |
| 60 | 65 | Fr3 | D | D | D | D | D | D |
| 61 | 66 | Fr3 | R | R | R | R | R | R |
| 62 | 67 | Fr3 | F | F | F | F | F | F |
| 63 | 68 | Fr3 | S | S | S | S | S | S |
| 64 | 69 | Fr3 | G | G | G | G | G | G |
| 65 | 70 | Fr3 | S | S | S | S | S | S |
| 66 | 71 | Fr3 | G | G | G | G | G | G |
| 67 | 72 | Fr3 | S | S | S | S | S | S |
| 68 | 73 | Fr3 | G | G | G | G | G | G |
| 69 | 74 | Fr3 | T | T | T | T | T | T |
| 70 | 75 | Fr3 | D | D | D | D | D | D |
| 71 | 76 | Fr3 | F | F | F | F | F | F |
| 72 | 77 | Fr3 | T | T | T | T | T | T |
| 73 | 78 | Fr3 | L | L | L | L | L | L |
| 74 | 79 | Fr3 | K | K | K | K | K | K |
| 75 | 80 | Fr3 | I | I | I | I | I | I |
| 76 | 81 | Fr3 | S | S | S | S | S | S |
| 77 | 82 | Fr3 | G | R | R | R | R | R |
| 78 | 83 | Fr3 | V | V | V | V | V | V |
| 79 | 84 | Fr3 | E | E | E | E | E | E |
| 80 | 85 | Fr3 | A | A | A | A | A | A |
| 81 | 86 | Fr3 | E | E | E | E | E | E |
| 82 | 87 | Fr3 | D | D | D | D | D | D |
| 83 | 88 | Fr3 | L | V | V | V | V | V |
| 84 | 89 | Fr3 | G | G | G | G | G | G |
| 85 | 90 | Fr3 | V | V | V | V | V | V |
| 86 | 91 | Fr3 | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| 87 | 92 | Fr3 | F | Y | F | Y | F | Y |
| 88 | 93 | Fr3 | C | C | C | C | C | C |
| 89 | 94 | CDR-L3 | S | M | S | S | S | S |
| 90 | 95 | CDR-L3 | Q | Q | Q | Q | Q | Q |

| | | | | | | | | |
|------|-----|--------|---|---|---|---|---|---|
| 91 | 96 | CDR-L3 | S | A | S | S | S | S |
| 92 | 97 | CDR-L3 | A | L | A | A | A | A |
| 93 | 98 | CDR-L3 | H | Q | H | H | H | H |
| 94 | 99 | CDR-L3 | V | T | V | V | V | V |
| 95 | 100 | CDR-L3 | P | P | P | P | P | P |
| 95A | | CDR-L3 | - | - | - | - | - | - |
| 95B | | CDR-L3 | - | - | - | - | - | - |
| 95C | | CDR-L3 | - | - | - | - | - | - |
| 95D | | CDR-L3 | - | - | - | - | - | - |
| 95E | | CDR-L3 | - | - | - | - | - | - |
| 95F | | CDR-L3 | - | - | - | - | - | - |
| 96 | 101 | CDR-L3 | W | P | W | W | W | W |
| 97 | 102 | CDR-L3 | T | T | T | T | T | T |
| 98 | 103 | Fr4 | F | F | F | F | F | F |
| 99 | 104 | Fr4 | G | G | G | G | G | G |
| 100 | 105 | Fr4 | G | G | G | G | G | G |
| 101 | 106 | Fr4 | G | G | G | G | G | G |
| 102 | 107 | Fr4 | T | T | T | T | T | T |
| 103 | 108 | Fr4 | K | K | K | K | K | K |
| 104 | 109 | Fr4 | L | V | V | V | V | V |
| 105 | 110 | Fr4 | E | E | E | E | E | E |
| 106 | 111 | Fr4 | I | I | I | I | I | I |
| 106A | | Fr4 | - | - | - | - | - | - |
| 107 | 112 | Fr4 | R | K | K | K | K | K |

Примеры нуклеотидных последовательностей, кодирующих гуманизированные 5C1 L1, L2, L3 и L4, представлены в SEQ ID NOs: 33, 34, 35 и 36 соответственно.

