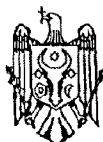




MD/EP 3463435 T2 2022.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3463435 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 39/00 (2006.01.01)
C07K 16/18 (2006.01.01)
C07K 16/46 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0406 (22) Data de depozit: 2017.06.01 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17728525.1, 2017.06.01 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3463435, 2019.04.10 (31) Numărul cererii prioritare: 201662344746 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.06.02 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 03/2022, 2022.03.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 41/2021, 2021.10.13 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 05/2019, 2019.05.31
(71) Solicitant: MEDIMMUNE LIMITED, GB (72) Inventatori: PERKINTON Michael, GB; SCHOFIELD Darren, GB; IRVING Lorraine, GB; THOM George, GB (73) Titular: MEDIMMUNE LIMITED, GB (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Anticorpi impotriva alfa sinucleinei și utilizări ale acestora

(57) Rezumat:

1

Invenția furnizează anticorpi care leagă în mod specific I-sinucleina umană cu o afinitate ridicată și reduce răspândirea I-sinucleinei in vivo, polipeptidele recombinante cuprinzând anticorpii menționați sau fragment al acestora de legare de antigen și metode pentru generarea de astfel de polipeptide, precum și compoziții și metode pentru

2

generarea I-sinucleinei și metode de utilizare a anticorpilor pentru I-sinucleină pentru tratamentul bolilor sistem nervos central, în particular alfa-sinucleinopatiile.

Secvențe: 61

Revendicări: 12

Figuri: 19

MD/EP 3463435 T2 2022.03.31

(54) Antibodies to alpha-synuclein and uses thereof**(57) Abstract:**

1

The invention provides antibodies that specifically bind human I-synuclein with a high affinity and reduces I-synuclein spreading in vivo, recombinant polypeptides comprising said antibodies or antigen-binding fragment thereof and methods for generating such polypeptides, as well as compositions and methods for generating I-synuclein antibodies,

2

and methods of using I-synuclein antibodies for the treatment of diseases of the central nervous system, in particular alpha-synucleinopathies.

Sequences: 61

Claims: 12

Fig.: 19

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****STADIUL TEHNICII**

5 Prezența dezvoltării se referă la anticorpii α -sinucleină și la utilizarea lor în profilaxia sau tratamentul bolii, în particular alfa-sinucleinopatii, și mai particular, boala Parkinson (PD).

Alfa-sinucleinopatiile, cunoscute, de asemenea, ca boli cu corpi Lewy (LBD-uri), sunt o familie de boli neurodegenerative care au toate în nucleul lor alfa-sinucleina ca specific patologic cheie (Jellinger, Mov Disord (2003), 18 Suppl 6: S2-12; și Spillantini și Goedert, Ann N Y Acad Sci (2000), 920: 16-27).

10 Alfa-sinucleinopatiile includ boala Parkinson (PD), demența cu corpi Lewy (DLB) și atrofia multisistemică (MSA).

PD este o tulburare lent progresivă a mișcării, asociată cu vârsta, care afectează mai mult de 1% dintre persoanele peste 65 de ani. PD este a doua cea mai comună afecțiune neurodegenerativă după boala Alzheimer.

15 O patologie specifică definitorie a alfa-sinucleinopatiilor sunt corpii Lewy și neurii Lewy, care sunt incluziuni insolubile ale proteinelor agregate găsite în interiorul neuronii creierului, relevate după examinarea histopatologică post-mortem.

Prezența patologiei Lewy și pierderea neuronală în regiunile non-motorii ale creierului, precum creierul anterior bazal, sistemul mezopontin, amigdala, neocortexul, nucleul motor dorsal al nervului vag, bulbul olfactiv, locusul coeruleus și trunchiul cerebral, pot provoca deficiențe cognitive și demență, hiposmie, tulburări de somn, incluzând tulburarea de comportament al somnului cu mișcarea rapidă a ochilor (RBD), tulburări de dispoziție, incluzând depresie și anxietate, disfuncție autonomă, incluzând probleme cardiovasculare și gastrointestinale, precum constipația și oboseala și somnolența. Unele dintre aceste simptome non-motorii par să caracterizeze faza premotorie sau prodromală a bolii (Kalia și colab. Lancet (2015), 386(9996): 896-912).

20

Prezența patologiei Lewy și pierderea neuronală în regiunile motorii ale creierului, incluzând mai ales în deosebi moartea neuronilor dopaminergici din substanța neagră, pot provoca tremor în repaus, rigiditate, bradichinezie și instabilitate posturală (Spillantini și Goedert, Ann N Y Acad Sci (2000), 920: 16-27).

30 Proteina alfa-sinucleină (numită, de asemenea, „a-sinucleină” sau „a-syn”) este componenta structurală majoră a corpiilor Lewy și a neuriiilor Lewy. Alfa-sinucleina este o proteină acidă mică formată din 140 de aminoacizi (14 kDa). Alfa-sinucleina umană naturală de tip sălbatic are secvența de aminoacizi SECVID NR: 1, așa cum s-a descris sub numărul de acces UniProtKB P37840. Dacă nu este evident altfel din context, referirea la alfa-sinucleină sau fragmentele acesteia include secvența de aminoacizi naturală umană de tip sălbatic indicată mai sus și variantele alelice umane ale acesteia, în particular pe cele asociate cu boala cu corpi Lewy (de exemplu, E46K, A30P, H50Q, G51D și A53T, în care prima literă indică aminoacidul din SECVID NR: 1, numărul este poziția codonului din SECVID NR: 1, iar a doua literă este aminoacidul din varianta alelică). Astfel de variante pot fi prezente opțional individual sau în orice combinație. Mutațiile induse E83Q, A90V, A76T, care cresc agregarea alfa-sinucleinei, pot fi prezente, de asemenea, individual sau în combinație una cu alta și/sau cu variantele alelice umane E46K, A30P, H50Q, G51D și A53T. La nivel structural, alfa-sinucleina conține trei regiuni distincte: un domeniu alfa-helix amfipatic N-terminal care are proprietăți de legare de lipide și membrană (reziduurile 1-60), un domeniu central hidrofob de legare de amiloid care codifică componenta beta non-amiloidă (NAC) a plăcilor (reziduurile 61-95) și o coadă C-terminală acidă bogată în prolină (reziduurile 96-140). Reziduurile 71-82 ale domeniului NAC sunt considerate a fi cheia pentru proprietățile de agregare/fibrilare ale alfa-sinucleinei, prin permiterea proteinei să treacă de la o structură aleatorie în spirală la o structură foaie beta (Bisaglia și colab. FASEB J (2009), 23(2): 329-40). Deși domeniul C-terminal este lipsit de structura secundară semnificativă, acesta conține un situs cheie de fosforilare la reziduul Ser129 și un număr de reziduuri de tirozină care sunt azotate în incluziunile citozolice ale alfa-sinucleinei. De asemenea, există forme N-terminale și C-terminale trunchiate de alfa-sinucleină. Modificările post-tranlaționale la proteină pot afecta agregarea și toxicitatea alfa-sinucleinei (Oueslati și colab. Prog Brain Res (2010), 183: 115-45).

40

45

50

Alfa-sinucleina este abundentă în sistemul nervos central (SNC)/creier, unde se găsește atât intracelular în neuroni, cât și în celulele gliale și, de asemenea, extracelular în lichidul cefalorahidian (LCR) (Mollenhauer și colab. J Neural Transm (2012), 119(7): 739-46) și lichidul interstițial (ISF) care scaldă și înconjoară celulele creierului (Emmanouilidou și colab. PLoS One (2011), 6(7): e22225). Alfa-sinucleina este o proteină sinaptică exprimată predominant în neuronii neocortexului, hipocampusului, substanței negre, talamusului și cerebelului (Iwai și colab. Neuron (1995), 14: 467-475). În condiții fiziologice, aceasta este localizată în terminalele sinaptice neuronale și este suprareglată, în mod specific,

55

la terminalele presinaptice în timpul rearanjării sinaptice legat de achiziție (Fortin și colab. J Neurosci (2005), 25: 10913-10921).

Studiile *in vitro* au prezentat că monomerii alfa-sinucleinei pot forma punctul inițial pentru procesul de agregare. Monomerul se poate agrega într-o varietate de specii oligomerice mici care sunt stabilizate apoi prin interacțiuni ale foilor beta, continuând să formeze protofibrile care pot polimeriza în structuri fibrilare insolubile care amintesc de cele identificate în corpii Lewy (Cremades și colab. Cell (2012), 149(5): 1048-59).

În condiții patologice, agregarea aberantă a alfa-sinucleinei poate fi cheia modificărilor patologice observate în alfa-sinucleinopatii (Lashuel și colab. Nature (2002), 418: 291; și Tsigelny și colab. Journal FEBS (2007), 274: 1862-1877). Studiile *in vitro* și *in vivo* au prezentat că efectele neurotoxice ale alfa-sinucleinei par a fi provocate de conformeri oligomerici mici solubili sau protofibrile (Winner și colab. Proc Natl Acad Sci U S A (2011), 108(10): 4194-9; și Danzer și colab. J Neurosci (2007), 27(34): 9220-32). În timp ce agregatele fibrilare de alfa-sinucleină sunt caracteristice pentru PD, formele oligomerice de alfa-sinucleină sunt specii toxice (Danzer și colab. J Neurosci (2007), 27(34): 9220-32; Lashuel și colab. Nature (2002), 418: 291; și Winner și colab. Proc Natl Acad Sci USA (2011), 108: 4194-4199).

Oligomerii de alfa-sinucleină pot fi eliberați în mediul extracelular și absorbiți de celulele învecinate într-un mecanism de „propagare” (Angot și Brundin, Parkinsonism Relat Disord (2009), 15 Suppl 3: S143-147; Desplats și colab. Proc Natl Acad Sci USA (2009), 106: 13010-13015; și Lee și colab. J Biol Chem (2010), 285: 9262-9272). Agregatele de alfa-sinucleină pot propaga plierea greșită printr-un mecanism de răspândire a prionilor (Lee și colab. Nat Rev Neurol (2010), 6: 702-706; Luk și colab. J Exp Med (2012), 209(5): 975-86; și Luk și colab. Science (2012), 338(6109): 949-53). Prin urmare, alfa-sinucleina poate induce neurodegenerarea fie prin toxicitatea oligomerilor, fie prin propagare și răspândire de tipul prionilor.

Acum este bine stabilit și acceptat că celulele, inclusiv neuronii, pot secreta diferite forme de alfa-sinucleină (monomeri, oligomeri, agregate) în condiții normale și, de asemenea, în condiții de stres celular, secreția de forme monomerice și agregate de alfa-sinucleină este crescută în condiții de stres celular și prin această eliberare de alfa-sinucleină în mediul extracelular, formele patologice transmisibile de alfa-sinucleină pot fi propagate între neuroni (Recasens și Dehay, Front Neuroanat (2014), 8: 159).

Efectele alfa-sinucleinei în PD se pot extinde dincolo de deteriorarea imediată în celulele neuronale vulnerabile. La fel ca cele mai multe boli neurodegenerative, există, de asemenea, un răspuns celular proinflamator observat (Lee și colab. J Biol Chem (2010), 285: 9262-9272). Alfa-sinucleina circulantă și/sau astrocitele activate pot activa microglia, conducând la generarea crescută de specii reactive de oxigen, producerea de oxid de azot și citokine și exacerbând suplimentar neurodegenerarea (Lee și colab. J Biol Chem (2010), 285: 9262-9272).

O varietate de modele experimentale diferite au demonstrat transmiterea de la celulă la celulă a alfa-sinucleinei în celulele cultivate sau răspândire *in vivo* și propagarea patologiilor alfa-sinucleinei. Patologia corpilor Lewy a fost observată în grefele neuronale mezencefalice embrionare la mai mult de 10 ani după ce grefele au fost transplantate terapeutic în striatul pacienților cu PD. În mod specific, neuronii greșați au conținut un număr de incluziuni de tipul corpilor Lewy care s-au colorat pozitiv pentru alfa-sinucleină, indicând că a avut loc transmiterea de la gazdă la grefă a patologiei alfa-sinucleinei (Li și colab. Nat Med (2008), 14(5): 501-3; și Kordower și colab. Nat Med (2008), 14(5): 504-6).

Suplimentar, fibrilele preformate de alfa-sinucleină recombinantă și oligomerii de alfa-sinucleină pot fi internalizați de celulele și neuronii cultivați și a fost demonstrat transferul direct al alfa-sinucleinei de la celulele donoare la cele primitoare cu formarea de incluziuni de alfa-sinucleină similare cu patologia Lewy. (Danzer și colab. J Neurosci (2007), 27(34): 9220-32; Volpicelli-Daley și colab. Neuron (2011), 72(1): 57-71; și Luk și colab. Proc Natl Acad Sci U S A (2009), 106(47): 20051-6). Injectarea de fibrile preformate de alfa-sinucleină sintetică sau alfa-sinucleină de tipul corpilor Lewy conținând material extras din creierele șoarecilor bătrâni transgenici cu alfa-sinucleină în creierele șoarecilor primitori asimptomatici promovează formarea patologiei de tipul corpilor Lewy în neuronii gazdă ai animalelor primitoare împreună cu neurodegenerare și deficite neurologice (Luk și colab. J Exp Med (2012), 209(5): 975-86; și Luk și colab. Science (2012), 338(6109): 949-53). Alfa-sinucleină conținând extracte de corpi Lewy izolate din creierele cu PD inoculate în substanța neagră sau striatum la maimuțele macac și șoareci este absorbită rapid de celulele gazdă (în 24 de ore), urmată de o pierdere mai lentă a terminalelor dopaminergice striatale, cu pierdere evidentă a celulelor după mai mult de un an (Recasens și colab. Ann Neurol (2014), 75(3): 351-62). În mod similar, inocularea șoarecilor cu omogenate de creier derivate de la pacienți cu sinucleinopatii DLB sau MSA declanșează patologia de tipul Lewy a alfa-sinucleinei la șoarecii gazdă (Watts și colab. Proc Natl Acad Sci U S A (2013), 110(48): 19555-60; și Masuda-Suzukake și colab. Brain (2013), 136(Pt 4): 1128-38). În cele din urmă, au fost demonstrate la șoareci transferul și transmiterea atât a alfa-sinucleinei monomerice, cât și oligomerice din bulbul olfactiv la structurile interconectate ale creierului (Rey și colab. Acta Neuropathol (2013), 126(4): 555-73).

Au fost testate abordări ale imunoterapiei pasive cu anticorpi care țintesc alfa-sinucleina în numeroase modele preclinice de șoareci cu alfa-sinucleinopatie (Lawand și colab. Expert Opin Ther Targets (2015): 1-10). În mod specific, un studiu utilizând un anticorp monoclonal direcționat față de alfa-sinucleină (9E4) a prezentat clearance *in vivo* al agregatelor și al patologiei alfa-sinucleinei, îmbunătățiri comportamentale motorii și efecte neuroprotectoare (WO 2014/058924).

Studiile suplimentare utilizând imunizarea pasivă a șoarecilor transgenici cu alfa-sinucleină, dezvoltată ca modele experimentale de PD/DLB, cu anticorpul monoclonal 9E4, au prezentat că anticorpul îndepărtează patologia alfa-sinucleinei, scade deficitul sinaptice și axonale, abrogă pierderea fibrelor striatale cu tirozinhidroxilază și reduce semnificativ deficitul de memorie și afecțiunile funcției motorii (Games și colab. J Neurosci (2014), 34(28): 9441-54; Bae și colab. J Neurosci (2012), 32(39): 13454-69; și Masliah și colab. PLoS One (2011), 6(4): e19338). Suplimentar, a fost demonstrat că administrarea pasivă de anticorpi monoclonali anti-alfa-sinucleină la șoareci de tip sălbatic care au fost injectați intrastriatal cu fibrile sintetice preformate de alfa-sinucleină (pffs) a condus la reducerea puternică a patologiei Lewy, profilaxia pierderii de neuroni dopaminergici în substanța neagră și o îmbunătățire semnificativă a afecțiunilor motorii care se manifestă la modelul de șoarece după tratamentul cu pffs (Tran și colab. Cell Rep (2014), 7(6): 2054-65).

În plus, una dintre provocările majore asociate cu tratarea tulburărilor SNC cu terapii cu molecule mari, precum anticorpilor, este trecerea acestor medicamente în țesutul afectat. Trecerea moleculelor mari în creier și măduva spinării este în mare măsură restricționată de bariera hematoencefalică (BBB). BBB protejează și reglează homeostazia creierului și previne trecerea liberă a moleculelor în cele mai multe părți ale creierului, limitând astfel tratamentul multor boli ale creierului. Transportul moleculelor esențiale, precum nutrienții, factorii de creștere și hormonii, este realizat printr-o serie de transportori și receptori specifici care reglează trecerea prin celulele endoteliale ale creierului. Prin urmare, administrarea de produși biologici și alte medicamente către creier reprezintă o provocare semnificativă. În plus, par să existe mecanisme de transport care elimină rapid anticorpilor din creier, probabil pentru a preveni răspunsurile inflamatorii datorate cuplării Fc cu liganzii efectori care promovează un răspuns proinflamator.

În ultimul deceniu, au apărut rapoarte despre transportul de anticorpi prin BBB, unde legarea de domeniul extracelular al moleculelor transportor facilitează transitoza complexului receptor anticorp prin stratul de celule endoteliale.

BBB este compus în principal din celule endoteliale capilare ale creierului, care au caracteristici specializate, precum joncțiuni rezistente, pentru a limita transportul moleculelor în creier (Reese și colab. 1967, J. Cell Biol. 34: 207-217; Brightman și colab. 1969, J. Cell Biol. 40: 648-677; Rubin și colab. 1999, Ann. Rev. Neurosci. 22: 11-28), deși alte tipuri de celule, precum pericitele, astrocitele și celulele neuronale, joacă, de asemenea, un rol important în funcția BBB. În mod tipic, mai puțin de 0,1% dintr-un anticorp dozat periferic ajunge la creier (Boado și colab. 2010, Mol. Pharm. 7: 237-244; Pepinsky și colab. 2011, Nat. Neurosci. 8: 745-751). BBB funcționează ca o barieră fizică, metabolică și imunologică (Gaillard și colab. 2003, Microvasc. Res. 65: 24-31).

Transportul anticorpilor prin BBB poate fi îmbunătățit prin declanșarea transitozei mediate de receptori în celulele endoteliale ale creierului. Prin acest proces, cuplarea antigenelor din partea luminală a celulei endoteliale poate induce internalizarea și oscilarea anticorpului prin celulă și apoi eliberarea lui ulterioară în țesut.

Terapiile medicamentoase actuale pentru PD sunt concentrate în principal pe tratarea simptomelor asociate motor ale bolii. În prezent, nu există terapii comercializate sau disponibile care să poată trata sau preveni alfa-sinucleinopatia.

Prin urmare, există o nevoie în domeniu pentru o terapie pentru tratarea alfa-sinucleinopatiilor, în particular, la oameni.

WO 2014/132210 descrie anticorpi sau fragmente ale acestora care au o afinitate ridicată de legare pentru agregatele de a-sinucleină (de exemplu, fibrile, protofibrile sau oligomeri de amiloid) și afinitate scăzută de legare pentru monomerii de α -sinucleină.

REZUMATUL INVENȚIEI

Prezenta invenție este descrisă de revendicările anexate. Revendicarea 1 furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen care se leagă de a-sinucleina umană, în care anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen cuprinde:

a) trei CDR-uri ale lanțului greu având secvențele:

(i) H-CDR1 din SECV ID NR: 5,

(ii) H-CDR2 din SECV ID NR: 15; și

(iii) H-CDR3 din SECV ID NR: 16 și

5 b) trei CDR-uri ale lanțului ușor având secvențele:

(i) L-CDR1 din SECV ID NR: 20,

(ii) L-CDR2 din SECV ID NR: 10; și

10

(iii) L-CDR3 din SECV ID NR: 21.

În revendicările dependente rămase sunt dezvăluite caracteristici avantajoase suplimentare.

15 Prezentă dezvăluire se ocupă de anticorpi izolați de alfa-sinucleina umană. Prezentă dezvăluire se preocupă de anticorpi sau fragmente ale acestora de legare de antigen care au una sau mai multe dintre proprietățile funcționale ale anticorpului aslo0452 ngl-3. De exemplu:

20 Prezentă dezvăluire furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen care leagă în mod specific regiunea C-terminală a α -sinucleinei umane. Prezentă dezvăluire furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen care leagă în mod specific regiunea cuprinzând aproximativ aminoacidul 102 până la aproximativ aminoacidul 130 al α -sinucleinei umane (de exemplu, SECV ID NR: 1). În unele variante, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen se leagă în mod specific de o regiune cuprinzând aproximativ aminoacidul 120 până la aproximativ aminoacidul 130 al α -sinucleinei umane (SECV ID NR: 1). În unele variante, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen se leagă de un epitop care nu este același cu anticorpul legat de anticorpul 9E4.

25 Prezentă dezvăluire furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen care leagă α -sinucleina umană, dar nu β -sinucleina umană sau γ -sinucleina umană.

Prezentă dezvăluire furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen care se leagă de α -sinucleina umană, de șobolan și de cynomolgus.