Пример 5. Аффинность гуманизированных антител 5C1 к альфа-синуклеину.

Аффинность различных комбинаций белков гуманизированных тяжелых цепей и гуманизированных легких цепей антитела 5C1 к альфа-синуклеину анализировали методом ELISA. Как показано на фиг. 5, вариант H1L1 гуманизированного антитела 5C1 не проявлял аффинности к альфа-синуклеину в условиях анализа. Напротив, химерное антитело 5C1 обладало повышенной аффинностью к альфа-синуклеину по сравнению с мышьяным антителом 5C1. Действие гуманизированных вариантов H3L4, H4L3 и химерного варианта H + L3 было сравнимым с действием и почти таким же, как действие химерного антитела 5C1. Действие гуманизированных вариантов H3L3 и H3L1 было сравнимым, хотя с немногим меньшей аффинностью, чем аффинность H3L4, H4L3 и химерного H + L3.

Различные варианты гуманизированного антитела 5C1 анализировали также с использованием биосенсора Biacore для более точного определения аффинности связывания. Сенсорный чип CM5 (BIAcore) с антителом к человеческому IgG получали в соответствии с протоколом, поставляемым GE Healthcare. Каждый вариант гуманизированного антитела 5C1 независимо улавливался (захватывался) до уровня, при котором R_{max} не превышал 50, по уравнению $R_{max} = (RU \text{ захваченного антитела}) \cdot (MW \text{ синуклеина}) / (MW \text{ захваченного антитела}) \cdot 2$.

Фактор 2 в знаменателе означает число сайтов связывания в молекуле антитела. Альфа-синуклеин омывал чип в концентрации, варьирующейся от $\sim 10X$ превышающей расчетную KD до $\sim 10X$ ниже расчетной KD. Данные объединяли и вычитали двойное стандартное (эталонное) значение, соответствующее дрейфу (отклонению) показаний и количественно небольшому неспецифическому связыванию. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения BIAcore для оценки, используя модель 1:1 и общую подгонку.

Результаты анализа с использованием системы BIAcore приводятся ниже, в табл. 3. Результаты показывают, что основная часть потери аффинности к альфа-синуклеину вызвана повышенной скоростью диссоциации для некоторых вариантов антител. На основании данных по аффинности в качестве предпочтительного антитела было определено антитело H4L3.

Таблица 3
Аффинность вариантов антитела 5C1, определенная на системе BIACore

| 5C1 Вариант | # Каркасные мышиные AAs | K _d | K _{on} | K _{off} |
|----------------|--|---|-----------------|-------------------------|
| | HC | LC | | |
| m5C1 | 82 | 80 | 68.7 nM | 7.5x10 ⁴ /с |
| Ch5C1 | 82 | 80 | 86.0 nM | 6.1x10 ⁴ /с |
| h5C1_H3L4 | 65, вкл. 9 обратных мутаций (V11L, G27Y, N30T, M48I, V67A, I69L, E73K, Y91F, R94S) | 69, вкл. 2 обратных мутации (P12S, T14S) | 1237.0 nM | 4.4x10 ⁴ /с |
| h5C1_H4L3 | 64, вкл. 8 обратных мутаций (V11L, G27Y, N30T, M48I, V67A, I69L, E73K, R94S) | 72, вкл. 5 обратных мутаций (I2V, P12S, T14S, Y49N, Y87F) | 119.8 nM | 4.4x10 ⁴ /с |
| h5C1_H4L4 | V67A, I69L, E73K, R94S) | 69, вкл. 2 обратных мутации (P12S, T14S) | 600.9 nM | 5.3x10 ⁴ /с |
| h5C1_H5L3 | 62, вкл. 6 обратных мутаций (V11L, G27Y, N30T, M48I, E73K, R94S) | 72, вкл. 5 обратных мутации (I2V, P12S, T14S, Y49N, Y87F) | 283.1 nM | 3.9x10 ⁴ /с |
| h5C1_H5L4 | | 69, вкл. 2 обратных мутации (P12S, T14S) | 1062.0 nM | 3.7x10 ⁴ /с |
| | | | | 40.3x10 ³ /с |

Пример 6. Аланин-сканирующий мутагенез.