30 Prezentă dezvăluire furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen care se leagă de α -sinucleina umană cu afinitate ridicată. Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezentă dezvăluire se leagă de alfa-sinucleină cu o K_D de mai puțin de 500 pM, mai puțin de 400 pM, mai puțin de 300 pM, mai puțin de 200 pM, mai puțin de 150 pM, mai puțin de 120 pM, mai puțin de 110 pM sau 106 pM sau mai puțin, așa cum s-a măsurat, de exemplu, utilizând analiza Octet. Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezentă dezvăluire se leagă de alfa-sinucleină cu o K_D de mai puțin de 400 pM, mai puțin de 300 pM, mai puțin de 250 pM, mai puțin de 200 pM, mai puțin de 150 pM, mai puțin de 120 pM, mai puțin de 110 pM, mai puțin de 100 pM, mai puțin de 80 pM sau 74 pM sau mai puțin, așa cum s-a măsurat, de exemplu, utilizând analiza KinExA.

40 Prezentă dezvăluire furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen care se leagă de α -sinucleina umană endogenă nativă.

Prezentă dezvăluire furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen care se leagă de forme monomerice de α -sinucleină umană.

Prezentă dezvăluire furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen care se leagă de agregate de α -sinucleină umană.

45 Prezentă dezvăluire furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen care leagă formele patologice relevante de boală cu α -sinucleină.

50 Prezentă dezvăluire furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezentă dezvăluire care reduce nivelurile de α -sinucleină din lichidul interstițial al creierului. În particular, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvăluiri reduce nivelurile libere de α -sinucleină nelegată din lichidul interstițial al creierului.

Prezentă dezvăluire furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezentă dezvăluire care reduce nivelurile de α -sinucleină din lichidul cefalorahidian. În particular, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvăluiri reduce nivelurile de α -sinucleină liberă nelegată din lichidul cefalorahidian.

55 Așa cum s-au utilizat aici, termenii „ α -sinucleină liberă nelegată” se referă la α -sinucleina care nu este legată de anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezentă dezvăluire. α -Sinucleina liberă nelegată menționată se poate aplica α -sinucleinei în forma sa monomerică sau oligomerică sau în formă agregată. Acești termeni se aplică în general oricărei forme patologice de α -sinucleină.

Prezenta dezvoltare furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen care reduce răspândirea α -sinucleinei *in vivo*.

Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare concurează cu anticorpul aslo0452 ngl-3 pentru legarea de α -sinucleina umană.

Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare se leagă de același epitop pe α -sinucleina umană, precum anticorpul aslo0452 ngl-3.

Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare derivă din anticorpul asyn0087 cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu (VH) cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 2 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 3, așa cum s-a dezvoltat aici.

Într-o variantă particulară, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare derivă din anticorpul asyn0087, în care anticorpul sau fragmentul de legare de antigen menționat are o K_D de mai puțin de 500 mM și leagă același epitop precum oricare dintre anticorpii asyn0087, aslo0452 ngl-3 și aslo0543, descriși aici.

Așa cum s-a utilizat aici, „H-CDR” reprezintă o regiune determinantă de complementaritate (CDR) pe regiunea lanțului greu, iar „L-CDR” reprezintă o regiune determinantă de complementaritate (CDR) pe regiunea lanțului ușor a unui anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen.

Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltări cuprinde cel puțin o CDR selectată dintre:

- (i) H-CDR1 din SECV ID NR: 5,
- (ii) H-CDR2 din SECV ID NR: 6,
- (iii) H-CDR3 din SECV ID NR: 7,
- (iv) L-CDR1 din SECV ID NR: 9,
- (v) L-CDR2 din SECV ID NR: 10,
- (vi) L-CDR3 din SECV ID NR: 11.

Într-o variantă suplimentară, CDR3 a lanțului greu al anticorpului sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este CDR3 din SECV ID NR: 16 a lanțului greu al anticorpului aslo0452 ngl-3; și/sau CDR3 a lanțului ușor al anticorpului sau al fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este CDR3 din SECV ID NR: 21 a lanțului ușor al anticorpului aslo0452 ngl-3.

Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare are cel puțin unul, cel puțin două, cel puțin trei, cel puțin patru, cel puțin cinci sau toate CDR-urile selectate dintre CDR-urile anticorpului aslo0452 ngl-3, adică cel puțin o CDR selectată din oricare dintre SECV ID NR: 5, SECV ID NR: 15, SECV ID NR: 16, SECV ID NR: 20, SECV ID NR: 10, SECV ID NR: 21.

Într-o variantă, CDR3 a lanțului greu al anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este CDR3 a lanțului greu al anticorpului aslo0452 ngl-3; și/sau CDR3 a lanțului ușor al anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este CDR3 a lanțului ușor al anticorpului aslo0452 ngl-3.

Într-o variantă, CDR3 a lanțului greu al anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este CDR3 a lanțului greu al anticorpului aslo0452 ngl-3.

Într-o variantă, CDR3 a lanțului ușor al anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este CDR3 a lanțului ușor al anticorpului aslo0452 ngl-3.

Într-o variantă, CDR3 a lanțului greu al anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este CDR3 a lanțului greu al anticorpului aslo0452 ngl-3 și CDR3 a lanțului ușor al anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este CDR3 a lanțului ușor al anticorpului aslo0452 ngl-3.

Prezenta dezvoltare furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen având cele șase CDR-uri ale anticorpului aslo0452 ngl-3.

Astfel, într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltări cuprinde:

a) trei CDR-uri ale lanțului greu având secvențele:

- (i) H-CDR1 din SECV ID NR: 5,
- (ii) H-CDR2 din SECV ID NR: 15; și
- (iii) H-CDR3 din SECV ID NR: 16 și

b) trei CDR-uri ale lanțului ușor având secvențele:

- (i) L-CDR1 din SECV ID NR: 20,
- (ii) L-CDR2 din SECV ID NR: 10 și
- (iii) L-CDR3 din SECV ID NR: 21.

5

Prezenta dezvoltare furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare cuprinzând un lanț greu variabil având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100 % identitate cu secvența de nucleotide definită de SECV ID NR: 13 și un lanț ușor variabil având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența de nucleotide definită de SECV ID NR: 18.

10

Prezenta dezvoltare furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare cuprinzând un lanț greu variabil având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100 % identitate cu secvența de aminoacizi definită de SECV ID NR: 14 și un lanț ușor variabil având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența de aminoacizi definită de SECV ID NR: 19.

15

Prezenta dezvoltare furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare cuprinzând un lanț greu variabil având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 14 și un lanț ușor variabil având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 19.

Într-o variantă particulară, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltări cuprinde un lanț greu variabil având o secvență definită de SECV ID NR: 4 și un lanț ușor variabil având o secvență definită de SECV ID NR: 8.

20

Într-o variantă particulară suplimentară, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltări cuprinde un lanț greu variabil având o secvență definită de SECV ID NR: 4 și un lanț ușor variabil având o secvență definită de SECV ID NR: 8, și se leagă de α -sinucleina umană cu o K_D de mai puțin de 500 pM și leagă același epitop precum asyn0087, aslo0452 ngl-3 sau aslo0543.

25

Într-o altă variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltări cuprinde un lanț greu variabil având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența definită de SECV ID NR: 14 și un lanț ușor variabil având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența definită de SECV ID NR: 19.

30

Într-o variantă particulară, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltări cuprinde un lanț greu variabil având o secvență definită de SECV ID NR: 14 și un lanț ușor variabil având o secvență definită de SECV ID NR: 19.

Într-o variantă suplimentară, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltări cuprinde un lanț greu variabil având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau identitate 100% cu secvența definită de SECV ID NR: 14 și un lanț ușor variabil având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența definită de SECV ID NR: 19 și cuprinde suplimentar:

35

a) trei CDR-uri ale lanțului greu având secvențele:

40

- (i) H-CDR1 din SECV ID NR: 5,
- (ii) H-CDR2 din SECV ID NR: 15; și
- (iii) H-CDR3 din SECV ID NR: 16 și

b) trei CDR-uri ale lanțului ușor având secvențele:

45

- (i) L-CDR1 din SECV ID NR: 20,
- (ii) L-CDR2 din SECV ID NR: 10; și
- (iii) L-CDR3 din SECV ID NR: 21.

50

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen, cuprinzând un lanț greu variabil având o secvență de nucleotide definită de SECV ID NR: 13 și un lanț ușor variabil având o secvență de nucleotide definită de SECV ID NR: 18.

Prezenta dezvoltare furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen cuprinzând un lanț greu variabil având o secvență de aminoacizi definită de SECV ID NR: 14 și un lanț ușor variabil având o secvență de aminoacizi definită de SECV ID NR: 19.

55

De asemenea, este furnizat un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltări cuprinzând un lanț greu având o secvență de aminoacizi definită de SECV ID NR: 12 și un lanț ușor având o secvență de aminoacizi definită de SECV ID NR: 17.

Într-o altă variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltării cuprinde un lanț greu variabil având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența definită de SECV ID NR: 24 și un lanț ușor variabil având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența definită de SECV ID NR: 30.

Într-o variantă particulară, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltării cuprinde un lanț greu variabil având o secvență definită de SECV ID NR: 24 și un lanț ușor variabil având o secvență definită de SECV ID NR: 30.

Într-o variantă suplimentară, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltării cuprinde un lanț greu variabil având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența definită de SECV ID NR: 24 și un lanț ușor variabil având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența definită de SECV ID NR: 30 și cuprinde suplimentar:

c) trei CDR-uri ale lanțului greu având secvențele:

- (iv) H-CDR1 din SECV ID NR: 25,
- (v) H-CDR2 din SECV ID NR: 26; și
- (vi) H-CDR3 din SECV ID NR: 27 și

d) trei CDR-uri ale lanțului ușor având secvențele:

- (iv) L-CDR1 din SECV ID NR: 31,
- (v) L-CDR2 din SECV ID NR: 32; și
- (vi) L-CDR3 din SECV ID NR: 33.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen, cuprinzând un lanț greu variabil având o secvență de nucleotide definită de SECV ID NR: 24 și un lanț ușor variabil având o secvență de nucleotide definită de SECV ID NR: 30.

Prezenta dezvoltare furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen, cuprinzând un lanț greu variabil având o secvență de aminoacizi definită de SECV ID NR: 24 și un lanț ușor variabil având o secvență de aminoacizi definită de SECV ID NR: 30.

De asemenea, este furnizat un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltării cuprinzând un lanț greu având o secvență de aminoacizi definită de SECV ID NR: 22 și un lanț ușor având o secvență de aminoacizi definită de SECV ID NR: 28.

Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltării, așa cum s-a definit oriunde mai sus, este un anticorp IgA, IgD, IgE, IgM, IgG, precum anticorpul IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4 sau fragment al acestora de legare de antigen.

Într-o altă variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltării are o regiune Fc modificată. Modificările adecvate sunt binecunoscute specialiștilor în domeniu și pot include, *printre altele*, modificări pentru a crește sau a scădea timpul de înjumătățire, a abla, a reduce sau a îmbunătăți funcția efectoră, furnizează cisteine substituie cu tioli liberi pentru conjugare. Exemple de astfel de modificări sunt YTE pentru a crește timpul de înjumătățire și/sau TM pentru a reduce funcția efectoră. În unele variante, oricare dintre anticorpii sau fragmentele de legare de antigen dezvoltate aici cuprind mutații M252Y/S254T/T256E (YTE) în regiunea Fc a anticorpului (Dall'Acqua și colab., 2006, J. Biol. Chem, 281:23514-23524). În unele variante, oricare dintre anticorpii sau fragmentele de legare de antigen dezvoltate aici cuprind o mutație triplă (abreviată aici ca „TM”) în regiunea Fc corespunzătoare mutației L234F/L235E/P331S dezvoltată în Oganessian și colab. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, (2008) 64: 700-704. Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltării poate fi un anticorp IgG1 TM sau fragment al acestuia de legare de antigen. Într-o altă variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltării poate cuprinde o regiune Fc având mutații YTE.

Într-o altă variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltării poate fi cuplat la o porțiune de transportor prin bariera hematoencefalică (BBB), în care porțiunea de transportor prin BBB este capabilă să transporte anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen, prin BBB.

Într-o variantă, porțiunea de transportor prin BBB poate fi un anticorp. Într-o variantă, anticorpul BBB poate forma un construct multispecific cu un anticorp anti-a-sinucleină sau fragment al acestuia de legare de antigen. Porțiunea de transportor prin BBB poate cuprinde o regiune determinantă de complementaritate 1 a lanțului greu variabil al imunoglobulinei (VH-CDR1), o regiune determinantă de complementaritate 2 a lanțului greu variabil al imunoglobulinei (VH-CDR2), o regiune determinantă de complementaritate 3 a lanțului greu variabil al imunoglobulinei (VH-CDR3), o regiune determinantă de

complementaritate 1 a lanțului ușor variabil al imunoglobulinei (VL-CDR1), o regiune determinantă de complementaritate 2 a lanțului ușor variabil al imunoglobulinei (VL-CDR2) și o regiune determinantă de complementaritate 3 a lanțului ușor variabil al imunoglobulinei (VL-CDR3); în care VH-CDR1 cuprinde SECV ID NR. 40 sau 49, VH-CDR2 cuprinde SECV ID NR. 41 sau 50, VH-CDR3 cuprinde SECV ID NR. 42 sau 51, VL-CDR1 cuprinde SECV ID NR. 36, 44 sau 53, VL-CDR2 cuprinde SECV ID NR. 37, 45 sau 54 și VL-CDR3 cuprinde SECV ID NR. 38, 46 sau 55.

În unele variante, porțiunea de transportor cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu al imunoglobulinei (VH) cuprinzând SECV ID NR: 47 sau SECV ID NR: 39. În unele variante, porțiunea de transportor cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor al imunoglobulinei (VL) cuprinzând SECV ID NR: 43.

În plus, porțiunea de transportor poate fi selectată dintr-un anticorp complet, un fragment Fv, un fragment Fab, un fragment Fab', un fragment F(ab')₂, un fragment legat de disulfură (dsFv), un fragment Fv cu lanț unic (scFv), un fragment sc(Fv)₂, un diacorp, un triacorp, un tetracorp, un minicorp și un anticorp cu lanț unic. Într-o variantă particulară, porțiunea de transportor cuprinde un fragment scFv cuprinzând un domeniu VH și un domeniu VL fuzionate împreună printr-un linker. În unele cazuri, linkerul poate fi (Gly4Ser)ⁿ (SECV ID NR: 56), în care n este un număr întreg pozitiv selectat din grupul constând din 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 și 10.

În unele variante, orice moleculă de transportor din prezenta dezvoltare poate fi combinată, așa cum s-a descris aici, cu orice moleculă de legare de alfa-sinucleină din prezenta dezvoltare pentru a furniza o moleculă de legare multispecifică din prezenta dezvoltare.

Prezenta dezvoltare furnizează anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare, așa cum s-a definit oriunde mai sus, pentru utilizare ca un medicament.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare, așa cum s-a definit oriunde mai sus pentru utilizare în profilaxia sau tratamentul unei α -sinucleinopatii.

Într-o variantă, α -sinucleinopatia este selectată dintre boala Parkinson (PD), demența cu corpi Lewy (DLB) și atrofia multisistemică (MSA).

Într-o variantă, α -sinucleinopatia este boala Parkinson (PD).

Prezenta dezvoltare furnizează o metodă de tratare sau prevenire a unei boli, în particular a unei boli asociate cu sistemul nervos central, la un pacient, metoda cuprinzând administrarea la pacient a anticorpului sau a fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare, așa cum s-a definit oriunde mai sus.

Într-o variantă, boala este o α -sinucleinopatie.

Într-o variantă, α -sinucleinopatia este selectată dintre boala Parkinson (PD), demența cu corpi Lewy (DLB) și atrofia multisistemică (MSA).

Într-o variantă, α -sinucleinopatia este boala Parkinson (PD).

Prezenta dezvoltare furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare, așa cum s-a definit oriunde mai sus, și un excipient acceptabil farmaceutic.

Expresia „excipient acceptabil farmaceutic” include oricare și toți solvenții, mediile de dispersie, învelișurile, agenții antibacterieni și agenții antifungici, agenții izotonici și agenții de întârziere a absorbției și alții asemenea, care sunt compatibili cu administrarea farmaceutică. Utilizarea de astfel de medii și agenți pentru substanțe active farmaceutice este binecunoscută în domeniu. Compozițiile pot conține, de asemenea, alți compuși activi care furnizează funcții terapeutice suplimentare, adiționale sau îmbunătățite. Compozițiile farmaceutice pot fi incluse, de asemenea, într-un recipient, ambalaj sau dozator împreună cu instrucțiuni pentru administrare.

O compoziție farmaceutică din prezenta dezvoltare este formulată pentru a fi compatibilă cu calea sa de administrare intenționată. Metodele pentru a realiza administrarea sunt cunoscute celor cu specializare obișnuită în domeniu. Administrarea poate fi, de exemplu, intravenoasă, intraperitoneală, intramusculară, intracavitară, subcutanată sau transdermică.

Prezenta dezvoltare furnizează o moleculă izolată de acid nucleic care codifică anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare, așa cum s-a definit oriunde mai sus.

Într-o variantă particulară, prezenta dezvoltare furnizează o moleculă izolată de acid nucleic cuprinzând SECV ID NR: 13 și/sau SECV ID NR: 18.

Într-o altă variantă particulară, prezenta dezvoltare furnizează o moleculă izolată de acid nucleic cuprinzând SECV ID NR: 23 și/sau SECV ID NR: 29.

Odată furnizate cu aceste informații, o persoană cu specializare în domeniu ar putea obține ușor molecule de acid nucleic care codifică anticorpii dezvoltării sau fragmente ale acestora de legare de antigen. Acizii nucleici pot cuprinde ADN sau ARN și pot fi sintetici sau recombinanți, complet sau parțial. Referirea la o secvență de nucleotide cuprinde o moleculă de ADN cu secvența specificată și

cuprinde o moleculă de ARN cu secvența specificată în care U substituie pe T, dacă contextul nu necesită altfel.

Moleculele de acizi nucleici din prezenta dezvoltare cuprind o secvență de codificare pentru o CDR, un domeniu VH și/sau un domeniu VL dezvoltate aici.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, structuri sub formă de plasmide, vectori, fagemide, casete de transcriere sau expresie care cuprind cel puțin o moleculă de acid nucleic care codifică anticorpii sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare, așa cum s-a definit oriunde mai sus, în particular care codifică o CDR, un domeniu VH și/sau un domeniu VL dezvoltate aici.

Dezvoltarea furnizează suplimentar o celulă gazdă care cuprinde una sau mai multe structuri precum mai sus.

De asemenea, sunt furnizați acizi nucleici care codifică oricare sau mai multe CDR (H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 sau L-CDR3), domeniul VH sau VL dezvoltate aici, precum și metode de realizare a produsilor codificați. Metoda cuprinde exprimarea produsului codificat din acidul nucleic codificator. Expresia poate fi realizată prin cultivarea în condiții adecvate a celulelor gazdă recombinante conținând acidul nucleic. După producerea prin expresie, pot fi izolate și/sau purificate un domeniu VH sau VL sau un membru specific de legare, utilizând orice tehnică adecvată, apoi utilizată după caz.

Fragmentele de legare de antigen, domeniile VH și/sau VL și moleculele și vectorii de acid nucleic codificator pot fi izolate și/sau purificate din mediul lor natural, în formă substanțial pură sau omogenă, sau, în cazul acidului nucleic, liber sau substanțial liber de acid nucleic sau gene de origine, alta decât secvența care codifică o polipeptidă cu funcția necesară.

Sistemele pentru clonarea și expresia unei polipeptide într-o varietate de celule gazdă diferite sunt binecunoscute în domeniu. Pentru celulele adecvate pentru producerea de anticorpi, a se vedea Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernandez și colab., 1999. Pe scurt, celulele gazdă adecvate includ bacterii, celule vegetale, celule de mamifere și drojdii și sisteme de baculovirus. Liniile de celule de mamifere disponibile în domeniu pentru expresia unei polipeptide heteroloage includ celule ovariene de hamster chinezesc, celule HeLa, celule de rinichi de pui de hamster, celule de mielom de șoarece NS0 și multe altele. O gazdă bacteriană comună este *E. coli*. Orice sistem de expresie a proteinei compatibil cu prezenta dezvoltare poate fi utilizat pentru a produce anticorpii dezvoltăți. Sistemele de expresie adecvate includ animale transgenice descrise în Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernandez și colab., 1999.

Vectorii adecvați pot fi aleși sau construiți, astfel încât aceștia să conțină secvențe reglatoare adecvate, incluzând secvențe promotor, secvențe terminator, secvențe de poliadenilare, secvențe de amplificare, gene marker și alte secvențe, după caz. Vectorii pot fi plasmide sau virali, de exemplu, fag sau fagemidă, după caz. Pentru detalii suplimentare, a se vedea, de exemplu, Sambrook și colab., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. a 2-a, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Multe tehnici și protocoale cunoscute pentru manipularea acidului nucleic, de exemplu, în pregătirea de structuri de acid nucleic, mutagenză, secvențiere, introducere de ADN în celule și expresie a genelor și analiza proteinelor, sunt descrise în detaliu în Current Protocols in Molecular Biology, ediția a II-a, eds. Ausubel și colab., John Wiley & Sons, 1992.

Un aspect suplimentar din dezvoltare furnizează o celulă gazdă cuprinzând un acid nucleic, așa cum s-a dezvoltat aici, în particular un vector cuprinzând o moleculă de acid nucleic care codifică anticorpii sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare, așa cum s-a definit oriunde mai sus.

Un aspect încă suplimentar furnizează o metodă cuprinzând introducerea unui astfel de acid nucleic într-o celulă gazdă. Introducerea poate utiliza orice tehnică disponibilă. Pentru celulele eucariote, tehnicile adecvate pot include transfecția cu fosfat de calciu, DEAE-dextran, electroporarea, transfecția mediată de lipozomi și transducția utilizând retrovirus sau alt virus, de exemplu, vaccinia sau, pentru celulele de insecte, baculovirusul. Pentru celulele bacteriene, tehnicile adecvate pot include transformarea cu clorură de calciu, electroporarea și transfecția utilizând bacteriofag. Introducerea acidului nucleic în celule poate fi urmată de provocarea sau permiterea expresiei din acidul nucleic, de exemplu, prin cultivarea celulelor gazdă în condiții pentru expresia genelor.

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR ȘI A LISTEI DE SECVENȚE

Prezenta dezvoltare va fi descrisă acum mai detaliat cu referire la figurile și lista de secvențe atașate, în care sunt prezentate:

Cheia pentru SECV ID NR:

Nume	Descriere	SECV ID NR:
alfa sinucleină umană	secvența de aminoacizi	1
asyn0087	Secvența de aminoacizi a VH	2
	Secvența de aminoacizi a VL	3
Secvența generală a unui anticorp derivat din asyn0087	Secvența de aminoacizi a VH	4
	Secvența de aminoacizi a H-CDR1	5
	Secvența de aminoacizi a H-CDR2	6
	Secvența de aminoacizi a H-CDR3	7
	Secvența de aminoacizi a VL	8
	Secvența de aminoacizi a L-CDR1	9
	Secvența de aminoacizi a L-DR2	10
	Secvența de aminoacizi a L-CDR3	11
aslo0452 ngl-3	Secvența de aminoacizi a lanțului greu	12
	Secvența de nucleotide a VH	13
	Secvența de aminoacizi a VH	14
	Secvența de aminoacizi a H-CDR1	5
	Secvența de aminoacizi a H-CDR2	15
	Secvența de aminoacizi a H-CDR3	16
	Secvența de aminoacizi a lanțului ușor	17
	Secvența de nucleotide a VL	18
	Secvența de aminoacizi a VL	19
	Secvența de aminoacizi a L-CDR1	20
	Secvența de aminoacizi a L-CDR2	10
	Secvența de aminoacizi a L-CDR3	21
aslo0543	Secvența de aminoacizi a lanțului greu	22
	Secvența de nucleotide a VH	23
	Secvența de aminoacizi a VH	24
	Secvența de aminoacizi a H-CDR1	25
	Secvența de aminoacizi a H-CDR2	26
	Secvența de aminoacizi a H-CDR3	27
	Secvența de aminoacizi a lanțului ușor	28
	Secvența de nucleotide a VL	29
	Secvența de aminoacizi a VL	30
	Secvența de aminoacizi a L-CDR1	31
	Secvența de aminoacizi a L-CDR2	32
	Secvența de aminoacizi a L-CDR3	33
Transportor general prin BBB	Secvența de aminoacizi a VH	34
	Secvența de aminoacizi a VL	35
	Secvența de aminoacizi a L-CDR1	36
	Secvența de aminoacizi a L-CDR2	37
	Secvența de aminoacizi a L-CDR3	38
BBBt0626gl	Secvența de aminoacizi a VH	39
	Secvența de aminoacizi a H-CDR1	40
	Secvența de aminoacizi a H-CDR2	41

Nume	Descriere	SECV ID NR:
	Secvența de aminoacizi a H-CDR3	42
	Secvența de aminoacizi a VL	43
	Secvența de aminoacizi a L-CDR1	44
	Secvența de aminoacizi a L-CDR2	45
	Secvența de aminoacizi a L-CDR3	46
BBBt0626	Secvența de aminoacizi a VH	47
	Secvența de aminoacizi a H-CDR1	40
	Secvența de aminoacizi a H-CDR2	41
	Secvența de aminoacizi a H-CDR3	42
	Secvența de aminoacizi a VL	43
	Secvența de aminoacizi a L-CDR1	44
	Secvența de aminoacizi a L-CDR2	45
	Secvența de aminoacizi a L-CDR3	46
BBBt0632gl	Secvența de aminoacizi a VH	48
	Secvența de aminoacizi a H-CDR1	49
	Secvența de aminoacizi a H-CDR2	50
	Secvența de aminoacizi a H-CDR3	51
	Secvența de aminoacizi a VL	52
	Secvența de aminoacizi a L-CDR1	52
	Secvența de aminoacizi a L-CDR2	54
	Secvența de aminoacizi a L-CDR3	55

Legendele figurilor:

5

Tabelul 1: Determinarea afinității anticorpilor cheie anti- α -sinucleină pentru α -syn umană efectuată pe două platforme de măsurare a afinității.

Figura 1: Schema testului HTRF®.

10

Figura 2: Compararea secvențelor de aminoacizi ale regiunii variabile a lanțului greu (VH) al asyn0087, aslo0452ngl-3 și aslo0543 (SECV ID NR: 2, 14 și, respectiv, 24) și regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) (SECV ID NR: 3, 19, și, respectiv, 30). Aminoacizii subliniați corespund CDR-urilor.

15

Figurile 3A-3D: Secvența de nucleotide și de aminoacizi a aslo0452 ngl-3. Figurile 3A și 3B prezintă secvențele de nucleotide și, respectiv, de aminoacizi ale lanțului greu variabil și ale lanțului ușor variabil ale aslo0452 ngl-3. Figura 3A dezvăluie SECV ID Nr: 13 și, respectiv, 14, în ordinea apariției. Figura 3B dezvăluie SECV ID Nr: 18 și, respectiv, 19, în ordinea apariției. Figurile 3C și 3D prezintă alinierea acestor secvențe la cele mai apropiate secvențe ale liniei germinale umane. Figura 3C prezintă alinierea secvenței de aminoacizi a domeniului variabil al lanțului greu al aslo0452 ngl-3 (SECV ID NR: 14) la secvențele liniei germinale IGHV3-23 (SECV ID NR: 58) și JH6 (SECV ID NR: 59). Figura 3D prezintă alinierea secvenței de aminoacizi a domeniului variabil al lanțului ușor al aslo0452 ngl-3 (SECV ID NR: 19) la secvențele liniei germinale IGLV5-45 (SECV ID NR: 60) și JL2 (SECV ID NR: 61), 3. Regiunile determinante de complementaritate (CDR) sunt subliniate și marcate. Diferențele față de linia germinală sunt evidențiate cu caractere aldine și subliniate. Toate reziduurile non-Vernier din regiunile cadru ale lanțului ușor sunt aminoacizi ai liniei germinale umane. Reziduurile Vernier (*) nu au fost modificate pentru a se potrivi cu aminoacizii liniei germinale.

20

25

Figurile 4A și 4B: Legarea epitopului clonelor principale izolate utilizând un panou de trunchieri de α -syn. Godeurile ELISA sunt acoperite cu un interval de trunchiuri de α -syn disponibile comercial, reprezentând diferitele regiuni definite ale proteinei: 1-140: α -syn cu lungime completă, 1-60: doar regiunea N-terminală, 61-140: componenta non-amiloidică a plăcilor (NAC) plus regiunea C-terminală, 1-95: regiunile N-terminale și NAC, 96-140: doar regiunea C-terminală, Δ NAC: regiunea NAC eliminată, NCAP: este o formă matisată alternativ de α -syn cu aminoacizii 103-129 absenți (rPeptide). Anticorpilor primari utilizați pentru detectare au fost (Figura 4A) Asyn087 și (Figura 4B) Aslo0452 ngl-3 (coloane negre), aslo0543 (coloane gri deschis) și martorul izotip NIP228 potrivit (coloane gri închis). Legarea este detectată fie cu anticorp secundar IgG Eu³⁺ anti-uman (Figura 4A) sau un anticorp secundar IgG-HRP anti-uman (Figura 4B).

Figura 5: Specificitatea aslo0452 ngl-3 și aslo0543 pentru α -syn în raport cu membrii familiei sinucleinei utilizând un test de competiție cu epitopii

DELFA. Utilizând testul HTRF de competiție cu epitopii, specificitatea clonelor aslo0452 ngl-3 și aslo0543 cu afinitate optimizată pentru α -syn a fost determinată prin titrarea α -syn, β -syn și γ -syn nemarcate. Din aceasta, au fost determinate valorile IC₅₀.

Figura 6: Specificitatea aslo0452 ngl-3 și aslo0543 pentru α -syn uman, de maimuță cynomolgus și de șobolan utilizând un test HTRF de competiție cu epitopii. Utilizând HTRF de competiție cu epitopii, profilul de reactivitate încrucișată a speciilor clonelor cu afinitate optimizată a fost determinat într-un test similar prin titrarea α -syn nemarcată și derivarea valorilor IC₅₀ pentru fiecare specie de α -syn.

Figurile 7A și 7B: Rezultate reprezentative ale citometriei în flux care demonstrează că clonele cu afinitate optimizată se leagă de α -syn umană nativă într-o linie de celule de neuroblastom uman.

Panourile A, C, E și G din figurile 7A și 7B prezintă legarea la linia de celule de cancer de sân uman negativă pentru α -syn, BT20. Panourile B, D, F și H din figurile 7A și 7B prezintă legarea de linia de celule de neuroblastom uman pozitivă pentru α -syn, SHSY5Y. Figura 7A: anticorpilor umani primari utilizați în acest studiu au fost asyn0087 și martorul Hu IgG. Legarea anticorpilor umani a fost detectată utilizând un IgG-FITC secundar anti-uman (Jackson). Figura 7B: anticorpilor umani primari utilizați în acest studiu au fost aslo0452 ngl-3, aslo0543 și martorul IgG1 TM potrivit cu izotipul NIP228. Legarea anticorpilor umani a fost detectată utilizând un IgG-FITC secundar anti-uman (Jackson). Anticorpilor primari de șoarece utilizați au fost 4D6 (Covance) și un martor negativ potrivit cu izotipul (R&D Systems). Legarea anticorpilor de șoarece a fost detectată utilizând un IgG-FITC secundar anti-șoarece (Sigma).

Figura 8: Specificitatea IgG-urilor anti- α -syn optimizate pentru α -syn umană agregată prin DELFA ELISA. Graficul prezintă că aslo0452 ngl-3 și aslo0543, două clonele specifice cu mare afinitate pentru α -syn și anticorpul principal asyn0087 au detectat forme agregate captate de α -syn (coloane negre), dar nu au detectat α -syn monomeric captat.

Figurile 9A-9C: Specificitatea clonelor cu afinitate optimizată în țesuturile relevante pentru boală prin imunohistochimie. Figurile 9A, 9B și 9C prezintă colorarea cu aslo0452 ngl-3, asyn0087 și, respectiv, aslo0543. Panourile A, B și C prezintă colorarea cu aslo0452 ngl-3 atât a corpiilor Lewy (panourile A și B), cât și a neuronilor Lewy (panoul C) din substanța neagră din țesutul creierului cu PD. Panoul D prezintă aslo0452 ngl-3 prezintă colorare cu nivel scăzut a α -syn în celulele din cortexul temporal într-o secțiune de creier normal. Panourile E, F și G prezintă colorarea cu aslo0452 ngl-3 a corpiilor Lewy, neuronilor Lewy și punctelor Lewy din amigdala din țesutul creierului cu PD. Panoul H prezintă un anticorp martor potrivit cu izotipul care demonstrează nicio colorare în amigdala din țesutul creierului cu PD. Panourile I până la M prezintă colorarea cu asyn0087 a locusului coeruleus din țesutul creierului cu PD; caracteristicile patologice identificate sunt corpii Lewy (panoul I și L), agregatele neuronale (panoul J), neuronii Lewy (panoul K) și corpii Pale (panoul M). Panourile N și O prezintă colorarea cu aslo0543 a corpiilor Lewy și neuronilor Lewy din substanța neagră din țesutul creierului cu PD. Panoul P prezintă colorarea cu nivel scăzut a α -syn în celulele din cortexul temporal într-o secțiune de creier normal.

Figurile 10A și 10B: Administrarea sistemică a aslo0452 ngl-3 scade rapid nivelurile de asyn liberă în cortexul prefrontal al șobolanilor. Concentrația α -sinucleină liberă medie $\pm$ SEM absolută (Figura 10A) sau relativă (Figura 10B) din ISF de șobolani tratați cu aslo0452 ngl-3 (30 mg/kg intravenos; simboluri închise) sau vehicul (simboluri deschise).

Figurile 11A și 11B: Doza de Aslo0452 ngl-3 și în funcție de timp scade nivelurile de asină liberă în LCR la șobolani la administrare sistemică. Media $\pm$ SEM absolută (Figura 11A) sau relativă (Figura 11B) α -sinucleină liberă în LCR de șobolani tratați cu aslo0452 ngl-3 (3, 10, 30, 100 mg/kg intravenos; simboluri închise) sau vehicul (simboluri deschise).

Figurile 12A-12C: Anticorpul anti-alfa-sinucleină aslo0452 ngl-3 și aslo0452 ngl-3-D265A blochează răspândirea alfa-sinucleinei ipsilateral către contralateral. (Figura 12A): șoarecii non-tg injectați cu LV- α -syn în hipocampus drept (săgeți negre) au fost imunizați pasiv cu doze săptămânale de anticorpi IgG1 de șoarece anti-alfa-sinucleină: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4 sau cu anticorp martor izotip NIP228, pentru 13 săptămâni, urmat de determinarea răspândirii alfa-sinucleinei prin imunocitochimie cu SYN-1 și analiza automată a imaginii. (Figura 12B): Cuantificarea datelor de imunoreactivitate a alfa-sinucleinei obținute din analiza imunocitochimică a secțiunilor coronale hipocampale ipsilaterale reprezentate în A. Fiecare coloană este valoarea medie $\pm$ SEM a 10 tratamente independente cu anticorpi (n=10 șoareci per grup de tratament cu anticorpi). *P<0,05 față de NIP228; ANOVA într-un singur sens cu post-testul lui Dunnett. (Figura 12C): Cuantificarea datelor de imunoreactivitate a alfa-sinucleinei obținute din analiza imunocitochimică a secțiunilor coronale hipocampale contralaterale reprezentate în panoul A. Fiecare coloană este valoarea medie $\pm$ SEM a 10 tratamente independente cu anticorpi (n=10 șoareci per grup de tratament cu anticorpi). *P<0,05 față de NIP228; ANOVA într-un singur sens cu post-testul lui Dunnett.

Figurile 13A-13C: Anticorpul anti-alfa-sinucleină aslo0452 ngl-3 și aslo0452 ngl-3-D265A reduc depunerea și diseminarea alfa-sinucleinei exprimată lentiviral de-a lungul axonilor. (Figura 13A): șoarecii non-tg injectați cu LV- α -syn în hipocampus drept au fost imunizați pasiv cu doze săptămânale de anticorpi IgG1 de șoarece anti-alfa-sinucleină: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4 sau cu anticorp martor izotip NIP228, pentru 13 săptămâni, urmat de analiza imunocitochimică a depozitelor de alfa-sinucleină de-a lungul axonilor trans-hipocampali ipsilaterali și contralaterali (săgeți negre). (Figura 13B): Cuantificarea depozitelor de alfa-sinucleină axonală ipsilaterală determinată prin imunocitochimie cu SYN-1 și analiza automată a imaginii. Fiecare coloană este valoarea medie $\pm$ SEM a 10 tratamente independente cu anticorpi (n=10 șoareci per grup de tratament cu anticorpi). *P<0,05 vs NIP228; ANOVA într-un singur sens cu post-testul lui Dunnett. (Figura 13C): Cuantificarea depozitelor de alfa-sinucleină axonală contralaterală determinată prin imunocitochimie cu SYN-1 și analiza automată a imaginii. Fiecare coloană este valoarea medie $\pm$ SEM a 10 tratamente independente cu anticorpi (n=10 șoareci per grup de tratament cu anticorpi). *P<0,05 vs NIP228; ANOVA într-un singur sens cu post-testul lui Dunnett.

Figurile 14A-14C: Anticorpul anti-alfa-sinucleină aslo0452 ngl-3 și aslo0452 ngl-3-D265A reduc depunerea de alfa-sinucleină în neuronii hipocampali CA1 și neuronii neocorticali din stratul 5. (Figura 14A): Șoarecii non-tg injectați cu LV- α -syn în hipocampus drept au fost imunizați pasiv cu doze săptămânale de anticorpi IgG1 de șoarece anti-alfa-sinucleină: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4 sau cu anticorp martor izotip NIP228, pentru 13 săptămâni, urmat de analiza imunocitochimică a depozitelor de alfa-sinucleină în neuronii hipocampali CA1 ipsilaterali și neuronii neocorticali din stratul 5 ipsilateral (săgeți negre). (Figura 14B): Cuantificarea depozitelor de alfa-sinucleină din neuronii neocorticali din stratul 5 ipsilateral determinată prin imunocitochimie cu SYN-1 și analiza automată a imaginii. Datele prezentate reprezintă numărul de celule pozitive pentru alfa-sinucleină (neuroni) per 0,1 mm². Fiecare coloană este valoarea medie $\pm$ SEM a 10 tratamente independente cu anticorpi (n=10 șoareci per grup de tratament cu anticorpi). *P<0,05 vs NIP228; ANOVA într-un singur sens cu post-testul lui Dunnett. (Figura 14C): Cuantificarea depozitelor de alfa-sinucleină din neuronii hipocampali CA1 ipsilaterali determinată prin imunocitochimie cu SYN-1 și analiza automată a imaginii. Datele prezentate reprezintă numărul de celule pozitive pentru alfa-sinucleină (neuroni) per 0,1 mm². Fiecare coloană este valoarea medie $\pm$ SEM a 10 tratamente independente cu anticorpi (n=10 șoareci per grup de tratament cu anticorpi). *P<0,05 vs NIP228; ANOVA într-un singur sens cu post-testul lui Dunnett.

Figurile 15A-15C: anticorpul aslo0452 ngl-3 și aslo0452 ngl-3-D265A blochează răspândirea alfa-sinucleinei la șoarecii transgenici cu alfa-sinucleină. (Figura 15A): șoarecii tg cu α -syn injectați cu LV- α -syn în hipocampus drept (săgeți negre) au fost imunizați pasiv cu doze săptămânale de anticorpi IgG1 de șoarece anti-alfa-sinucleină: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4 sau cu anticorp martor izotip NIP228, pentru 13 săptămâni, urmat de determinarea răspândirii alfa-sinucleinei prin imunocitochimie cu SYN-1 și analiza automată a imaginii. (Figura 15B): Cuantificarea datelor de imunoreactivitate a alfa-sinucleinei obținute din analiza imunocitochimică a secțiunilor coronale hipocampale ipsilaterale reprezentate în panoul A. Fiecare coloană este valoarea medie $\pm$ SEM a 10 tratamente independente cu anticorpi (n=10 șoareci per grup de tratament cu anticorpi). *P<0,05 vs NIP228; ANOVA într-un singur

sens cu post-testul lui Dunnett. (Figura 15C): Cuantificarea datelor de imunoreactivitate a alfa-sinucleinei obținute din analiza imunocitochimică a secțiunilor coronale hipocampale contralaterale reprezentate în panoul A. Fiecare coloană este valoarea medie $\pm$ SEM a 10 tratamente independente cu anticorpi (n=10 șoareci per grup de tratament cu anticorpi). *P<0,05 vs NIP228; ANOVA într-un singur sens cu post-testul lui Dunnett.

Figurile 16A-16C: anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0452 ngl-3-D265A reduc depunerea și diseminarea alfa-sinucleinei exprimate lentiviral de-a lungul axonilor la șoarecii transgenici. (Figura 16A): șoarecii tg cu α -syn injectați cu LV- α -syn în hipocampus drept au fost imunizați pasiv cu doze săptămânale de anticorpi IgG1 de șoarece anti-alfa-sinucleină: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D2645A, 9E4 sau cu anticorp martor izotip NIP228, pentru 13 săptămâni, urmat de analiza imunocitochimică a depozitelor de alfa-sinucleină de-a lungul axonilor transhipocampali ipsilaterali și contralaterali (săgeți negre). (Figura 16B): Cuantificarea depozitelor de alfa-sinucleină axonală ipsilaterală determinată prin imunocitochimie cu SYN-1 și analiza automată a imaginii. Fiecare coloană este valoarea medie $\pm$ SEM a 10 tratamente independente cu anticorpi (n=10 șoareci per grup de tratament cu anticorpi). *P<0,05 vs NIP228; ANOVA într-un singur sens cu post-testul lui Dunnett. (Figura 16C): Cuantificarea depozitelor de alfa-sinucleină axonală contralaterală determinată prin imunocitochimie cu SYN-1 și analiza automată a imaginii. Fiecare coloană este valoarea medie $\pm$ SEM a 10 tratamente independente cu anticorpi (n=10 șoareci per grup de tratament cu anticorpi). *P<0,05 vs NIP228; ANOVA într-un singur sens cu post-testul lui Dunnett.