Эпитопы, которые связываются антителами 5C1, 9E4 и 5D12, были картированы приблизительно между остатками 118 и 126 альфа-синуклеина благодаря связыванию антител с перекрывающимися пептидами. В данном примере описывается более точное (прецизионное) картирование с использованием аланин-сканирующего мутагенеза каждого остатка между положениями 118 и 126 альфа-синуклеина. Аланин использовали потому, что его небольшая по объему, химически инертная метильная функциональная группа, которая, тем не менее, имитирует вторичную структуру, дает ему преимущества перед многими другими аминокислотами. В верхней части фиг. 6-8 показаны данные вестерн-блоттинга, полученные в результате окрашивания антителами 9E4, 5C1 и 5D12 соответственно. Блоты включают полноразмерный альфа-синуклеин и продукты точковых мутаций альфа-синуклеина, полученные с использованием аланин-сканирующего мутагенеза остатков 118-126 и окрашенные антителом с концентрацией 0.5 мкг/мл. Мутации в положениях 122 и 125 фактически аннулировали связывание 9E4, тогда как мутации в других положениях, если вообще оказывали какое-либо влияние, то очень небольшое. Следовательно, 9E4 преимущественно контактирует с остатками 122 и 125. Мутации в положениях 120-122 фактически отменяли связывание 5C1, а мутации в положениях 123 и 124, по существу, снижали, но не отменяли связывание. Следовательно, 5C1 преимущественно контактирует с остатками 120-122 и, в меньшей степени, с остатками 123-124. Мутации в положениях 120-122 фактически отменяли связывание 5D12, а мутации в положениях 118, 119, 123 и 124, по существу, снижали, но не отменяли связывание. Следовательно, 5D12 связывается преимущественно с остатками в положениях 120-122 и, в меньшей степени, в положениях 118, 119, 123 и 124. На каждой из фиг. 6-8 в качестве контрольного антитела использовалось антитело 1H7. Антитело 1H7 связывается с остатками 91-98 альфа-синуклеина, и, следовательно, предполагается, что оно связывается с альфа-синуклеином вне зависимости от присутствия мутаций в остатках 118-126.

Различия специфичностей связывания 9E4 по сравнению с 5C1 и 5D12 частично могут быть отражением соответствующих (различных) способов их получения. 9E4 получали иммунизацией с помощью полноразмерного альфа-синуклеина, полученное в результате антитело связывает конформационный эпипот. Антитела 5C1 и 5D12 получали иммунизацией пептидом из 10 аминокислотных остатков, в результате получали линейный эпипот.

На фиг. 9 показана шаростержневая модель (модель Кекулे-Вант-Гоффа) аминокислот в альфа-синуклеине непосредственно вблизи сайтов связывания антител 9E4, 5C1 и 5D12. Два не связанных непосредственно ("прерывистых") остатка эпипота, связываемого с помощью 9E4, остатки 122 и 125, образуют карман в конформации полноразмерного белка альфа-синуклеина.