Figurile 17A-17D: anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0452 ngl-3-D265A reduc depunerea de alfa-sinucleină în neuronii hipocampali CA1 și neuronii neocorticali din stratul 5 la șoarecii transgenici cu alfa-sinucleină. (Figura 17A): șoarecii tg cu α -syn injectați cu LV- α -syn în hipocampus drept au fost imunizați pasiv cu doze săptămânale de anticorpi IgG1 de șoarece anti-alfa-sinucleină: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D2645A, 9E4 sau cu anticorp martor izotip NIP228, pentru 13 săptămâni, urmat de analiza imunocitochimică a depozitelor de alfa-sinucleină în neuronii hipocampali CA1 ipsilaterali și neuronii neocorticali din stratul 5 ipsilateral (săgeți negre). (Figura 17B): Cuantificarea depozitelor de alfa-sinucleină în neuronii neocorticali din stratul ipsilateral 5 determinată prin imunocitochimie cu SYN-1 și analiza automată a imaginii. Datele prezentate reprezintă numărul de celule pozitive pentru alfa-sinucleină (neuroni) per 0,1 mm². Fiecare coloană este valoarea medie $\pm$ SEM a 10 tratamente independente cu anticorpi (n=10 șoareci per grup de tratament cu anticorpi). *P<0,05 vs NIP228; ANOVA într-un singur sens cu post-testul lui Dunnett. (Figura 17C): Cuantificarea depozitelor de alfa-sinucleină în neuronii hipocampali CA1 ipsilaterali determinată prin imunocitochimie cu SYN-1 și analiza automată a imaginii. Datele prezentate reprezintă numărul de celule pozitive pentru alfa-sinucleină (neuroni) per 0,1 mm². Fiecare coloană este valoarea medie $\pm$ SEM a 10 tratamente independente cu anticorpi (n=10 șoareci per grup de tratament cu anticorpi). *P<0,05 vs NIP228; ANOVA într-un singur sens cu post-testul lui Dunnett. (Figura 17D): Cuantificarea depozitelor de alfa-sinucleină în neuronii hipocampali CA1 contralaterali determinată prin imunocitochimie cu SYN-1 și analiza automată a imaginii. Datele prezentate reprezintă numărul de celule pozitive pentru alfa-sinucleină (neuroni) per 0,1 mm². Fiecare coloană este valoarea medie $\pm$ SEM a 10 tratamente independente cu anticorpi (n=10 șoareci per grup de tratament cu anticorpi). *P<0,05 vs NIP228; ANOVA într-un singur sens cu post-testul lui Dunnett.

Figura 18 Competiția cu epitopii a aslo452-ngl3-hlgG1TM cu BBBt0626gl-ScFv-Bs2-also0452-ngl-3-hlgG1TM demonstrează într-un test HTRF că încorporarea unei porțiuni BBB nu modifică specificitatea de legare a aslo452-ngl3-hlgG1TM. Anticorpul anti-alfa-sinucleină marcat cu Dylight650, aslo0452hgl3-hlgG1TM se leagă de alfa sinucleina biotinilată care, la rândul său, este legată de streptavidina marcată cu criptat. După excitarea criptatului are loc un transfer de energie (FRET) și atunci când este în prezența aslo0452hgl3-hlgG1TM marcat cu dylight650, dylight650 este excitat și are ca rezultat o fluorescență. Dacă este prezent un concurent pentru IgG, atunci legarea aslo0452 marcat cu dylight650 este blocată și excitarea aslo0452 marcat cu dylight650 este prevenită, având ca rezultat o scădere a semnalului fluorescent. Aslo0452 și Bbbt0626-Bs2-also0452 hlgG1TM nemarcate ambele sunt capabile să concureze în mod similar cu aslo0452-ngl3-hlgG1TM marcat cu dylight650.

Figura 19 Legarea de celulele endoteliale ale creierului de șoarece a BBBt0626gl-BS2-aslo452-ngl-3-hlgG1TM demonstrează cuplarea țintă eficientă a porțiunii BBB atunci când este cuplată la aslo452-ngl3-hlgG1TM. Tehnologiile FMAT (Tehnologia testului de fluorescență în microvolume) sau de test Mirror-ball au fost ambele utilizate pentru a determina legarea specifică a anticorpilor de celulele endoteliale ale creierului. Acest test măsoară legarea IgG-urilor umane de celulele endoteliale ale creierului de șoarece (b.End3). Celulele B.End3 sunt legate în mod similar de Bbbt0626 hlgG1TM, Bbbt0626glscFv-Bs2-

aslo0452-hlgG1TM și Bbbt0626glscFv-Bs2-NIP228 hlgG1TM, dar nu de anticorpusul martor NIPG228 hlgG1TM. Această legare este detectată cu un mAb de șoarece anti-Fc (specific uman) care, la rândul său, este detectat cu un Fc de capră anti-șoarece marcat cu Alexafluor647.

5 DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Prezenta dezvoltare este bazată pe descoperirea surprinzătoare și neașteptată a anticorpilor aslo0452 ngl-3 și aslo0543. Această descoperire a condus la un nou grup de anticorpi având caracteristici împărtășite de anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0543, precum și subgrupuri de anticorpi având caracteristici de aslo0452 ngl-3 și, respectiv, aslo0543.

Într-o variantă, anticorpusul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare derivă din anticorpusul asyn0087 cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu (VH) al secvenței de aminoacizi din SECV ID NR: 2 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) al secvenței de aminoacizi SECV ID NR: 3, așa cum s-a dezvoltat aici.

Într-o variantă particulară, anticorpusul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare derivă din anticorpusul asyn0087, în care anticorpusul sau fragmentul de legare de antigen menționat are o K_D de mai puțin de 500 nM și leagă același epitop precum oricare dintre anticorpii asyn0087, aslo0452 ngl-3 și aslo0543, descriși aici.

Precum anticorpii asyn0087, aslo0452 ngl-3 și aslo0543 leagă regiunea C-terminală (reziduurile 96-140) a α -sinucleinei umane. Mai specific, anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0543 sau fragmentul acestora de legare de antigen leagă regiunea cuprinsă între aproximativ aminoacidul 102 și aproximativ aminoacidul 130 al α -sinucleinei umane (de exemplu, SECV ID NR: 1). În unele variante, oricare dintre anticorpii sau fragmentele de legare de antigen dezvoltate aici leagă regiunea cuprinsă între aproximativ aminoacidul 120 și aproximativ 130 a α -sinucleinei umane (de exemplu, SECV ID NR: 1). În unele variante, oricare dintre anticorpii sau fragmentele de legare de antigen dezvoltate aici leagă un epitop care nu este același epitop cu epitopul legat de anticorpusul 9E4.

Anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0543 sunt selectivi pentru α -sinucleină. Anticorpusul sau fragmentul acestuia de legare de antigen nu se leagă de alți membri ai familiei sinucleinei, precum β -sinucleina sau γ -sinucleina. Mai specific, anticorpusul sau fragmentul acestuia de legare de antigen este specific pentru α -sinucleina umană.

Anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0543 se leagă de alfa-sinucleina umană, de șobolan sau de cynomolgus. Capacitatea aslo0452 ngl-3 și aslo0543 de a se lega de alfa-sinucleina umană, de maimuță cynomolgus și de șobolan indică legarea de un epitop diferit pe alfa-sinucleina umană în comparație cu anticorpii care nu se leagă de alfa-sinucleina umană, de maimuță cynomolgus și de șobolan. Anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0543 sunt capabili astfel să fie utilizați pentru evaluarea și investigarea *in vivo* a siguranței la modelele de boală de maimuță cynomolgus și de șobolan.

Anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0543 se leagă de α -sinucleina umană cu afinitate ridicată. Anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0543 se leagă de alfa-sinucleină cu o K_D de mai puțin de 500 picomolar (pM), mai puțin de 400 pM, mai puțin de 300 pM, mai puțin de 150 pM, mai puțin de 120 pM, mai puțin de 115 pM, mai puțin de 110 pM sau 106 pM sau mai puțin, așa cum s-a măsurat, de exemplu, utilizând analiza Octet (a se vedea, de exemplu, Exemplul 9). Anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0543 se leagă de alfa-sinucleină cu o K_D de mai puțin de 300 pM, mai puțin de 250 pM, mai puțin de 200 pM, mai puțin de 150 pM, mai puțin de 120 pM, mai puțin de 110 pM sau 108 pM, mai puțin de 100 pM, mai puțin de 80 pM sau 74 pM sau mai puțin, așa cum s-a măsurat, de exemplu, utilizând analiza KinExA (pentru un protocol de analiză KinExA de referință, a se vedea, de exemplu, Exemplul 9).

Fragmentul Fab al aslo0452 ngl-3 se leagă de α -sinucleina umană cu afinitate ridicată. Fragmentul Fab al aslo0452 ngl-3 se leagă de alfa-sinucleină cu o K_D de mai puțin de 300 pM, mai puțin de 200 pM, mai puțin de 180 pM, 174 pM sau mai puțin, așa cum s-a măsurat, de exemplu, utilizând analiza KinExA (a se vedea, de exemplu, Exemplul 9.3).

Anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0543 se leagă de α -sinucleina umană endogenă nativă. Anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0543 se leagă de agregate de α -sinucleină umană. În particular, anticorpii se leagă prin urmare de un epitop care nu este necesar pentru agregare. Anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0543 sunt capabili să izoleze atât formele monomerice, cât și cele agregate ale alfa-sinucleinei. Anticorpusul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este capabil să lege formele monomerice și agregate ale alfa-sinucleinei.

Anticorpii aslo0452 ngl-3 și aslo0543 leagă forme patologice relevante pentru boală ale α -sinucleinei, de exemplu, corpii Lewy, neuritii Lewy, punctele Lewy în țesuturile creierului cu boală Parkinson. Este observată o colorare minimă în creierul normal (fără boală).

Anticorpusul aslo0452 ngl-3 reduce nivelurile de α -sinucleină din lichidul interstițial al creierului. În particular, anticorpusul aslo0452 ngl-3 reduce nivelurile de α -sinucleină liberă nelegată din lichidul interstițial al creierului.

Anticorpul aslo0452 ngl-3 reduce nivelurile de α -sinucleină din lichidul cefalorahidian. În particular, anticorpul aslo0452 ngl-3 reduce nivelurile de α -sinucleină liberă nelegată din lichidul cefalorahidian. Anticorpul aslo0452 ngl-3 reduce răspândirea α -sinucleinei *in vivo*. Această nouă funcție de inhibare a răspândirii alfa-sinucleinei indică legarea de un epitop diferit pe alfa-sinucleina umană în comparație cu anticorpii care nu inhibă răspândirea.

În unele variante, oricare dintre anticorpii sau fragmentele acestora de legare de antigen dezvoltate aici au oricare sau mai multe dintre proprietățile funcționale ale aslo0452 ngl-3, de exemplu, oricare dintre proprietățile funcționale ale aslo0452 ngl-3 menționate aici. În unele variante, oricare dintre anticorpii sau fragmentele acestora de legare de antigen dezvoltate aici au oricare sau mai multe dintre proprietățile funcționale ale aslo0543, de exemplu, oricare dintre proprietățile funcționale ale aslo0543 menționate aici.

Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare concurează cu anticorpul aslo0452 ngl-3 și/sau aslo0543 pentru legarea de α -sinucleina umană. Într-o altă variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare se leagă de același epitop pe α -sinucleina umană precum anticorpul aslo0452 ngl-3 și/sau aslo0543.

Poate fi determinat ușor dacă un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen se leagă de epitopul anticorpului sau al fragmentului de legare de antigen de referință, așa cum s-a definit mai sus. Astfel de metode sunt o chestiune de rutină în domeniu. De exemplu, un anticorp poate fi comparat cu altul prin test de competiție biochimică, prin care doi anticorpi (unul marcat pentru detectarea intenționată și unul nu) sunt incubati simultan cu un antigen dat. Dacă este obținut un semnal de legare pentru anticorpul marcat, atunci se spune că cei doi anticorpi recunosc epitopi diferiți, care nu se suprapun pe proteina de interes. Dacă nu este obținut niciun semnal de legare, atunci, dimpotrivă, aceștia ar fi caracterizați ca având epitopi suprapuși pe secvența proteinei, deoarece legarea unui anticorp împiedică steric legarea celui de-al doilea anticorp. Suplimentar, locația aminoacizilor unui epitop dat poate fi, de asemenea, identificată utilizând proteine modificate, precum trunchieri, secvențe de peptide liniare derivate din secvența amino primară de antigen, specii ortoloage și prin digestie proteolitică și analiza spec de masă a unui anticorp legat de o proteină dată. Aceste metodologii servesc la generarea unei regiuni de interacțiune între anticorp și antigen.

Experimentarea de rutină suplimentară (precum mutația peptidelor și analizele de legare) pot fi efectuate pentru a confirma dacă orice lipsă observată de legare este datorată de fapt legării epitopului din prezenta dezvoltare sau dacă un alt fenomen (precum împiedicarea sterică) este responsabil. Astfel de experimente pot fi efectuate utilizând ELISA, RIA, Biacore, citometrie în flux sau alte teste de legare a anticorpilor cunoscute.

De exemplu, pentru maparea exactă a unui epitop specific, pot fi derivate modele matematice ale interfeței epitop:paratop din datele generate prin rezolvarea structurii complexului antigen:anticorp utilizând o metodă de imagistică cu rezoluție ridicată, precum co-cristalizarea cu difracție de raze X. Pentru a confirma relevanța modelului matematic derivat, în ceea ce privește identificarea reziduurilor de contact cheie care definesc epitopul, mutageneza punctiformă a antigenului trebuie efectuată ulterior și stabilită o analiză a efectului asupra forței legării dintre antigen și anticorp provocată de astfel de mutații. Utilizând această combinație de metode, poate fi stabilită o hartă exactă a reziduurilor de contact cheie cuprinzând epitopul.

Anticorpii sau fragmentele acestora de legare de antigen care se leagă de epitopul anticorpului sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare pot fi generați prin producerea de variante ale anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare. Astfel de variante de anticorpi sau fragmente ale acestora de legare de antigen pot avea CDR-uri care împărtășesc un nivel ridicat de identitate cu CDR-urile anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare. De exemplu, în unele variante, oricare dintre CDR-urile dezvoltate aici ale oricăruia dintre anticorpii sau fragmentele de legare de antigen dezvoltate aici poate diferi prin 1 sau 2 reziduuri de aminoacizi în comparație cu oricare sau mai multe dintre secvențele CDR specifice la care se face referire aici (*de exemplu*, oricare sau mai multe dintre CDR-uri având SECV ID NR: 5, 15, 16, 20, 10 și 21). În plus, astfel de anticorpi pot avea una sau mai multe variații (de exemplu, o substituție conservatoare de aminoacizi) în regiunile cadru.

Într-o variantă, anticorpii sau fragmentele acestora de legare de antigen din prezenta dezvoltare au variații ale secvențelor de aminoacizi ale CDR care mențin cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% și până la 99% identitate de secvență cu CDR-urile anticorpului aslo0452 ngl-3.

În particular, sunt studiate substituții conservatoare de aminoacizi. Înlocuirile conservatoare sunt cele care au loc într-o familie de aminoacizi care au lanțuri laterale înrudite. Aminoacizii codificați genetic sunt împărțiți în general în familii: (1) acide: aspartat, glutamat; (2) baze: lizină, arginină, histidină; (3) non-polare: alanină, valină, leucină, izoleucină, prolină, fenilalanină, metionină, triptofan; și (4) polare neîncărcate: glicină, asparagină, glutamină, cisteină, serină, treonină, tirozină. Aceste familii

pot fi clasificate suplimentar: serina și treonina sunt o familie hidroxi-alifatică; asparagina și glutamina sunt o familie conținând amide; alanina, valina, leucina și izoleucina sunt o familie alifatică; iar fenilalanina, triptofanul și tirozina sunt o familie aromatică. Astfel, în general, ne-am putea aștepta ca o înlocuire izolată a unei leucine cu o izoleucină sau valină, un aspartat cu un glutamat, o treonină cu o serină sau o înlocuire similară a unui aminoacid cu un aminoacid înrudit structural, să nu aibă un efect major asupra funcției sau proprietăților de legare ale anticorpului rezultat, în special dacă înlocuirea nu implică un aminoacid într-un situs al CDR.

Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltării cuprinde cel puțin o CDR selectată dintre:

- (i) H-CDR1 din SECV ID NR: 5,
- (ii) H-CDR2 din SECV ID NR: 6,
- (iii) H-CDR3 din SECV ID NR: 7,
- (iv) L-CDR1 din SECV ID NR: 9,
- (v) L-CDR2 din SECV ID NR: 10,
- (vi) L-CDR3 din SECV ID NR: 11.

Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare are cel puțin o CDR selectată dintre CDR-urile anticorpului aslo0452 ngl-3, adică cel puțin o CDR selectată din oricare dintre SECV ID NR: 5, SECV ID NR: 15, SECV ID NR: 16, SECV ID NR: 20, SECV ID NR: 10, SECV ID NR: 21.

Într-o altă variantă, CDR3 a lanțului greu al anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este CDR3 a lanțului greu al anticorpului aslo0452 ngl-3; și/sau CDR3 a lanțului ușor al anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este CDR3 a lanțului ușor al anticorpului aslo0452 ngl-3. Astfel, într-o variantă, CDR3 a lanțului greu al anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltării este CDR3 din SECV ID NR: 16 a lanțului greu al anticorpului aslo0452 ngl-3; și/sau CDR3 a lanțului ușor al anticorpului sau fragmentului de legare de antigen al acestuia conform prezentei dezvoltării este CDR3 din SECV ID NR: 21 a lanțului ușor al anticorpului aslo0452 ngl-3.

Într-o variantă suplimentară, CDR3 a lanțului greu al anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este CDR3 a lanțului greu al anticorpului aslo0452 ngl-3.

Într-o variantă, CDR3 a lanțului ușor al anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este CDR3 al lanțului ușor al anticorpului aslo0452 ngl-3.

Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare are cele șase CDR-uri ale anticorpului aslo0452 ngl-3, adică trei CDR-uri ale lanțului greu având secvențele de aminoacizi SECV ID NR: 5, SECV ID NR: 15 și SECV ID NR: 16; și trei CDR-uri ale lanțului ușor având secvențele de aminoacizi SECV ID NR: 20, SECV ID NR: 10 și SECV ID NR: 21.

Prezenta dezvoltare furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare cuprinzând un lanț variabil greu având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100 % identitate cu secvența de nucleotide definită de SECV ID NR: 13 și un lanț variabil ușor având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența de nucleotide definită de SECV ID NR: 18.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen, cuprinzând un lanț variabil greu având o secvență de nucleotide definită de SECV ID NR: 13 și un lanț variabil ușor având o secvență de nucleotide definită de SECV ID NR: 18.

Prezenta dezvoltare furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare cuprinzând un lanț variabil greu având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100 % identitate cu secvența de aminoacizi definită de SECV ID NR: 14 și un lanț variabil ușor având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența de aminoacizi definită de SECV ID NR: 19.

Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen cuprinde (i) un lanț variabil greu având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența de aminoacizi definită de SECV ID NR: 14 și un lanț variabil ușor având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența de aminoacizi definită de SECV ID NR: 19 și (ii) cele șase CDR-uri ale anticorpului aslo0452 ngl-3.

Prezenta dezvoltare furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltării, cuprinzând un lanț variabil greu având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 14 și un lanț variabil ușor având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 19.

Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltării are cele șase CDR-uri ale anticorpului aslo0543.

Astfel, într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltării, cuprinde:

a) trei CDR-uri ale lanțului greu având secvențele:

- (i) H-CDR1 din SECV ID NR: 25,
- (ii) H-CDR2 din SECV ID NR: 26; și
- (iii) H-CDR3 din SECV ID NR: 27 și

b) trei CDR-uri ale lanțului ușor având secvențele:

- (i) L-CDR1 din SECV ID NR: 31,
- (ii) L-CDR2 din SECV ID NR: 32; și
- (iii) L-CDR3 din SECV ID NR: 33.

Într-o variantă suplimentară, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltării cuprinde un lanț variabil greu având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența definită de SECV ID NR: 14 și un lanț variabil ușor având cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu secvența definită de SECV ID NR: 19 și cuprinde suplimentar:

a) trei CDR-uri ale lanțului greu având secvențele:

- (vii) H-CDR1 din SECV ID NR: 25,
- (viii) H-CDR2 din SECV ID NR: 26; și
- (ix) H-CDR3 din SECV ID NR: 27 și

b) trei CDR-uri ale lanțului ușor având secvențele:

- (vii) L-CDR1 din SECV ID NR: 31,
- (viii) L-CDR2 din SECV ID NR: 32; și
- (ix) L-CDR3 din SECV ID NR: 33.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen, cuprinzând un lanț variabil greu având o secvență de nucleotide definită de SECV ID NR: 23 și un lanț variabil ușor având o secvență de nucleotide definită de SECV ID NR: 29.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare, cuprinzând un lanț variabil greu având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 24 și un lanț variabil ușor având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 30.

Într-o variantă suplimentară, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen cuprinde un lanț greu având o secvență de aminoacizi definită de SECV ID NR: 22 și un lanț ușor având o secvență de aminoacizi definită de SECV ID NR: 28.

Regiunea cadru și CDR-urile sau un anticorp pot fi definite cu precizie (a se vedea, Kabat și colab. Sequences of Proteins of Immunological Interest, ediția a cincea, U.S. Department of Health and Human Services (1991), 91-3242, 1991; și Chothia și colab. J. Mol. Biol. (1987), 196:901-917).

Variațiile minore ale secvențelor de aminoacizi ale anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare sunt studiate ca fiind cuprinse în prezenta dezvoltare, prevăzând ca variațiile secvenței(secvențelor) de aminoacizi să mențină cel puțin 75%, mai preferabil cel puțin 80%, cel puțin 90%, cel puțin 95% și cel mai preferabil cel puțin 99% identitate de secvență cu anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare, așa cum s-a definit oriunde aici. În particular, sunt studiate înlocuiri conservatoare de aminoacizi.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, o secvență de aminoacizi cu lanț unic cuprinzând lanțul ușor al unui anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare, așa cum s-a definit oriunde aici. Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, o secvență de aminoacizi cu lanț unic cuprinzând lanțul greu al unui anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare, așa cum s-a definit oriunde aici.

Alinierea optimă a secvențelor pentru comparare poate fi efectuată, de exemplu, de algoritmul de aliniere a omologiei locale al lui Smith și Waterman (Smith și Waterman, Adv. Appl. Math. 2 (1981), 484), prin algoritmul lui Needleman & Wunsch (Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. (1970), 48: 443) prin căutare prin metoda similarității a lui Pearson & Lipman (Pearson & Lipman, Proc Natl Acad Sci U

S A (1988), 85: 2444), prin implementările computerizate ale acestor algoritmi (GAP, BESTFIT, FASTA și TFASTA – Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705) sau prin inspecție vizuală (a se vedea Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausbel și colab, eds, Current Protocols, o asociere între Greene Publishing Associates, In. And John Wiley & Sons, Inc. (1995 Supliment) Ausbubel).

Exemple de algoritmi adecvați pentru determinarea similarității sau identității procentuale a secvenței sunt algoritmi BLAST și BLAST 2.0 (a se vedea Altschul și colab. J. Mol. Biol. (1990), 215(3): 403-410; și „<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>” of National Center for Biotechnology Information).

Într-o variantă, anticorpus sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este izolat. Într-o altă variantă, anticorpus sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este purificat.

Într-o variantă, anticorpus sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este un anticorp monoclonal. Într-o altă variantă, anticorpus sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este un anticorp umanizat. Într-o încă altă variantă, anticorpus sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este un anticorp uman.

Într-o variantă, anticorpus sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este un IgA, IgD, IgE, IgM sau IgG, precum anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4,.

Într-o altă variantă, anticorpus sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare are afinitate redusă de legare de receptorii Fc ai IgG. Astfel, anticorpus sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare are un efect imunogen scăzut. Într-o variantă, anticorpus sau fragmentul acestuia de legare de antigen este un anticorp IgG1 TM sau fragment al acestuia de legare de antigen. IgG1 TM este un mutant triplu al IgG1, care conține mutații în 3 puncte (L234F/L235E/P331S) în domeniul Fc care reduc afinitatea de legare a anticorpului sau a fragmentului acestuia de legare de antigen de receptorii Fc-gamma (FcγRs) (Oganesyan și colab. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, (2008) 64: 700-704) în unele variante, profilaxia mediată de anticorpi a răspândirii alfa-sinucleinei de către anticorpii din prezenta dezvoltare nu necesită astfel funcții efectoare asociate Fc ca un mecanism cheie de acțiune.

Fragmentele de legare de antigen includ Fab, Fv, scFv, dAb, Fd, Fab', F(ab')₂ sau o regiune izolată determinantă de complementaritate (CDR) având un cadru suficient pentru a se lega. Un fragment Fab poate fi un fragment monovalent constând din domeniile VL, VH, CL și CH1. Un fragment F(ab')₂ poate fi un fragment bivalent cuprinzând două fragmente Fab legate printr-o punte disulfurică în regiunea balama. Un fragment Fc poate consta din domeniile CH2 și CH3. Un fragment Fv poate consta din domeniile VL și VH ale unui braț unic al unui anticorp. Un fragment dAb (Ward și colab. Nature (1989), 341: 544-546) poate consta dintr-un domeniu VH. O regiune izolată determinantă de complementaritate (CDR) având un cadru suficient pentru a se lega poate fi o porțiune de legare de antigen a unei regiuni variabile.

O porțiune de legare de antigen a unei regiuni variabile a lanțului ușor și o porțiune de legare de antigen a unei regiuni variabile a lanțului greu, de exemplu, cele două domenii ale fragmentului Fv, VL și VH, pot fi unite, utilizând metode recombinante, printr-un linker sintetic care le permite să fie realizate ca un lanț proteic unic în care regiunile VL și VH se împerechează pentru a forma molecule monovalente (cunoscute ca Fv cu lanț unic (scFv); a se vedea, *de exemplu*, Bird și colab. Science (1988), 242(4877): 423-426; și Huston și colab. Proc Natl Acad Sci U S A (1988), 85: 5879-5883). Acestea sunt obținute utilizând tehnici convenționale cunoscute celor cu specializare în domeniu și porțiunile sunt analizate pentru utilitate în același mod precum anticorpii intacti.

Anticorpii sau fragmentele acestora de legare de antigen din prezenta dezvoltare pot avea oricare sau toate proprietățile avantajoase, așa cum s-au definit mai sus sau combinații ale acestora. În particular, anticorpii sau fragmentele acestora de legare de antigen din prezenta dezvoltare pot fi selectivi pentru alfa-sinucleină și pot fi capabili să încetinească sau să prevină transmiterea celulă la celulă și răspândirea alfa-sinucleinei *in vivo*.

Funcționalitatea anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen rezultat din prezenta dezvoltare și în particular (i) capacitatea sa de a lega epitopul alfa-sinucleinei; și (ii) capacitatea sa de a încetini sau preveni transmiterea celulă la celulă și răspândirea alfa-sinucleinei *in vivo*, pot fi determinate ușor prin testarea activității sale specifice utilizând tehnicile descrise aici în Exemple.

Această dezvoltare furnizează compoziții pentru administrarea anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltări prin bariera hematoencefalică (BBB) utilizând o moleculă transportor care poate traversa celulele endoteliale ale creierului în timp ce este asociată cu anticorpus sau fragmentul menționat, de exemplu, în timp ce este fuzionat sau este conjugat cu anticorpus sau fragmentul menționat. Sunt furnizate aici secvențele BBB.

Așa cum s-a utilizat aici, termenul „sarcină utilă” este utilizat ca prescurtare pentru anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen, așa cum s-a descris aici, al cărui transport prin BBB poate fi facilitat de o moleculă transportor, așa cum s-a furnizat aici. În variantele particulare, „sarcina utilă” acoperă regiunea variabilă a lanțului greu al anticorpilor din prezenta dezvăluire, mai particular regiunea variabilă a lanțului greu al also0452 ngl-3 sau also0543.

O sarcină utilă poate face parte din molecula transportor, de exemplu, ca o polipeptidă de fuziune, sau unită cu polipeptida prin legături disulfurice sau alte legături covalente. Alternativ, sarcina utilă poate fi asociată cu molecula transportor în orice mod care va permite moleculei transportor să faciliteze transportul său prin BBB, așa cum s-a descris mai jos. În anumite aspecte, sarcina utilă rămâne parte a moleculei transportor în urma transportului BBB și păstrează activitatea sistemului nervos central (SNC) în această formă. Alternativ, sarcina utilă poate fi asociată cu molecula transportor în timpul transportului prin BBB, dar într-un mod care îi permite să se disocieze de molecula transportor după transportul prin BBB.

Dezvăluirea furnizează suplimentar metode pentru tratamentul sau diagnosticul unei boli sau tulburări a SNC, în particular o a-sinucleinopatie, cuprinzând utilizarea unor astfel de molecule transportor asociate cu un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvăluiri.

În anumite aspecte, această dezvăluire furnizează o moleculă transportor izolată cuprinzând o polipeptidă derivată din imunoglobulină. În anumite aspecte, polipeptida este un mimetic sau non-mimetic al anticorpului de camelidă FC5, identificat și izolat utilizând tehnologia testului de fluorescență în microvolume (FMAT) pentru a detecta legarea de celulele endoteliale microvasculare ale creierului (BMVEC), de exemplu, celulele B.End3 de șoarece. În anumite aspecte, polipeptida derivată din imunoglobulină este un anticorp sau un fragment activ al acestuia, unde „activ” înseamnă că molecula transportor poate, *de exemplu*, să se lege de BMVEC la una sau mai multe specii, *de exemplu*, BMVEC de șoarece, BMVEC de șobolan, BMVEC de maimuță cynomolgus sau BMVEC umană, să se internalizeze în BMVEC a uneia sau mai multor specii și/sau să traverseze bariera hematoencefalică fie singură, fie asociată cu o sarcină utilă.

În unele variante, molecula transportor prin BBB este o moleculă transportor BBB descrisă în cererea provizorie de brevet US Nr. 62/094,503. În anumite aspecte, molecula transportor cuprinde unul sau mai multe dintre Bbbt0241, Bbbt0626, Bbbt0626gl, Bbbt0632, BBBt0632gl Bbbt0654, Bbbt0726, Bbbt0727, Bbbt0732, Bbbt0754, Bbbt0674, Bbbt0755, Bbbt0643, Bbbt0579 sau Bbbt0671, așa cum s-a descris în cererea provizorie de brevet US Nr. 62/094,503.

Într-o variantă particulară, molecula transportor prin BBB este Bbbt0626 sau BBBt0632.

În anumite variante, molecula de transportor prin BBB este cu linie germinală modificată, de exemplu, Bbbt0626gl este o versiune cu linie germinală modificată a Bbbt0626, numită „Bbbt0626gl”.

Într-o variantă particulară suplimentară, molecula transportor prin BBB este BBBt0632gl sau Bbbt0626gl.

În anumite aspecte, molecula transportor nu se leagă de BMVEC, dar este capabilă încă să transporte prin BBB, așa cum s-a indicat în testul de transitoză *in vitro*.

Cu referire la moleculele transportor prin BBB, secvențele CDR ale VH descrise corespund locațiilor clasice de numerotare Kabat, și anume H-CDR1 Kabat este în pozițiile 31-35, H-CDR2 este în pozițiile 50-65 și H-CDR3 este în pozițiile 95-102. L-CDR2 și L-CDR3 corespund, de asemenea, locațiilor de numerotare Kabat clasice, și anume pozițiile 50-56 și, respectiv, 89-97. Așa cum s-au utilizat aici, termenii „L-CDR1” sau „CDR1 a lanțului ușor” corespund secvențelor localizate la pozițiile Kabat 23-34 în VL (în contrast, locația clasică a L-CDR1 conform schemei de numerotare Kabat corespunde pozițiilor 24 -34).

În anumite aspecte, polipeptida derivată din imunoglobulină cuprinde regiuni determinante de complementaritate (CDR) ale lanțului greu al imunoglobulinei. De exemplu, polipeptida derivată din imunoglobulină poate include o regiune determinantă de complementaritate -1 a lanțului greu al imunoglobulinei (H-CDR1), o regiune determinantă de complementaritate -2 a lanțului greu al imunoglobulinei (H-CDR2), o regiune determinantă de complementaritate -3 a lanțului greu al imunoglobulinei (H-CDR3). În anumite aspecte, polipeptida derivată din imunoglobulină poate cuprinde suplimentar, sau cuprinde, în mod alternativ, CDR-uri ale lanțului ușor al imunoglobulinei. De exemplu, polipeptida derivată din imunoglobulină poate include o regiune determinantă de complementaritate -1 a lanțului ușor al imunoglobulinei (L-CDR1), o regiune determinantă de complementaritate -2 a lanțului ușor al imunoglobulinei (L-CDR2) și o regiune determinantă de complementaritate -3 a lanțului ușor al imunoglobulinei (L-CDR3).

În anumite aspecte, polipeptida derivată din imunoglobulină conține o H-CDR1, o H-CDR2, o H-CDR3, o L-CDR1, o L-CDR2 și, respectiv, o L-CDR3 cu următoarele secvențe de aminoacizi:

(a) SECV ID NR: 40 ca H-CDR1, SECV ID NR: 41 ca H-CDR2, SECV ID NR: 42 ca H-CDR3, SECV ID NR: 36 ca L-CDR1, SECV ID NR: 37 ca L-CDR2, și SECV ID NR: 38 ca L-CDR3, în care CDR-urile sunt similare cu cele ale Bbbt0626 și Bbbt0626gl;

5 (b) SECV ID NR: 40 ca H-CDR1, SECV ID NR: 41 ca H-CDR2, SECV ID NR: 42 ca H-CDR3, SECV ID NR: 44 ca L-CDR1, SECV ID NR: 45 ca L-CDR2 și SECV ID NR: 46 ca L-CDR3, în care CDR-urile sunt identice cu cele ale Bbbt0626 și Bbbt0626gl.

10 În anumite aspecte, polipeptida derivată din imunoglobulină conține o H-CDR1, o H-CDR2, o H-CDR3, o L-CDR1, o L-CDR2 și, respectiv, o L-CDR3 cu următoarele secvențe de aminoacizi:

(a) SECV ID NR: 49 ca H-CDR1, SECV ID NR: 50 ca H-CDR2, SECV ID NR: 51 ca H-CDR3, SECV ID NR: 53 ca L-CDR1, SECV ID NR: 54 ca L-CDR2, și SECV ID NR: 55 ca L-CDR3, în care CDR-urile sunt similare cu cele ale Bbbt0632gl;

15 (b) SECV ID NR: 49 ca H-CDR1, SECV ID NR: 50 ca H-CDR2, SECV ID NR: 51 ca H-CDR3, SECV ID NR: 53 ca L-CDR1, SECV ID NR: 54 ca L-CDR2, și SECV ID NR: 55 ca L-CDR3, în care CDR-urile sunt identice cu cele ale Bbbt0632gl;

20 În anumite variante alternative, una sau mai multe CDR-uri, așa cum s-au descris mai sus, sunt identice cu CDR-urile menționate, cu excepția, de exemplu, a 1, 2, 3, 4 sau 5 deleții, substituții sau inserții ale unui singur aminoacid.

În anumite variante, molecula transportor, așa cum s-a furnizat mai sus, poate traversa bariera hematoencefalică.

25 În anumite aspecte, H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 și L-CDR3 pot fi situate în regiuni cadru ale imunoglobulinei pentru a produce un VH al anticorpului și un VL al anticorpului. În anumite aspecte, regiunile-cadru pot fi regiuni cadru derivate de la om. În anumite aspecte, VH al anticorpului și VL al anticorpului sunt fuzionate împreună, de exemplu, printr-un linker peptidic flexibil, pentru a forma o moleculă scFv. În anumite aspecte, VH și VL cuprind suplimentar unul sau mai multe domenii constante ale imunoglobulinei, de exemplu, un domeniu CH1, o regiune balamă, un domeniu CH3, un domeniu CH3, un domeniu CL-kappa și/sau un domeniu CL lambda. În anumite aspecte, unul sau mai multe domenii constante ale imunoglobulinei sunt derivate dintr-o imunoglobulină umană, de exemplu, o imunoglobulină IgG1 umană. În anumite aspecte, domeniile VH, VL și/sau constante pot cuprinde mutații pentru a facilita, de exemplu, timp de înjumătățire mai lung sau mai scurt, funcții

30 efectoare crescute sau reduse, sau capacitatea de a atașa o moleculă de sarcină utilă, fie prin fuziunea peptidică, fie o legătură disulfurică sau conjugarea chimică.

În anumite aspecte din prezenta dezvăluire sunt furnizați anticorpi sau fragmente ale acestora de legare de antigen, conform prezentei dezvăluiri, asociate cu o moleculă transportor care poate traversa celulele endoteliale ale creierului, așa cum s-a descris aici.

40 În anumite aspecte, această dezvăluire furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen, conform prezentei dezvăluiri, asociat cu o moleculă transportor cuprinzând o polipeptidă derivată din imunoglobulină, în care polipeptida cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu al imunoglobulinei (VH) și o regiune a lanțului ușor al imunoglobulinei (VL). În anumite aspecte, polipeptida derivată din imunoglobulină cuprinde secvențele furnizate aici, incluzând:

45 (a) o secvență de aminoacizi a VH cel puțin 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu SECV ID NR: 39 și o secvență de aminoacizi VL cel puțin 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu SECV ID NR: 43, unde SECV ID NR: 39 și SECV ID NR: 43 codifică regiunile VH și VL ale lui Bbbt0626gl,

50 (b) o secvență de aminoacizi a VH cel puțin 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu SECV ID NR: 47 și o secvență aminoacizi VL cel puțin 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu SECV ID NR: 43, unde SECV ID NR: 47 și SECV ID NR: 43 codifică regiunile VH și VL ale Bbbt0626,

55 (c) o secvență de aminoacizi VH cel puțin 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu SECV ID NR: 48 și o secvență de aminoacizi VL cel puțin 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu SECV ID NR: 43, unde SECV ID NR: 48 și SECV ID NR: 43 codifică regiunile VH și VL ale Bbbt0632

60 În anumite aspecte, această dezvăluire furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare

de antigen conform prezentei dezvoltării asociat cu o moleculă transportor cuprinzând o polipeptidă derivată din imunoglobulină, în care polipeptida derivată din imunoglobulină cuprinde o regiune VH și o regiune VL, în care:

- 5 (a) regiunea VH cuprinde SECV ID NR: 34 și regiunea VL cuprinde SECV ID NR: 35; sau
- (b) regiunea VH cuprinde SECV ID NR: 39 și regiunea VL cuprinde SECV ID NR: 43; sau
- 10 (c) regiunea VH cuprinde SECV ID NR: 39 și regiunea VL cuprinde SECV ID NR: 35; sau
- (d) regiunea VH cuprinde SECV ID NR: 47 și regiunea VL cuprinde SECV ID NR: 43; sau
- (e) regiunea VH cuprinde SECV ID NR: 47 și regiunea VL cuprinde SECV ID NR: 35; sau
- 15 (f) regiunea VH cuprinde SECV ID NR: 48 și regiunea VL cuprinde SECV ID NR: 52

Într-o variantă suplimentară, regiunile VH și VL ale moleculei transportor, așa cum s-au descris mai sus, sunt legate covalent pentru a forma un fragment cu lanț unic (ScFv).

- 20 În anumite aspecte, molecula transportor furnizată aici are activitate de transport, de exemplu, se poate lega de BMVEC de la una sau mai multe specii, de exemplu, BMVEC de șoarece, de șobolan, de maimuță cynomolgus sau uman, se poate internaliza în BMVEC de la una sau mai multe specii sau poate traversa bariera hematoencefalică.

- 25 În anumite aspecte, o moleculă transportor, așa cum s-a furnizat aici, cuprinde o polipeptidă derivată din imunoglobulină, în care polipeptida derivată de imunoglobulină cuprinde un anticorp sau un fragment al acestuia penetrabil prin BBB.

- Un „fragment penetrabil prin BBB”, așa cum s-a descris aici, este un fragment al moleculei transportor care se poate lega în mod specific de BMVEC ale uneia sau mai multor specii și poate traversa prin BMVEC *in vitro* sau *in vivo* din vascularizația periferică în vascularizația SNC. Dacă un fragment dat este un fragment penetrabil prin BBB poate fi testat printr-o varietate de teste *in vitro* sau *in vivo* cunoscute persoanelor cu specializare în domeniu. De exemplu, molecula transportor poate fi testată într-un test de transitoză *in vitro*, într-un test *in vivo*, precum un test de diureză, așa cum s-a descris în US 62/094,503. Alte teste care ar putea fi utilizate pentru a măsura *in vivo* administrarea sarcinilor utile prin BBB includ, fără limitare, leziuni cronice de constricție (CCI); modelul de leziune a nervului conservat (SNI) sau ligatura nervului spinal (SNL), toate acestea pot fi măsurate prin atingerea labei sau metoda Hargreaves (Hargreaves K, și colab., Pain; 1988; 32; 77-88). În anumite aspecte, o moleculă transportor, așa cum s-a furnizat aici, se poate lega de BMVEC de la una sau mai multe specii, de exemplu, BMVEC umane, de maimuță cynomolgus, de murine, de șobolan sau de bovine. Legarea poate fi demonstrată în diferite moduri cunoscute persoanelor cu specializare obișnuită în domeniu, de exemplu, într-un test FMAT, așa cum s-a descris în US 62/094,503. În anumite aspecte, BMVEC sunt celule endoteliale capilare ale creierului (BCEC). În anumite aspecte, o moleculă transportor, așa cum s-a prevăzut aici, poate trece printr-un monostrat de BCEC într-un test *in vitro* de transitoză. În anumite aspecte, activitatea moleculei transportor poate fi demonstrată prin vizualizarea moleculei transportor în SNC. De exemplu, o moleculă transportor marcată cu tritium poate fi administrată unui subiect, *de exemplu*, periferic unui șoarece, *de exemplu*, intravenos, și apoi vizualizat în SNC prin radiografie cantitativă a întregului corp. În anumite aspecte, molecula transportor se localizează în regiuni specifice ale SNC, de exemplu, cortexul cerebelului, substanța cenușie a creierului, substanța cenușie a măduvei spinării, pons sau o combinație a acestora.
- 30
- 35
- 40
- 45

- În anumite aspecte, o moleculă transportor, așa cum s-a descris aici cuprinde un anticorp sau fragment penetrabil prin BBB al acestuia care cuprinde sau constă din două sau mai multe subunități, de exemplu, un lanț greu sau un fragment al acestuia și un lanț ușor sau un fragment al acestuia, în care lanțul greu și lanțul ușor sunt asociate lanțuri ușor, *de exemplu*, ca o singură proteină de fuziune (*de exemplu*, un scFv), sau ca două subunități ținute împreună prin una sau mai multe legături disulfurice. În anumite aspecte, lanțul greu cuprinde un domeniu sau o regiune VH și lanțul ușor cuprinde un domeniu sau o regiune VL.
- 50

- 55 Într-o variantă, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen, conform prezentei dezvoltării, asociat cu o moleculă transportor prin bariera hematoencefalică, așa cum s-a descris aici.