В настоящем изобретении можно сделать множество изменений и модификаций без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения. Если из контекста не явствует иное, любую стадию, любой признак, вариант или аспект можно применять в комбинации друг с другом. Все публикации, заявки на патент, сайты в Интернете, номера доступа и т.п., упоминаемые в данном описании, полностью включены в настоящее изобретение в той же степени, как если бы конкретно и индивидуаль-

но указывалось, что каждая отдельная публикация или заявка на патент включена посредством отсылки. Поскольку существуют различные версии ссылки, значение имеет самая последняя версия на действительную дату подачи.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывается с человеческим альфа-синуклеином, содержащее три участка CDR по определению Kabat (SEQ ID NO: 25-27) в легкой цепи и три участка CDR по определению Kabat (SEQ ID NO: 10-12) в тяжелой цепи.
2. Антитело по п.1, которое представляет собой мышью, химерное, венированное или гуманизированное антитело.
3. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой гуманизированное антитело.
4. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой химерное антитело.
5. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой венированное антитело.
6. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой Fab-фрагмент или однокопичный Fv-фрагмент.
7. Антитело по любому из предыдущих пунктов, изотип которого представляет собой человеческий IgG1.
8. Антитело по любому из предыдущих пунктов, имеющее по меньшей мере одну мутацию в константной области.
9. Антитело по п.8, причем мутация снижает фиксацию или активацию комплемента посредством константной области.
10. Антитело по п.9, имеющее мутацию в одном или более положений 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 и 331 по нумерации в соответствии с индексом EU.
11. Антитело по п.10, содержащее аланин в положениях 318, 320 и 322.
12. Антитело, содержащее аминокислотную последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи, содержащую три участка CDR по определению Kabat с последовательностями SEQ ID NO: 10-12 и по меньшей мере на 90% идентичную H4 (SEQ ID NO: 17), и аминокислотную последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи, содержащую три участка CDR по определению Kabat с последовательностями SEQ ID NO: 25-27 и по меньшей мере на 90% идентичную L3 (SEQ ID NO: 31), причем антитело специфически связывается с человеческим альфа-синуклеином.
13. Антитело по п.12 при условии, что по меньшей мере одно из положений H11, H27, H30, H48 и H73 занимает аминокислотный остаток L, Y, T, I и K соответственно и по меньшей мере одно из положений L12 и L14 занимает аминокислотный остаток S.
14. Антитело по п.13 при условии, что положения H11, H27, H30, H48 и H73 занимают аминокислотные остатки L, Y, T, I и K соответственно, а положения L12 и L14 занимают аминокислотный остаток S.
15. Антитело по любому из пп.12-14 при условии, что по меньшей степени одно из положений H67, H69 и H94 занимает остаток A, L и S соответственно.
16. Антитело по п.15 при условии, что положения H67, H69 и H94 занимают остатки A, L и S соответственно.
17. Антитело по п.15 при условии, что положение H94 занимает остаток S.
18. Антитело по любому из пп.12-14 при условии, что по меньшей мере одно из положений L2, L49 и L87 занимает остатки V, N и F соответственно.
19. Антитело по п.18 при условии, что положения L2, L49 и L87 занимают остатки V, N и F соответственно.
20. Антитело по любому из пп.12-19, содержащее аминокислотную последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере на 95% идентичную H4 (SEQ ID NO: 17), и аминокислотную последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи, по меньшей мере на 95% идентичную L3 (SEQ ID NO: 31).
21. Антитело по любому из пп.12-19, в котором зрелая вариабельная область тяжелой цепи связана с константной областью тяжелой цепи и зрелая вариабельная область легкой цепи связана с константной областью легкой цепи.
22. Антитело по п.21, в котором константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области тяжелой цепи, которая обладает пониженным связыванием с Fc γ рецептором по сравнению с природной константной областью тяжелой цепи.
23. Антитело по п.21 или 22, в котором константная область тяжелой цепи является константной областью тяжелой цепи IgG1 изотипа.
24. Антитело по п.21, в котором зрелая вариабельная область тяжелой цепи связана с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 38, и/или зрелая вариабельная об-

ласть легкой цепи связана с константной областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 40.