- Într-o variantă particulară, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltării este asociat cu o moleculă transportor prin barieră hematoencefalică, în care molecula transportor este un fragment cu lanț unic (scFv) cuprinzând:
- 60

i. regiunea variabilă a lanțului greu (VH) a BBBt0626gl din SECV ID NR: 39 și regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) a BBBt0626gl din SECV ID NR: 43 sau

5 ii. regiunea variabilă a lanțului greu (VH) a BBBt0626 din SECV ID NR: 47 și regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) a BBBt0626 din SECV ID NR: 43,

iii. regiunea variabilă a lanțului greu (VH) a BBBt0632gl din SECV ID NR: 48 și regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) a BBBt0632gl din SECV ID NR: 52

10 În anumite aspecte, lanțul greu cuprinde suplimentar un domeniu constant al lanțului greu, de exemplu, un domeniu CH1, o balama, un domeniu CH2 și/sau un domeniu CH3 sau fragment al acestuia. În anumite aspecte, domeniul constant al lanțului greu este un domeniu constant al IgG sau fragment al acestuia, *de exemplu*, un domeniu constant al IgG uman, *de exemplu*, un domeniu constant al IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4 uman. În anumite aspecte, domeniul constant al IgG sau fragmentului acestuia cuprinde o
15 glicozilare modificată și/sau una sau mai multe substituții de aminoacizi în raport cu un domeniu constant al IgG de tip sălbatic în care IgG modificată are o proprietate particulară, de exemplu, un timp de înjumătățire crescut sau scăzut în comparație cu timpul de înjumătățire al unei IgG având domeniul constant al IgG de tip sălbatic, fie funcții efectoare crescute, fie scăzute în raport cu un domeniu constant al IgG de tip sălbatic, sau capacitatea de a atașa porțiuni heteroloage prin, *de exemplu*, o legătură
20 peptidică, o legătură disulfurică sau o conjugare chimică. În anumite aspecte, domeniul constant al IgG sau fragmentul acestuia are o glicozilare modificată în raport cu un domeniu constant IgG de tip sălbatic în care IgG modificată are o proprietate particulară, de exemplu, un timp de înjumătățire crescut sau scăzut în comparație cu timpul de înjumătățire al unui IgG având domeniul constant al IgG de tip sălbatic, funcții efectoare fie crescute, fie scăzute în raport cu un domeniu constant al IgG de tip sălbatic.

25 În unele variante, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform prezentei dezvoltării este asociat cu BBBt0626 sau BBBt0626gl, așa cum s-a definit aici, formând molecule de anticorp bispecific.

În alte variante, anticorpul bispecific menționat conform prezentei dezvoltării cuprind scheletul IgG1 TM uman (adică regiunile CH1, CH2, CH3 ale lanțului greu al unui IgG1 TM) asociat cu un
30 fragment cu lanț unic (scFv) cuprinzând regiunile VH și VL ale BBBt0626 sau BBBt0626gl grefate la N-terminus ("format BiS2") sau C-terminus ("format BiS3") al lanțului greu sau N-terminus ("format BiS1") al VL, al unui anticorp **anti- α -sinucleină** conform prezentei dezvoltării. Referirile la formatul BiS sunt așa cum s-au dezvoltat în DiMasi și colab. J Mol Biol. 2009 Oct 30;393(3):672-92.

În unele variante, anticorpul bispecific menționat conform prezentei dezvoltării cuprind
35 suplimentar un lanț ușor cuprinzând regiunea CL kappa sau lambda asociată cu VL a unui anticorp anti- α -sinucleină conform prezentei dezvoltării.

În variante particulare, anticorpul bispecific conform prezentei dezvoltării cuprind scheletul IgG1 TM uman asociat cu:

40 (i) un fragment cu lanț unic (scFv) al BBBt0626gl cuprinzând regiunea variabilă a lanțului greu (VH) din SECV ID NR: 39 și regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) din SECV ID NR: 43; sau

(ii) un fragment cu lanț unic (scFv) al Bbbt0626 cuprinzând regiunea variabilă a lanțului greu (VH) din
45 SECV ID NR: 47 și regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) din SECV ID NR: 43,

în care ScFv menționat este grefat la capătul N-terminus (format BiS2) sau la C-terminus (format BiS3) al lanțului greu al aslo0452 ngl-3 din SECV ID NR: 12 sau la capătul N-terminus ("format BiS1") al lanțului
ușor din SECV ID NR: 17.

În alte variante particulare suplimentare, anticorpul bispecific conform prezentei dezvoltării
50 cuprind scheletul IgG1 TM uman asociat cu un fragment cu lanț unic (scFv) al BBBt0626gl cuprinzând (i) regiunea variabilă a lanțului greu (VH) din SECV ID NR: 39 și (ii) regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) din SECV ID NR: 43; în care ScFv menționat este grefat la N-terminus (format BiS2) sau la C-terminus (format BiS3) al lanțului greu al aslo0452 ngl-3 din SECV ID NR: 12 sau la N-terminus ("format BiS1") al lanțului ușor din SECV ID NR: 17.

55 În alte variante particulare, anticorpul bispecific conform prezentei dezvoltării cuprind scheletul IgG1 TM uman asociat cu:

(i) un fragment de lanț unic (scFv) de BBBt0626gl cuprinzând regiunea variabilă a lanțului greu
60 (VH) din SECV ID NR: 39 și regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) din SECV ID NR: 43; sau

(ii) un fragment de lanț unic (scFv) al Bbbt0626 cuprinzând regiunea variabilă a lanțului greu (VH) din SECV ID NR: 47 și regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) din SECV ID NR: 43,

în care ScFv menționat este grefat la capătul N-terminus (format BiS2) sau la C-terminus (format BiS3) al lanțului greu al aslo0543 al SECV ID NR: 22 sau la N-terminus ("format BiS1") al lanțului ușor al SECV ID NR. 28.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare pentru utilizare ca un medicament.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, un anticorp sau un fragment de al acestuia legare de antigen din prezenta dezvoltare pentru utilizare în profilaxia sau tratamentul unei boli a sistemului nervos central, în particular, o α -sinucleinopatie. Într-o variantă, α -sinucleinopatia este selectată dintre boala Parkinson (PD), demența cu corpi Lewy (DLB) și atrofia multisistemică (MSA). Într-o variantă preferată, α -sinucleinopatia este boala Parkinson (PD).

Prezenta dezvoltare prevede, de asemenea, utilizarea unui anticorp sau a fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare pentru producerea unui medicament pentru prevenirea sau tratarea unei boli a sistemului nervos central, în special o α -sinucleinopatie. Într-o variantă, α -sinucleinopatia este selectată dintre boala Parkinson (PD), demența cu corpi Lewy (DLB) și atrofia multisistemică (MSA). Într-o variantă preferată, α -sinucleinopatia este boala Parkinson (PD).

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, o metodă de tratare sau prevenire a bolii la un pacient, metoda cuprinzând administrarea pacientului a unui anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare. Într-o variantă, α -sinucleinopatia este selectată dintre boala Parkinson (PD), demența cu corpi Lewy (DLB) și atrofia multisistemică (MSA). Într-o variantă preferată, α -sinucleinopatia este boala Parkinson (PD).

În utilizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare este capabil să trateze sau să prevină progresia bolii prin inhibarea propagării și răspândirii alfa-sinucleinei *in vivo*. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare furnizează astfel un avantaj distinct față de alte medicamente. Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, o metodă de încetinire sau prevenire a progresiei bolii la un subiect care are nevoie de aceasta, cuprinzând administrarea anticorpului sau fragmentului al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare la pacient.

Într-o variantă, metoda menționată de tratare a bolii cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic din anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare. Într-o altă variantă, metoda menționată de prevenire a bolii sau încetinire sau prevenire a progresiei bolii cuprinde administrarea unei cantități eficiente profilactic din anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare.

Intervalele de dozare pentru administrarea anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare sunt cele care produc efectul terapeutic dorit. Va fi apreciat că intervalul de dozare necesar depinde de natura exactă a anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen sau a compoziției, calea de administrare, natura formulării, vârsta pacientului, natura, amploarea sau severitatea stării pacientului, contraindicații, dacă există, și raționamentul medicului curant.

Variațiile acestor niveluri de dozare pot fi ajustate utilizând rutine empirice standard pentru optimizare.

Dozele adecvate sunt în intervalul de la 1 până la 50 mg per kg de greutate corporală. Acestea pot fi în intervalul de la 5 până la 30 mg/kg, 10 până la 25 mg/kg sau 15 până la 20 mg/kg. Doza unitară poate fi administrată zilnic sau mai rar, de exemplu, săptămânal sau lunar.

Administrarea poate fi efectuată prin administrări repetate ale anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare, pentru o perioadă prelungită de timp. Administrarea poate fi concomitentă sau secvențială și poate fi efectuată în orice ordine.

Profilaxia sau tratamentul definit aici poate fi aplicat ca o terapie unică sau poate implica, în plus față de anticorpul sau fragmentul de legare de antigen din prezenta dezvoltare, administrarea altor agenți sau terapii stabilite utilizate în mod normal în tratamentul α -sinucleinopatiilor (precum L-3,4-dihidroxifenilalanină (L-DOPA), agoniști ai dopaminei (receptori), inhibitori ai catecol-O-metiltransferazei (COMT) și/sau inhibitori ai monoaminoxidazei de tip B (MAO-B). Administrarea altor agenți sau terapii stabilite poate fi în combinație cu, sau ca adjuvant la, sau în combinație cu, anticorpul sau fragmentul de legare de antigen din prezenta dezvoltare și poate fi prin dozare simultană, secvențială sau separată a componentele individuale ale tratamentului.

Tratamentul combinat poate fi efectuat în orice mod considerat necesar sau convenabil de către persoana specializată în domeniu și, în scopul acestei specificații, este studiat să nu existe limitări în ceea ce privește ordinea, cantitatea, repetarea sau cantitatea relativă a compușilor care urmează să fie utilizați în combinație.

O cantitate eficientă terapeutic se referă la cantitatea sau anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen, care atunci când este administrată singură sau în combinație unui pacient pentru tratarea bolii, sau cel puțin a unuia dintre simptomele clinice ale bolii, este suficientă pentru a afecta un astfel de tratament al bolii sau simptomului. Cantitatea eficientă terapeutic poate varia în funcție, de exemplu, de anticorpul și/sau simptomele bolii, vârstă, greutate și/sau starea de sănătate a pacientului care urmează să fie tratat și de raționamentul medicului care prescrie. O cantitate adecvată eficientă terapeutic în orice caz dat poate fi stabilită de cei specializați în domeniu sau capabilă de determinare prin experimentare de rutină. O cantitate eficientă terapeutic este, de asemenea, una în care orice efecte toxice sau dăunătoare ale anticorpului sau ale anticorpului sau fragmentului acestuia de legare de antigen sunt depășite de efectele benefice.

O „cantitate eficientă profilactic” este orice cantitate de anticorp sau anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen care, atunci când este administrată singură sau în combinație unui pacient, inhibă sau întârzie debutul sau revenirea bolii, sau cel puțin a unuia dintre simptomele clinice ale bolii. În unele variante, cantitatea eficientă profilactic previne în întregime debutul sau revenirea bolii. „Inhibarea” debutului înseamnă fie reducerea probabilității de debut al bolii sau prevenirea completă a debutului bolii.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, compoziții farmaceutice cuprinzând un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare. Prin urmare, prezenta dezvoltare furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând un anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare, împreună cu un excipient acceptabil farmaceutic. Excipienții acceptabili farmaceutic adecvați pot facilita procesarea compușilor activi în preparate adecvate pentru administrare farmaceutică.

Compozițiile farmaceutice din prezenta dezvoltare pot fi formulate pentru, dar nelimitat la administrare parenterală, de exemplu intramusculară, subcutanată sau intravenoasă. Compozițiile adecvate pentru injectare intramusculară, subcutanată sau intravenoasă includ soluții apoase sterile.

Compoziția farmaceutică poate lua forma unei soluții apoase și poate include soluții tampon compatibile fiziologic, precum soluția Hank, soluția Ringer sau soluția salină tamponată fiziologic. Compoziția farmaceutică poate conține suplimentar sau alternativ substanțe care cresc vâscozitatea suspensiei, precum carboximetilceluloza de sodiu, sorbitolul sau dextranul. Compoziția farmaceutică poate fi preparată ca suspensii uleioase adecvate pentru injectare. Solvenții sau vehiculele lipofile adecvate includ uleiuri grase, precum uleiul de susan, sau esteri sintetici ai acizilor grași, precum oleatul de etil sau trigliceridele sau lipozomii. Opțional, compoziția farmaceutică poate conține stabilizatori adecvați sau agenți care măresc solubilitatea compușilor pentru a permite prepararea de soluții foarte concentrate.

Prezenta dezvoltare furnizează o moleculă izolată de acid nucleic care codifică anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen din prezenta dezvoltare. Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, un vector cuprinzând molecula izolată de acid nucleic din prezenta dezvoltare. Prezenta dezvoltare furnizează suplimentar o celulă gazdă cuprinzând vectorul din prezenta dezvoltare.

Anticorpii sau fragmentele de legare de antigen din invenție nu sunt limitate la o metodă particulară de generare sau producere. Astfel, prezenta dezvoltare furnizează anticorpi care au fost produși dintr-un hibridom care secretă anticorpul, precum și anticorpi produși dintr-o celulă produsă recombinant care a fost transformată sau transfectată cu un acid nucleic sau acizi nucleici care codifică anticorpul. Astfel de hibridoame, celule produse recombinant și acizi nucleici fac parte din prezenta dezvoltare.

EXEMPLE

Exemplu 1: Producerea de anticorpi

Anticorpii specifici anti- α -syn au fost izolați din bibliotecile de prezentare a fagilor utilizând o serie de cicluri de selecție pe α -syn recombinantă umană („hu α -syn”), atât imobilizați pasiv pe godeuri de microtitrare, cât și liberi în soluție. Pentru selecții au fost utilizate biblioteci de prezentare a fagilor Fv umani naivi cu lanț unic (scFv) clonați într-un vector fagemidă bazat pe fagul filamentos M13 (Lloyd și colab., Protein Eng Des Sel. (2009), 22(3):159-68; și Vaughan și colab., Nat Biotechnol. (1996), 14(3); 309-14).

Un număr reprezentativ de clone individuale din rezultatele selecției după două sau trei runde de selecție descrise mai sus au fost analizate inițial ca fragmente scFv solubile în extracte periplasmice de *E coli* (Kipriyanov și colab. J Immunol Methods (1997) 200: 69-77) într-un test HTRF® (fluorescență omogenă descompusă în timp, Cisbio International) FRET omogen (transfer de energie prin rezonanță de fluorescență) pentru legarea de α -sinucleina umană solubilă.

Un test HTRF® (Figura 1) este o tehnologie omogenă de test care utilizează transferul de energie prin rezonanța de fluorescență între un fluorofor donor și acceptor care se află în imediata apropiere

(Mathis G Clin Chem (1995) 41: 1391-1397). Acest test a fost utilizat pentru a măsura interacțiunile macromoleculare prin cuplarea directă sau indirectă a uneia dintre moleculele de interes la un fluorofor donor, de exemplu, criptat de europiu (Eu3+) și cuplarea celeilalte molecule de interes la un fluorofor acceptor XL665, (o alofocianină reticulată stabilă). Excitarea moleculei de criptat (la 337 nm) a avut ca rezultat emisia de fluorescență la 620 nm. Energia din această emisie a fost transferată la XL665 în imediata apropiere a criptatului, având ca rezultat emisia unei fluorescențe specifice de lungă durată (la 665 nm) de la XL665. Semnalele specifice atât ale donorului (la 620 nm), cât și ale acceptorului (la 665 nm) au fost măsurate, permițând calcularea unui raport 665/620 nm care compensează prezența compușilor colorați în test.

Probele de scFv anti- α -syn nepurificate au fost testate pentru legarea de α -syn biotinitată. Au fost adăugați 5 microlitri dintr-o soluție conținând α -syn umană biotinitată 40 nM combinată cu terbiu streptavidină 0,8 nM (Cisbio International, 610SATLB) pe o placă de test cu volum foarte mic cu 384 de godeuri (Costar, 3676). Apoi, au fost adăugați pe placă 10 microlitri din fiecare diluție de probă de test cu anticorpi. În cele din urmă, au fost adăugați pe placa de test 5 microlitri dintr-o soluție conținând DC anti-myc (Cisbio International, 661MYCDAB). Toate diluțiile au fost efectuate în soluții tampon de test conținând fluorură de potasiu 0,8 M (BDH 103444T) și albumină serică bovină 0,1% (BSA, Sigma A9576) în Dulbeccos PBS (Invitrogen, 14190185). Plăcile de test au fost incubate pentru 3 ore la temperatura camerei, urmate de 16 ore la 4°C înaintea citirii fluorescenței decompuse în timp la lungimi de undă de emisie de 620 nm și 665 nm, utilizând un cititor de plăci EnVision (Perkin Elmer).

Datele au fost analizate prin calcularea raportului 665/620 nm urmat de valorile Delta F % pentru fiecare probă. Raportul 665/620 nm a fost utilizat pentru a corecta interferența probei utilizând ecuația de mai jos:

$$\text{raport } 665/620 \text{ nm} = \left(\frac{\text{semnal } 665 \text{ nm}}{\text{semnal } 620 \text{ nm}} \right) \times 10.000$$

Delta F % pentru fiecare probă a fost apoi calculată utilizând ecuația de mai jos:

$$\text{DeltaF (\%)} = \left(\frac{\text{raport probă } 665/620 \text{ nm} - \text{raport martor negativ } 665/620 \text{ nm}}{\text{raport martor negativ } 665/620 \text{ nm}} \right) \times 10.000$$

Martorul negativ (legarea nespecifică) a fost definit prin înlocuirea probei de test cu α -syn nemarcată umană sau de șobolan.

Valorile Delta F % au fost utilizate ulterior pentru a calcula legarea specifică %, așa cum s-a descris în ecuația de mai jos:

$$\text{Legare specifică \%} = \left(\frac{\text{Probă Delta F \%} - \text{NSB Delta F \%}}{(\text{Legare totală Delta F \%} - \text{NSB Delta F \%})} \right) \times 100$$

Valorile IC₅₀ au fost determinate utilizând software-ul GraphPad Prism prin ajustarea curbei utilizând o ecuație logistică cu patru parametri:

$$Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{Panta Hill})})$$

X este logaritmul concentrației.

Y este legarea specifică

Y începe la Inferior și ajunge la Superior cu o formă sigmoidă.

Clonele Fv cu lanț unic care s-au legat de α -syn umană ca extracte periplasmice nepurificate au fost supuse secvențierii ADN (Osborn și colab., Immunotechnology (1996), 2: 181-196; și Vaughan și colab., Nat Biotechnol. (1996), 14(3): 309-14). ScFv unice au fost exprimate din nou în bacterii și purificate prin cromatografie de afinitate (așa cum s-a descris în WO 01/66754). Potențele acestor probe au fost determinate printr-o titrare a preparatului purificat pentru legarea de α -syn umană biotinitată în testul HTRF, așa cum s-a descris mai sus. Preparatele scFv purificate care au prezentat cea mai puternică interacțiune α -syn au fost selectate pentru transformare în formatul IgG.

Prin titrarea anticorpului în testul HTRF, clonele au fost clasificate pentru forța de legare de α -syn. Cei mai buni liganzi α -syn au fost analizați suplimentar pentru ambele cinetici de legare de α -syn (k_{off}) ca IgG-uri pe un biosenzor Octet Red (a se vedea metoda, așa cum s-a descris în Exemplul 9), precum și

pentru selectivitatea membrilor familiei sinucleinei (α -syn, β -syn, γ -syn umană) (a se vedea metoda, așa cum s-a descris în Exemplul 4) și pentru reactivitate încrucișată cu α -syn murină (a se vedea metoda, așa cum s-a descris în Exemplul 5).

5 **Exemplul 2: Derivarea lui aslo0452 ngl-3**

O clonă specifică α -syn reactivă C-terminal, asyn0087, a fost identificată prin analiză pentru legarea de α -syn umană într-un test DELFIA (a se vedea metoda, așa cum s-a descris în Exemplul 4). Asyn0087 se leagă în mod specific de α -syn umană, de maimuță cynomolgus și de rozătoare (a se vedea metoda, așa cum s-a descris în Exemplul 5). Asyn0087 a fost întors la cea mai apropiată secvență a liniei germinale umane (Tomlinson VBASE. MRC Center of Protein Engineering, Cambridge, UK. 1997) care nu a afectat potența prin tehnici standard de mutagenază înainte de optimizare. După modificarea liniei germinale, clona a fost reevaluată pentru legarea de α -syn. Nu au fost observate efecte nocive.

Biblioteci mari de fagi scFv derivate din clona principală au fost create prin mutagenază direcționată către oligonucleotide a regiunilor determinante de complementaritate (CDR) 2 și 3 variabile grele (VH) și CDR-urile 1 și 3 ale lanțului ușor (VL) utilizând tehnici standard de biologie moleculară, așa cum s-a descris în Clarkson și Lowman (2004) (Phage display: A practical approach. Oxford: Oxford University Press). Bibliotecile au fost supuse selecțiilor de prezentare a fagilor bazate pe afinitate efectuate pe α -syn umană biotinitată solubilă pentru a selecta variante cu afinitate mai ridicată pentru α -syn umană. Selecțiile au fost efectuate în esență așa cum s-a descris anterior mai sus, cu excepția scăderii concentrației de α -syn umană biotinitată solubilă pentru fiecare rundă de selecție efectuată.

Clonele reprezentative din fiecare rezultat de selecție au fost analizate inițial ca fragmente scFv solubile în extractele periplasmice de *E. coli* într-un test HTRF pentru capacitatea lor de a concura pentru legarea de α -syn solubilă față de clona parentală de legare de α -syn, asyn0087. Performanța fiecărei biblioteci în aceste analize ale populației a fost utilizată pentru a informa care biblioteci de mutagenază CDR au fost adăugate împreună genetic sau „recombinante” pentru a crea biblioteci noi, iar aceste biblioteci recombinante au fost supuse unor runde suplimentare de selecții determinate de afinitate efectuate pe α -syn umană biotinitată solubilă.

Atât pentru clonele individuale derivate din bibliotecă de mutagenază, cât și pentru cele recombinante, după analiza secvenței lianților pozitivi, clonele au fost exprimate și purificate atât ca fragmente scFv, cât și ca IgG și legarea de α -syn solubilă a fost reconfirmată prin testele HTRF de competiție cu epitopii. Prin titrarea anticorpilor în testul HTRF de competiție cu epitopii, clonele au fost clasificate după valorile IC_{50} pentru îmbunătățirea relativă a legării de α -syn în comparație cu IgG parentală, asyn0087. Cei mai buni lianți α -syn au fost analizați suplimentar pentru selectivitatea membrilor familiei sinucleinei (α -syn, β -syn, γ -syn umană) și pentru reactivitate încrucișată cu α -syn de cynomolgus și de șobolan, fie prin testul HTRF de legare directă, fie prin testul HTRF de competiție cu epitopii.

Din aceste runde iterative de recombinare și de analiză a bibliotecii, au fost identificate două clone puternice specifice α -syn, reactive încrucișat, de α -syn de cynomolgus și de șobolan, aslo0452 ngl-1 și aslo0467.

Mutagenază punctiformă unică a fost efectuată pe aslo0452 ngl-1 pentru fiecare dintre CDR-urile în care au fost observate îmbunătățiri pozitive ale potenței IC_{50} . Fiecare poziție din CDR aleasă a fost modificată individual prin toate cele 20 de reziduuri de aminoacizi posibile și din nou analizată prin testul HTRF de competiție cu epitopii pentru IC_{50} îmbunătățită în comparație cu IgG aslo0452 ngl-1. Au fost identificate reziduuri multiple din patru CDR-uri (H2, H3, L1 și L3) și combinate atât pe aslo0452 ngl-1, cât și pe aslo0467 și din nou evaluate prin testul HTRF de competiție cu epitopii pentru IC_{50} îmbunătățită în comparație cu aslo0452 ngl-1. Din aceste experimente, cei doi lianți cei mai îmbunătățiți au fost identificați ca aslo0452 ngl-3 și aslo0543.

Figura 2 compară secvențele de aminoacizi ale regiunilor VH și VL ale asyn0087, aslo0452 ngl-3 și aslo0543.

Exemplul 2.1: Reformatarea scFv la TM a IgG1

Clonele Fv cu lanț unic cu proprietăți de legare a α -syn dorite au fost transformate în formatul de anticorpi TM a imunoglobulinei G1 cu funcția efectoare integrală nulă (TM a IgG1) (Oganesyan și colab. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. (2008), 64(Pt 6):700-4), în esență, așa cum s-a descris de Persic *et al.* (Persic și colab., Gene (1997) 187: 9-18) cu următoarele modificări. Un fragment OriP a fost inclus în vectorii de expresie pentru a facilita utilizarea cu celule tranzitorii CHO și pentru a permite replicarea epizomală. Domeniul variabil greu (VH) a fost clonat într-un vector (pEU1.4) conținând domenii constante ale lanțului greu uman și elemente de reglare pentru a exprima întregul lanț greu al TM a **IgG1** în celulele de mamifere. În mod similar, domeniul variabil ușor (VL) a fost clonat într-un vector

(pEU4.4) pentru expresia domeniilor constante (λ) ale lanțului ușor uman și a elementelor de reglare pentru a exprima întregul lanț ușor al IgG în celulele de mamifere. Pentru a obține IgG, vectorii care exprimă IgG cu lanț greu și ușor au fost transfectați în celulele de mamifere tranzitorii CHO (Daramola și colab., *Biotechnol Prog* (2014) 30: 132-141). IgG-urile au fost exprimate și secretate în mediu. Recoltele au fost filtrate înainte de purificare, apoi IgG a fost purificată utilizând cromatografia cu proteină A. Supernatanții de cultură au fost încărcăți pe o coloană de dimensiune adecvată de Proteină A ceramică (BioSeptra) și spălați cu Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 250 mM. IgG legată a fost eluată din coloană utilizând citrat de sodiu 0,1 M (pH 3,0) și neutralizată prin adăugarea de Tris-HCl (pH 9,0). Materialului eluat i s-a schimbat soluția tampon în PBS utilizând coloane Nap10 (Amersham, #17-0854-02) și concentrația de IgG a fost determinată spectrofotometric utilizând un coeficient de extincție bazat pe secvența de aminoacizi a IgG (Mach și colab., *Anal Biochem* (1992) 200: 74-80). IgG purificate au fost analizate pentru agregare și puritatea degradării utilizând SEC-HPLC și prin SDS-PAGE.

Raționamentul utilizării TM a *IgG1* ca format de medicament candidat este de a reduce la minimum distrugerea martorilor din cauza activării celulelor imune și a complementului (*adică*, producerea excesivă de C3a care poate provoca inflamație). Distrugerea celulelor martor poate fi declanșată de acumularea potențială a complexilor imuni formați de medicamentul candidat și α -sinucleina extracelulară, despre care s-a demonstrat că interacționează cu membranele lipidice (Bartels și colab., *Biophys. J.* (2010), 99: 2116-2124). Formatul TM a IgG1 a fost ales deoarece s-a demonstrat că are o legare neglijabilă de receptorii Fc γ (Fc γ R) și activarea redusă a complementului mediată de C1q de către complexii imuni (Oganesyan și colab. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* (2008), 64(Pt 6):700-4).

Pentru a diminua orice risc potențial de imunogenicitate, cadrele aslo0452 ngl-3 sunt cât mai aproape posibil de secvența de aminoacizi a liniei germinale umane, fără a afecta potența. Aceasta înseamnă că unii aminoacizi din aslo0452 ngl-3, incluzând reziduurile Vernier (Foote și Winter, *J Mol Biol.* (1992), 224(2): 487-99), nu sunt modificate în cea mai apropiată secvență a liniei germinale umane. Pentru domeniul V_H al aslo0452 ngl-3, există un reziduu Vernier în regiunea V care nu este modificat în secvența liniei germinale umane IGVH3-23 și IGJH6 (Figura 3C). Pentru domeniul V_L al aslo0452 ngl-3, toate reziduurile cadru se potrivesc cu secvența liniei germinale umane IGLV5-45 și IGJL2 sau IGJL3 (Figura 3D).

Exemplul 3: Confirmarea epitopului IgG anti- α -syn optimizat cu afinitate

Au fost obținute alfa-, beta- și gama-sinucleină umană recombinantă, versiuni trunchiate recombinante ale alfa-sinucleinei umane (aa1-60, aa1-95, aa61-140, 96-140, Δ NAC și NCAP) și alfa-sinucleină de șoarece de la rPeptide LLC. Maparea epitopului brut a fost efectuată utilizând trunchierile de α -syn disponibile comercial.

Pe scurt, un microgram per mililitru din fiecare trunchiere a fost acoperit într-un godeu de microtitrare peste noapte la 4°C. După clătirea godeurilor în PBS, s-a adăugat o diluție de 1 μ g/ml a fiecărui anticorp anti- α -syn. După 1 h de incubare și spălare, anticorpul legat a fost detectat prin adăugarea unei IgG anti-umane conjugate fie cu HRP, fie cu Eu³⁺. După incubare și spălare, a fost adăugat substratul de detectare adecvat (TMB sau, respectiv, soluție de amplificare DELFIA) și placa a fost citită pe un cititor de plăci de microtitrare.

Aceste studii de legare a epitopului au relevat că izolatul principal, asyn0087, recunoaște un epitop localizat în regiunea C-terminală a proteinei α -syn între aminoacizii 102 și 130 (Figura 4A). Atât aslo0452 ngl-3, cât și aslo0543 își mențin recunoașterea aceluiași epitop localizat în regiunea C-terminală a proteinei α -syn între aminoacizii 102 și 130 precum izolatul lor parental principal asyn0087 (Figura 4B).

Exemplul 4: Specificitatea aslo0452 ngl-3 și aslo0543 pentru α -syn în raport cu membrii familiei sinucleinei utilizând un test HTRF de competiție cu epitopii

Este important pentru un anticorp destinat a fi utilizat în aplicații terapeutice să fie specific pentru α -syn umană, pentru a diminua orice riscuri potențiale de siguranță legate de interacțiunea în afara țintei cu celelalte sinucleine (β -sinucleină și γ -sinucleină).

Specificitatea aslo0452 ngl-3 și aslo0543 pentru α -syn față de ceilalți membri ai familiei sinucleinei, β -syn și γ -syn, a fost determinată utilizând testul HTRF al competiției cu epitopii, care a măsurat legarea α -syn umane biotinilate de anticorpul din soluție.

α -syn, β -syn și γ -syn au fost titrate în test și a fost evaluată selectivitatea aslo0452 ngl-3 IgG și aslo0543 IgG prin măsurarea gradului de inhibare a legării α -syn umane biotinilate de aslo0452 ngl-3/aslo0543. Valorile IC₅₀ au fost determinate prin ajustarea curbei datelor la o ecuație logistică cu patru parametri utilizând software-ul PRISM 6® (Graphpad). Teste HTRF mai sensibile care măsoară legarea directă a IgG de α -syn, β -syn și γ -syn au fost utilizate, de asemenea, pentru a confirma specificitatea α -syn

(date neprezentate). Pentru martorul negativ, proba de test a anticorpilor a fost înlocuită cu un anticorp izotip martor sau doar soluție tampon.

Valorile IC_{50} reprezentative obținute cu proteinele α -syn, β -syn și γ -syn din testele de competiție cu epitopii aslo0452 ngl-3 și aslo0543 HTRF sunt prezentate în Figura 5. Nu a fost observată legare de β -syn și γ -syn la concentrațiile testate (până la 5 μ M), demonstrând că aslo0452 ngl-3 și aslo0543 sunt selective pentru α -syn.

Exemplul 5: Specificitatea aslo0452 ngl-3 pentru α -syn umană, de maimuță cynomolgus și de șobolan utilizând un test HTRF de competiție cu epitopii

În vederea aplicațiilor terapeutice, este important ca anticorpul să fie reactiv încrucișat cu α -sinucleina de cynomolgus și se dorește ca acesta să fie reactiv încrucișat cu a α -sinucleina de șobolan, până la de 10 ori mai mult decât cea observată față de α -syn umană. Aceasta este pentru a permite să fie efectuate studii de siguranță atât la speciile de maimuță cynomolgus, cât și la speciile de șobolani.

Specificitatea aslo0452 ngl-3 și aslo0543 pentru α -syn umană, de maimuță cynomolgus și de șobolan a fost determinată utilizând testul HTRF competiției cu epitopii care a măsurat legarea α -syn umană biotinilată de aslo0452 ngl-3 în soluție.

α -syn umană, de maimuță cynomolgus și de șobolan au fost titrate în test și a fost evaluată selectivitatea anticorpului prin măsurarea gradului de inhibare a legării α -syn umană biotinilată de anticorp. Valorile IC_{50} au fost determinate prin potrivirea curbei datelor la o ecuație logistică cu patru parametri utilizând software-ul PRISM 6® (Graphpad). Reactivitatea încrucișată a speciilor aslo0452 ngl-3 și aslo0543 a fost confirmată, de asemenea, utilizând un format de test HTRF de legare directă (neprezentat). Aslo0452 ngl-3 (sau aslo0543) a fost titrat în test pentru a concura pentru legarea α -syn umană sau de maimuță cynomolgus sau de șobolan de aslo0452 ngl-3 (sau aslo0543) prin testul HTRF. Pentru martorii negativi, proba de test a anticorpilor a fost înlocuită doar cu un anticorp izotip martor sau doar soluție tampon.

Valorile IC_{50} reprezentative obținute cu proteinele α -syn umane, de maimuță cynomolgus și de șobolan în testul competiției HTRF cu epitopii sunt prezentate în Figura 6. Aslo0452 ngl-3 se leagă de α -syn umană și de cynomolgus cu valori IC_{50} de 5,7 nM și, respectiv, 6,8 nM și se leagă de α -syn de șobolan cu valoare IC_{50} de 19,6 nM, de 4 ori. Aslo0543 se leagă de α -syn uman și cynomolgus cu IC_{50} valori de 2,0 nM și, respectiv, 2,1 nM și se leagă la α -syn de șobolan cu IC_{50} valoare de 3,8 nM, de 2 ori mai mare.

Capacitatea aslo0452 ngl-3 de a se lega de α -syn umană, de maimuță cynomolgus și de șobolan indică legarea de un epitop diferit pe alfa-sinucleina umană în comparație cu anticorpii care nu se leagă de α -syn umană și de maimuță cynomolgus și de șobolan.

Exemplul 6: Specificitatea clonelor cu afinitate optimizată pentru α -syn nativă măsurată prin citometrie în flux

Specificitatea IgG-urilor anti- α -syn cu afinitate optimizată, aslo0452 ngl-3 și aslo0543, pentru legarea de α -syn umană nativă endogenă, a fost determinată prin citometrie în flux utilizând linii de celule pozitive și negative pentru α -syn.

Pe scurt, celulele de neuroblastom SHSY5Y (pozitive pentru α -syn) și celulele de cancer de sân BT-20 (negative pentru α -syn) au fost fixate în formaldehidă 0,01% și apoi permeabilizate cu Tween 20 0,5% (v/v) înainte de incubare cu anticorpi anti- α -syn, anticorpi martor pozitiv sau martor izotip. După spălări extinse, anticorpul legat a fost detectat prin incubare cu un anticorp secundar IgG-FITC anti-uman sau anti-șoarece. După spălări suplimentare, celulele au fost analizate cu un aparat FACS Canto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) și analiza datelor a fost efectuată utilizând software-ul FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

Datele sunt reprezentate grafic ca histograme care prezintă diferența dintre celulele colorate singure față de celulele colorate cu anticorpul primar. Rezultatele din Figura 7A prezintă o deplasare a semnalului fluorescent în prezența asyn0087 (panoul D) în celulele SH-SY5Y pozitive pentru α -syn, în comparație cu martorul izotip și anticorpul secundar singur (panoul B), indicând recunoașterea α -syn exprimată endogen. Asyn0087 nu se leagă de linia de celule de cancer de sân uman negativă pentru α -syn, BT-20 (panoul C). Rezultatele din Figura 7B prezintă o deplasare puternică a semnalului fluorescent în prezența fie a aslo0452 ngl-3, fie a aslo0543 (panoul H) comparabil cu anticorpul martor pozitiv, 4D6 pe celulele SH-SY5Y pozitive pentru α -syn (panoul F) și fără deplasare pe celulele BT-20 negative pentru α -syn (panoul G). Aceasta demonstrează că atât aslo0452 ngl-3, cât și aslo0543 se leagă de a α -syn umană intracelulară nativă exprimată endogen.

Exemplul 7: Specificitatea IgG-urilor anti- α -syn optimizate pentru α -syn umană agregată prin ELISA DELFIA

Preparatele fibrilare sau agregatele de α -syn umană au fost generate, așa cum s-a descris de Emadi și colab. (Emadi și colab., Biochemistry (2004), 43: 2871-2878). Pe scurt, 200 μ l de α -syn recombinantă 50 μ M au fost alicotați într-un tub Sarstedt de 1,8 ml și plasați într-un incubator cu agitare la 37°C pentru 3 zile la 280 rpm. Prezența de α -syn agregată a fost determinată prin încorporarea de tioflavină T adăugată la o concentrație finală de 10 μ M, incubată în întuneric pentru 1 h la temperatura camerei și citită fluorescența la o lungime de undă de excitare de 450 nm și o lungime de undă de emisie de 485 nm pe un cititor de microplăci Envision.

Specificitatea IgG-urilor anti- α -syn cu afinitate optimizată, aslo0452 ngl-3 și aslo0543 și anticorpul principal asyn0087, pentru α -syn umană agregată a fost determinată utilizând un test de captare a anticorpilor DELFIA®. Acest test a măsurat captarea α -syn umane agregate de către aslo0452 ngl-3, aslo0543 sau asyn0087 într-un ELISA pe perechi. Pe scurt, o versiune IgG1 de șoarece a anticorpului anti- α -syn a fost imobilizată pe godeul unei plăci de microtitrare cu 96 de godeuri (Nunc). După blocare, α -syn umană agregată sau monomerică a fost incubată în godeuri. După spălare, α -syn umană captată a fost detectată prin adăugarea versiunii umane a IgG1 TM a aceluiași anticorp anti- α -syn și, ulterior, un conjugat IgG-Europiu anti-uman (Perkin Elmer) sau conjugat IgG-HRP anti-uman. Ulterior incubării și spălării, a fost adăugat substratul de detectare adecvat (TMB sau, respectiv, soluție de amplificare DELFIA) și placa a fost citită pe un cititor de plăci de microtitrare.

În acest test, doar α -syn umană agregată va fi captată și detectată, deoarece prezintă mai multe copii ale aceluiași epitop pe un agregat unic. Pentru α -syn monomerică este prezentă doar o copie a epitopului, prin urmare al doilea anticorp de detectare nu se poate lega în prezența anticorpului de captare. Datele sunt rezumate în Figura 8. Izolatul principal, asyn0087, este capabil să se lege de α -syn umană recombinantă agregată. Astfel, epitopul de care se leagă asyn0087 nu este implicat în sine în agregarea α -syn. Atât aslo0452 ngl-3 cât și aslo0543 și-au păstrat capacitatea de a se lega de α -syn umană recombinantă agregată.

Exemplul 8: Specificitatea IgG anti- α -syn optimizate în țesuturile relevante pentru boală prin imunohistochimie

Specificitatea IgG-urilor anti- α -syn cu afinitate optimizată, aslo0452 ngl-3 și aslo0543 și anticorpul principal asyn0087, pentru formele relevante pentru boală ale α -syn umane a fost determinată prin colorarea imunohistochimică a țesutului creierului cu boală Parkinson. Rezultatele sunt prezentate în Figura 9 și demonstrează că, la fel ca asyn0087, atât aslo0452 ngl-3, cât și aslo0543, pot recunoaște forme patologice relevante pentru boală de α -syn umană în secțiunile de țesut al creierului din boala Parkinson, inclusiv corpi Lewy, neuriti Lewy, agregate neuronale, puncte Lewy și țesutul de fundal al creierului. Nu a fost observată nicio colorare nespecifică în țesutul normal sau sănătos al creierului.

Exemplul 9: Determinarea afinității anticorpului anti- α -syn

Constantele de disociere de echilibru (K_D) pentru IgG-urile anti- α -syn pentru α -syn umană a fost determinată utilizând două tehnologii de platformă: Octet Red (Forte Bio) și KinExA (Sapidyne Instruments).

Ambele sisteme de test au prezentat o concordanță bună, indicând că afinitatea aslo0452 ngl-3 a fost în intervalul sub-nanomolar. Tabelul 1 prezintă măsurătorile afinității derivate pentru clonele cheie anti- α -syn generate de-a lungul procesului de izolare a principalului și optimizare a principalului.

Exemplul 9.1: Afinitatea lui aslo0452 ngl-3 prin Octet

Afinitatea IgG aslo0452 ngl-3 pentru α -syn-Flag-His umană monomerică, cu etichetă avi, exprimată recombinant bacterian a fost estimată utilizând un instrument Octet Red. Aslo0452 ngl-3 a fost preamestecat cu diferite concentrații din fiecare ligand până a fost atins echilibrul. Cantitatea de anticorp liber a fost măsurată apoi utilizând Octet prin captarea aslo0452 ngl-3 liberă utilizând α -syn biotinitată imobilizată pe senzori acoperiți cu streptavidină. Cantitatea de anticorp liber detectată la fiecare concentrație de α -syn a fost reprezentată grafic față de concentrația de ligand și a fost utilizat software-ul KinExA pentru a calcula constanta de disociere de echilibru (K_D). Rezultatele prezentate în Tabelul 1 demonstrează că aslo0452 ngl-3 IgG se leagă de α -syn umană cu o afinitate de 106 pM.

Exemplul 9.2: Afinitatea lui aslo0452 ngl-3 de KinExA

În plus, afinitatea fazei de soluție (K_D) de IgG aslo0452 ngl-3 pentru α -syn biotinitată umană monomerică exprimată recombinant bacterian a fost determinată utilizând un instrument KinExA (Sapidyne Instruments). Aslo0452 ngl-3 a fost preamestecat cu diferite concentrații din fiecare ligand până când a fost atins echilibrul. Cantitatea de anticorp liber a fost apoi măsurată utilizând KinExA prin captarea aslo0452 ngl-3 liberă utilizând bile acoperite cu α -syn, spălarea materialului nelegat și detectarea anticorpului legat utilizând un anticorp specific speciei marcat fluorescent. Cantitatea de anticorp liber detectată la fiecare concentrație de α -syn a fost reprezentată grafic față de concentrația de ligand și a fost utilizat software-ul KinExA pentru a calcula constanta de disociere de echilibru (K_D). Rezultatele prezentate în Tabelul 1 demonstrează că aslo0452 ngl-3 IgG se leagă de α -syn cu o afinitate de 74 pM, prezentând o concordanță bună cu testul Octet pentru afinitatea fazei de soluție de mai sus.

Exemplul 9.3: Afinitatea fragmentului Fab al aslo0452 ngl-3 prin KinExA

Fragmentul Fab al aslo0452 ngl-3 leagă α -sinucleina cu o afinitate ridicată. Valoarea K_D a fragmentului Fab al aslo0452 ngl-3 pentru α -sinucleină, măsurată prin analiza KinExA (așa cum s-a descris în exemplul de mai sus pentru anticorpul complet), este 174 pM (95% CI: 15-177 pM).