25. Антилого по любому из пп.12-21 при условии, что любые отличия участков CDR зрелой вариабельной области тяжелой цепи и зрелой вариабельной области легкой цепи от H4 и L3 (SEQ ID NO: 17 и 31 соответственно) находятся в положениях H60-H65.

26. Антилого по п.12, в котором зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную H4 (SEQ ID NO: 17), и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную L3 (SEQ ID NO: 31).

27. Антилого по п.12, в котором зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную H5 (SEQ ID NO: 18), и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную L3 (SEQ ID NO: 31).

28. Антилого по любому из пп.1-8, 12-21, 25-27, которое представляет собой Fab-фрагмент.

29. Антилого по любому из пп.1-27, чистота которого составляет по меньшей мере 95% вес./вес.

30. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую(ые) и/или легкую(ие) цепь(цепи) антилого по любому из пп.12-27.

31. Рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.30.

32. Клетка-хозяин, трансформированная рекомбинантным экспрессионным вектором по п.31, для экспрессии антилого по п.12.

33. Способ гуманизации антилого, включающий

определение последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей мышного антилого;

синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную тяжелую цепь, содержащую участки CDR тяжелой цепи мышного антилого, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную легкую цепь, содержащую участки CDR легкой цепи мышного антилого;

экспрессирование нуклеиновых кислот в клетке-хозяине с получением гуманизированного антилого,

причем мышное антилого представляет собой антилого по п.1.

34. Способ получения гуманизированного, химерного или венированного антилого, включающий культивирование клеток, трансформированных с использованием нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую и легкую цепи антилого, таким образом, чтобы клетки секретировали антилого; и

очистку антилого от клеточной культуральной среды,

причем антилого представляет собой антилого по п.2.

35. Способ получения линии клеток, продуцирующих гуманизированное, химерное или венированное антилого, включающий

введение вектора, кодирующего тяжелую и легкую цепи антилого, и селективного маркера в клетки;

выращивание клеток в условиях селекции на клетки, имеющие повышенное число копий вектора;

выделение единичных клеток из отобранных клеток и

консервацию клеток, клонированных с использованием единичной клетки, выбранной на основании выхода антилого,

причем антилого представляет собой антилого по п.2.

36. Способ по п.35, включающий также выращивание клеток в селективных условиях и скрининг на линии клеток, естественно экспрессирующих и секретирующих по меньшей мере 100 мг/л/ 10^6 клеток/24 ч.

37. Способ терапии или профилактики болезни телец Леви, включающий введение по эффективной схеме антилого по любому из пп.1-29 и тем самым лечение или профилактику этой болезни.

38. Способ по п.37, при этом способ тормозит снижение когнитивных функций у пациента.

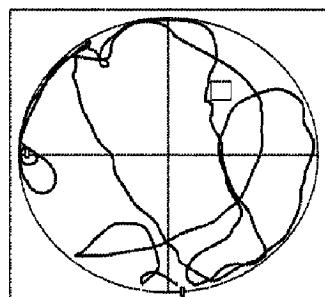
39. Способ обнаружения телец Леви у пациента с повышенным риском развития болезни телец Леви, включающий введение пациенту эффективного количества антилого по любому из пп.1-29, которое связывается с тельцами Леви; и обнаружение связанного антилого у пациента.

| 5С1-VH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|
| <i>Нумерация по Кабату</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| Q | V | O | L | Q | O | S | G | A | E | L | A | K | P | G | T | S | V | Q | M |
| <i>Нумерация по Кабату</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| S | C | K | A | S | G | Y | T | F | T | H | X | H | N | N | N | I | K | A | R |
| <i>Нумерация по Кабату</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | |
| P | G | Q | G | L | E | W | I | G | A | T | N | P | N | N | G | Y | F | D | Y |
| <i>Нумерация по Кабату</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 |
| M | O | R | F | K | D | K | A | I | L | T | A | D | K | S | S | N | T | A | Y |
| <i>Нумерация по Кабату</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 80 | 81 | 82 | 82A | 82B | 82C | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 |
| M | H | I | S | S | L | T | S | E | D | V | A | V | Y | F | C | A | S | G | |
| <i>Нумерация по Кабату</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 97 | 98 | 99 | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | | |
| H | L | A | - | - | X | W | G | Q | G | T | V | V | T | V | S | A | - | | |

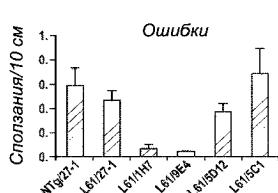
Фиг. 1

| 5С1-VL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|
| <i>Нумерация по Кабату</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| D | V | V | M | T | Q | I | P | L | Y | L | S | V | S | P | G | D | Q | A | S |
| <i>Нумерация по Кабату</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 27A | 27B | 27C | 27D | 27E | 27F | - | K | G | N | T | Y | L |
| I | S | C | R | S | S | Q | S | L | F | H | S | - | K | G | N | T | Y | L | |
| <i>Нумерация по Кабату</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 |
| W | Y | L | Q | R | P | G | Q | S | P | K | L | L | I | N | R | V | S | N | |
| <i>Нумерация по Кабату</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 |
| E | S | G | V | P | D | R | T | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | |
| <i>Нумерация по Кабату</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 |
| I | S | G | V | E | A | D | L | G | V | Y | F | C | S | O | S | A | H | V | |
| <i>Нумерация по Кабату</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | | | | | | | |
| E | F | G | G | G | T | K | L | E | I | R | | | | | | | | | |

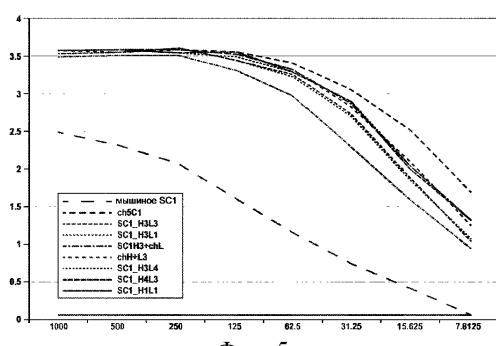
Фиг. 2



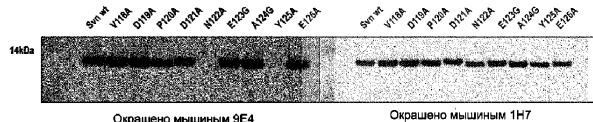
Фиг. 3



Фиг. 4

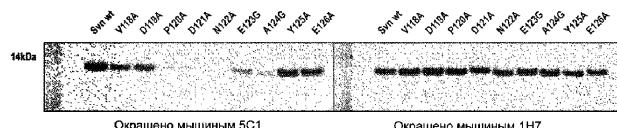


Фиг. 5

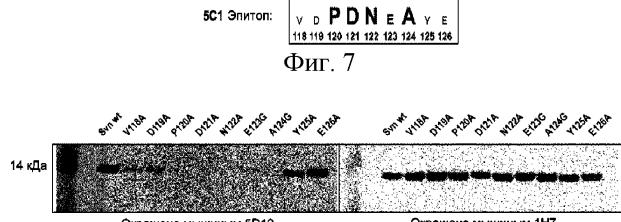


9E4 Эпилоп

Фиг. 6



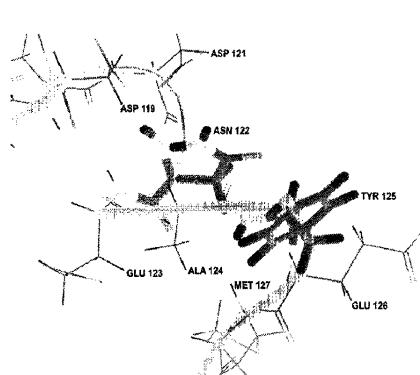
Окрашено мышиным 5С1



5012

BRN - A

V D P L
118 119 120 121



8