Exemplul 10: Efectele aslo0452 ngl-3 asupra nivelurilor de α -sinucleină liberă nelegată în lichidul interstital al cortexului prefrontal (ISF) la șobolanii Sprague Dawley masculi

Șobolanii Sprague Dawley masculi adulți (293-417 g; Harlan, Țările de Jos) au fost anesteziați și au fost implantate ghidaje în cortexul prefrontal.

Cu o zi înainte de experiment, au fost implantate sonde push pull (membrană de polietilenă 1-3 MDa 4 mm) în cortexul prefrontal utilizând un cadru stereotaxic (coordonatele pentru sonde: AP = -3,4 mm (la bregma), lateral + 0,8 mm (la linia mediană), ventral -5,0 mm (la dura), bara incisivă a fost setată la -3,3 mm (toate coordonatele conform Paxinos și Watson, The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, New York, ediția a 6-a 2008). Sondele au fost atașate de craniu cu un șurub din oțel inoxidabil și ciment dentar.

În ziua experimentului, sondele de microdializă push pull au fost conectate cu tuburi flexibile PEEK (Western Analytical Products Inc. USA; PK005-020) la o pompă de microperfuzie (Harvard) și perfuzate cu LCR artificial (perfuzat), conținând NaCl 147 mM, KCl 3,0 mM, CaCl₂ 1,2 mM și MgCl₂ 1,2 mM + BSA 0,2% la un debit de 0,5 μ L/min. Ieșirile sondelor au fost conectate la tuburi flexibile FEP. După un minim de două ore de prestabilizare, aslo0452 ngl-3 formulat în PBS sau doar PBS (vehicul) a fost dozat la 30 sau, respectiv, 0 mg/kg. Compusul a fost administrat la 2 mL/kg intravenos. Probele de microdializă au fost colectate la intervale de 120 de minute. Probele au fost colectate în minifiole (Microbiotech/se AB, Suedia; 4001029). Toate probele au fost depozitate la -80 °C.

Pentru a determina concentrația de α -sinucleină liberă la ISF de șobolan, probele de microdializă au fost mai întâi supuse imunoprecipitării pentru a îndepărta aslo0452 ngl-3. Imunoprecipitarea coprecipită α -sinucleina legată de anticorpii terapeutici, în timp ce α -sinucleina „liberă” nelegată rămâne în supernatant. O soluție de bile de proteină A (Dynabeads® Protein A) a fost adăugată pe o placă fără protecție cu 96 de godeuri (polipropilenă 0,2 mL) și spălată de două ori cu TBST (TBS 50 mM plus Tween 20 0,1%) utilizând un magnet (DynaMag™ 96 lateral) pentru a separa bilele de soluție. Probele de microdializă dezghețate cu ISF de șobolan (10 sau 20 μ L) au fost adăugate în fiecare godeu, amestecate cu bile prin pipetare în sus și în jos și incubate la 4°C cu rotație înclinată pentru 10 minute. Bilele au fost apoi granulate utilizând magnetul de două ori pentru a asigura îndepărtarea completă a bilelor. Probele cu ISF imunoprecipitat au fost transferate pe o placă cu 96 de godeuri dintr-un kit ELISA cu anti- α -sinucleină (kit ELISA cantitativ Sensolyte™, uman/de șoarece/de șobolan, AnaSpec, US, AS-55550) cu soluție tampon diluant pentru probă deja adăugată la un total volum de 100 μ L. Probele de calibrare, 100 μ L per godeu, au fost adăugate pe placă în duplicat și 50 μ L de soluție de lucru cu anticorpi de detectare au fost adăugați în fiecare godeu. Placa a fost incubată la +4-8°C peste noapte în timp ce se agita și protejată de lumină și apoi a fost spălată de șase ori cu 350 μ L de soluție tampon de spălare. În cele din urmă, au fost adăugați 100 μ L de substrat de culoare TMB în fiecare godeu și placa a fost incubată în 10-15 minute la temperatura camerei la întineric. Pentru a opri reacția, au fost adăugați 50 μ L de soluție de oprire în fiecare godeu și placa a fost citită în 2 ore la o absorbantă de 450 nm. Cuantificarea a fost efectuată prin reprezentarea grafică a răspunsului curbei standard ca unități de absorbantă pe scara liniară față de concentrație pe scara logaritmică. Pentru ajustarea curbei a fost utilizată o funcție cu patru parametri.

A fost demonstrată o scădere dependentă de timp a α -sinucleinei libere în ISF (Figura 10) după o administrare intravenoasă unică de aslo0452 ngl-3 de 30 mg/kg.

Exemplul 11: Efectele aslo0452 ngl-3 asupra nivelurilor de α -sinucleină liberă nelegată în LCR la sobolani Sprague Dawley masculi

Sobolanii Sprague Dawley masculi adulți au fost aneșteziați și au fost plasate catetere în cisterna magna pentru a găzdui eșantionarea LCR. O canulă interioară de 0,8 cm a fost introdusă în cisterna magna și exteriorizată printr-o incizie în partea superioară a craniului. Capătul cateterului pentru LCR a fost fixat în poziție cu ciment dentar acrilic și atașat de craniu cu trei șuruburi din oțel inoxidabil. Animalelor li s-a permis un minim de 2 zile de recuperare înainte să fie administrat compusul.

Aslo0452 ngl-3 a fost formulat în soluție tampon pentru dozare la 3, 10, 30 sau 100 mg/kg. Compusul sau doar vehiculul a fost administrat la 2 mL/kg intravenos.

După colectarea a cel puțin patru probe curate de LCR, prelevate pe parcursul a minimum două zile, a fost administrat compusul. Toate animalele au fost dozate fie cu aslo0452 ngl-3, fie cu vehicul în ziua „0”. Probele de LCR au fost colectate la fiecare punct de moment indicat. Toate probele au fost depozitate la -80 °C până la expediere.

Pentru a determina α -sinucleina liberă în LCR, α -sinucleina legată de aslo0452 ngl-3 este îndepărtată prin imunoprecipitare (IP) înainte de analiză. IP va coprecipita α -sinucleina legată de anticorpii terapeutici, în timp ce α -sinucleina „liberă” nelegată rămâne în supernatant. Determinarea nivelurilor libere de α -sinucleină în supernatant se realizează utilizând un kit ELISA comercial obținut de la Anaspec. Analiza a fost efectuată așa cum s-a descris pentru rezultatele ISF (așa cum s-a descris în Exemplul 10).

O scădere dependentă de doză și timp a α -sinucleinei libere a fost demonstrată în LCR (Figura 11) după o administrare intravenoasă unică de aslo0452 ngl-3 în intervalul de doze 3-100 mg/kg.

Exemplul 12: Caracterizarea funcțională a aslo0452 ngl-3 prin reducerea răspândirii alfa-sinucleinei într-un model lentiviral *in vivo* de alfa-sinucleinopatie

Capacitatea unui anticorp anti-alfa-sinucleină cu afinitate ridicată, aslo0452 ngl-3, de a bloca răspândirea alfa-sinucleinei a fost investigată utilizând un model lentiviral de șoarece *in vivo* de alfa-sinucleinopatie. În acest scop, atât șoarecii non-transgenici de tip sălbatic (non-tg), cât și șoarecii transgenici care supraexprimă alfa-sinucleină (α -syn tg) au fost injectați cu un vector lentiviral care exprimă alfa-sinucleina (LV- α -syn) în hipocampusul drept și apoi au fost imunizați pasiv săptămânal pentru 13 săptămâni cu anticorpi IgG1 de șoarece anti-alfa sinucleină incluzând, aslo0452 ngl-3 și un IgG1 de șoarece izotip martor NIP228. La sfârșitul perioadei de imunizare, șoarecii au fost eutanasiați și creierele lor au fost fixate în PFA 4%, apoi sectionate coronal și analizate prin imunocitochimie cu analiza automată a imaginii pentru nivelurile de imunoreactivitate al alfa-sinucleinei ipsilateral și contralateral față de situsul injectării LV- α -syn.

Chirurgie și imunizare pasivă

Șoarecii de tip sălbatic non-transgenici cu vârstă de trei până la patru luni (non-tg; n=40) și șoarecii transgenici cu alfa-sinucleină (a-syn tg; n=40) au primit o injecție unică unilaterală în hipocampusul drept (-2,0, 1,5, -1,3 de Bregma) cu un vector lentiviral care exprimă alfa-sinucleină (LV- α -syn). La două săptămâni după operația de injecție cu LV- α -syn, șoarecii au primit doze săptămânale de anticorpi IgG1 de șoarece anti-alfa-sinucleină: aslo0452 ngl-3 (non-tg n=10; α -syn tg n=10), aslo0452 ngl-3 D265A (non-tg n=10; α -syn tg n=10), 9E4 (non-tg n=10; α -syn tg n=10), sau au fost dozați cu IgG1 de șoarece martor izotip NIP228 (non- tg n=10; α -syn tg n=10).

Toate IgG-urile de șoarece au fost dozate la 20 mg/kg pe cale intraperitoneală (IP) pentru 13 săptămâni. Animalele au fost găzduite în grup cu un maximum sau 4 per cușcă. Animalele au fost ținute în ciclu 12/12 lumină/întuneric cu acces la hrană și apă ad libitum. Cuștile au fost schimbate o dată pe săptămână și monitorizate zilnic. Au fost raportate orice evenimente adverse. Toate animalele au tolerat atât procedurile chirurgicale, cât și imunizările. La sfârșitul perioadei de tratament cu anticorpi, șoarecii au fost eutanasiați urmând principiile directoare pentru tratamentul uman al animalelor și creierele lor au fost sectionate în serie în axele coronale și evaluate pentru analiza neuropatologică a răspândirii alfa-sinucleinei prin metode imunocitochimice.

Imunocitochimia alfa-sinucleinei

Creierele au fost îndepărtate, fixate în paraformaldehidă 4% și secțiuni tăiate la intervale de 40 μ m în axele coronale utilizând un vibratom și depozitate la -30°C în mediu crioprotector (glicerină 30%, etilenglicol 30%, PBS 40%). După spălările cu PBS și a etapelor cu soluție tampon de blocare, secțiunile

au fost incubate peste noapte la 4°C cu anticorp primar (mAb anti-alfa-sinucleină SYN-1 de la BD la o diluție de 1:500), spălate în PBS și incubate pentru 1 oră la temperatura camerei cu anticorp secundar (IgG anti-șoarece biotinitat de la Vector Laboratories la o diluție de 1:100). După etapele finale de spălare cu PBS, colorarea cu alfa-sinucleină a fost localizată utilizând sistemul de detectare cu complexul avidină/biotină-peroxidază (Elite ABC, Vector Laboratories). Secțiunile au fost apoi analizate cu analiza automată a imaginii pentru nivelurile de alfa-sinucleină ipsilateral și contralateral față de locul injectării vectorului lentiviral (LV- α -syn).

Statistici

Datele generate din achiziția automată de imagini a nivelurilor de alfa-sinucleină în grupurile de tratament non-tg și α -syn tg au fost analizate utilizând software-ul GraphPad Prism, San Diego California, USA. ANOVA într-un sens a fost efectuată cu post-testul de comparație multiplă a lui Dunnett. Datele prezentate în figuri sunt prezentate ca medie $\pm$ abaterea standard a mediei (SEM). Diferențele dintre grupuri au fost considerate a fi de semnificație statistică atunci când $p < 0,05$. Toate analizele au fost efectuate în orb pentru evaluator. Grupurile de tratament cu anticorpi au fost, de asemenea, în orb pentru evaluator.

Rezultate

Atât la șoarecii non-tg, cât și la șoarecii α -syn tg, imunoreactivitatea alfa-sinucleinei pe partea ipsilaterală injectată cu LV- α -syn a fost intensă în neuropil și a acoperit cea mai mare parte a suprafeței hipocampului (Figura 12 A, Figura 15 A; NIP228 — Ipsilateral). Hipocampul contralateral neinjectat al șoarecilor non-tg și șoarecilor α -syn tg au prezentat, de asemenea, niveluri ridicate de imunoreactivitate alfa-sinucleinei, indicând că alfa-sinucleina exprimată lentiviral s-a răspândit din hipocampul drept injectat în hipocampul stâng (Figura 12). A, Figura 15 A; NIP228 — Contralateral). În acest model de șoarece cu injectare lentivirală cu alfa-sinucleină, experimentele anterioare au prezentat că doar proteina alfa-sinucleină exprimată se răspândește în partea controlaterală, fără nicio dovadă de transfer al lentivirusului în sine, așa cum a fost determinat prin analiza PCR (date neprezentate).

Nivelurile hipocampale ipsilaterale și contralaterale ale alfa-sinucleinei exprimate lentiviral la șoarecii non-tg care au fost imunizați pasiv cu anticorpul 9E4 (9E4 — versiunea de șoarece a PRX002 (Prothena)) au fost aproape identice cu nivelurile hipocampale hipocampale ipsilaterale și contralaterale ale alfa-sinucleinei exprimate lentiviral la șoarecii non-tg care au fost imunizați pasiv cu IgG1 de șoarece martor izotip NIP228 (Figura 12 A, B, C; 9E4 în comparație cu NIP228), indicând că 9E4 atunci când este dozat la 20 mg/kg săptămânal pentru 13 săptămâni prin calea IP, nu blochează diseminarea alfa-sinucleinei în acest model de răspândire a alfa-sinucleinei.

În contrast, atât nivelurile hipocampale ipsilaterale, cât și cele contralaterale ale alfa-sinucleinei exprimate lentiviral la șoarecii non-tg care au fost imunizați pasiv fie cu anticorp aslo0452 ngl-3, fie cu o versiune mutantă nulă efectoare a aslo0452 ngl-3 (aslo0452-ngl-3-D265A), în care înlocuirea acidului aspartic cu alanină la poziția 265 (D265A) în IgG1 de șoarece are ca rezultat pierderea interacțiunii dintre acest izotip și receptorii Fc ai IgG cu afinitate scăzută (Fc γ RIIB și Fc γ RIII) găsite pe microglia, au fost foarte semnificativ mai mici decât nivelurile hipocampale ipsilaterale și contralaterale ale alfa-sinucleinei exprimate lentiviral la șoarecii non-tg care au fost imunizați pasiv cu IgG1 de șoarece martor izotip NIP228 (Figura 12 A, B, C; aslo0452-ngl-3 & aslo0452-ngl-3-D265A în comparație cu NIP228). Aceasta indică că imunizarea pasivă a șoarecilor fie cu aslo0452-ngl-3, fie cu versiunea mutantă nulă efectoare D265A a aslo0452-ngl-3 blochează în mod robust răspândirea alfa-sinucleinei în acest model de șoarece cu alfa-sinucleinopatie. Rezultate similare au fost obținute atunci când vectorul LV- α -syn a fost injectat în hipocampul drept al șoarecilor α -syn tg; imunizarea pasivă cu aslo0452-ngl-3 sau aslo0452-ngl-3-D265A, dar nu cu 9E4, a condus la o reducere robustă și semnificativă statistic atât a nivelurilor ipsilaterale, cât și a celor contralaterale ale imunoreactivității alfa-sinucleinei în hipocamp în comparație cu șoarecii α -syn tg tratați cu NIP228. (Figura 15 A, B, C).

La o amplificare mai ridicată, depozitele imunoreactive de alfa-sinucleină exprimate lentiviral au fost observabile atât de-a lungul axonilor ipsilaterali ai părții injectate, cât și de-a lungul axonilor contralaterali ai părții neinjectate a șoarecilor non-tg (Figura 13 A; săgeți negre care prezintă axonii trans-hipocampali), sugerând că răspândirea alfa-sinucleinei la hipocampul contralateral poate apărea în principal de-a lungul axonilor (răspândire trans-axonală). Nivelurile ipsilaterale și contralaterale ale depozitelor de alfa-sinucleină axonală la șoarecii non-tg imunizați pasiv fie cu anticorp 9E4, fie cu IgG1 de șoarece martor izotip NIP228 nu au fost semnificativ diferite (Figura 13 A, B, C; 9E4 în comparație cu NIP228), indicând că în condițiile noastre experimentale, 9E4 nu afectează nivelurile depozitelor axonale de alfa-sinucleină și nici nu reduce diseminarea alfa-sinucleinei de-a lungul axonilor în acest model de răspândire lentiviral-alfa-sinucleinopatiei.

În schimb, atât nivelurile ipsilaterale, cât și cele contralaterale ale depozitelor de alfa-sinucleină axonală la șoarecii non-tg imunizați pasiv fie cu anticorp aslo0452 ngl-3, fie cu versiunea mutantă nulă efectorie a aslo0452-ngl-3 (aslo0452-ngl-3-D265A), au fost semnificativ mai mici decât nivelurile de depozite axonale de alfa-sinucleină la șoarecii non-tg tratați cu IgG1 de șoarece martor izotip NIP228 (Figura 13 A, B, C; aslo0452-ngl-3 & aslo0452-ngl-3-D265A în comparație cu NIP228), indicând că imunizarea pasivă a șoarecilor fie cu aslo0452-ngl-3, fie cu versiunea mutantă D265A nulă efectorie a aslo0452-ngl-3 curăță depozitele axonale de alfa-sinucleină și blochează puternic transferul ipsilateral-contralateral al alfa-sinucleinei de-a lungul axonilor în acest model de șoarece cu lentiviral-alfa-sinucleinopatie.

Rezultate foarte similare au fost obținute atunci când vectorul LV- α -syn a fost injectat în hipocampusul drept al șoarecilor α -syn tg; imunizarea pasivă cu aslo0452-ngl-3 sau aslo0452-ngl-3-D265A, dar nu cu 9E4, a condus la o reducere robustă și semnificativă statistic atât a nivelurilor ipsilaterale, cât și a nivelurilor contralaterale ale imunoreactivității alfa-sinucleinei de-a lungul axonilor în comparație cu șoarecii α -syn tratați cu NIP228 (Figura 16 A, B, C).

La șoarecii non-tg injectați cu LV- α -syn, la o amplificare mai ridicată a fost detectată o imunoreactivitate intensă a alfa-sinucleinei în neuropilul hipocampusului ipsilateral și într-o măsură mai mică în neuropilul neocortexului ipsilateral (Figura 14 A). În plus, au fost detectate depozite intense de alfa-sinucleină într-un număr de corpi celulari neuronali identificabili (soma) în regiunea CA1 a hipocampusului ipsilateral și a fost detectată o imunoreactivitate mai slabă a alfa-sinucleinei în neuronii din stratul 5 al neocortexului ipsilateral (Figura 14); săgeți negre). În timp ce tratamentul cu anticorpul 9E4 nu a modificat semnificativ numărul de neuroni hipocampali CA1 ipsilaterali sau neuroni neocorticali din stratul ipsilateral 5 conținând depozite de alfa-sinucleină în comparație cu șoarecii non-tg imunizați cu IgG de șoarece martor izotip NIP228 (Figura 14 A, B, C; 9E4 în comparație cu NIP228), șoarecii non-tg tratați fie cu anticorp aslo0452 ngl-3, fie cu o versiune mutantă nulă efectorie a aslo0452-ngl-3 (aslo0452-ngl-3-D265A) au avut un număr semnificativ redus de neuroni CA1 ipsilaterali și neuroni din stratul ipsilateral 5 conținând depozite de alfa-sinucleină în comparație cu șoarecii non-tg tratați cu IgG de șoarece martor izotip NIP228 (Figura 14 A, B, C; aslo0452-ngl-3 & aslo0452-ngl-3-D265A în comparație cu NIP228).

De asemenea, intensitatea imunoreactivității alfa-sinucleinei în neuropilul și neuronii regiunii CA1 ipsilaterale a hipocampusului și a regiunii stratului ipsilateral 5 al neocortexului a fost semnificativ mai scăzută la șoarecii non-tg tratați cu aslo0452-ngl-3 și aslo0452-ngl-3-D265A în comparație cu șoarecii non-tg tratați cu IgG de șoarece martor izotip NIP228, șoareci (Figura 14 A; aslo0452-ngl-3 și aslo0452-ngl-3-D265A în comparație cu NIP228).

Rezultate similare au fost obținute atunci când vectorul LV- α -syn a fost injectat în hipocampusul drept al șoarecilor α -syn tg; tratamentul cu aslo0452-ngl-3 sau aslo0452-ngl-3-D265A, dar nu 9E4, a condus la o scădere semnificativă statistic a numărului de neuroni conținând imunoreactivitate puternică a alfa-sinucleinei în regiunile hipocampale CA1 ipsilaterale și neocorticale ale stratului 5, precum și în regiunea hipocampală CA1 contralaterală, în comparație cu șoarecii α -syn tg tratați cu NIP228 (Figura 17 A, B, C, D).

S-a demonstrat că imunizarea pasivă fie a șoarecilor non-tg de tip sălbatic, fie a șoarecilor α -syn tg, care au fost ambii injectați stereotactic cu un vector lentiviral care conduce expresia alfa-sinucleinei umane pe o parte a hipocampusului, anticorpul IgG1 de șoarece anti-alfa-sinucleină cu o afinitate ridicată, aslo0452-ngl-3, reduce puternic răspândirea trans-axonală ipsilaterală către contralaterală a alfa-sinucleinei exprimată lentiviral care este observată în acest model de șoarece de propagare a alfa-sinucleinei. Proprietatea anticorpului anti-alfa-sinucleină recent dezvăluită de a inhiba răspândirea alfa-sinucleinei *in vivo* indică legarea de un epitop diferit al alfa-sinucleinei umane în comparație cu anticorpii care nu inhibă răspândirea în modelul testat; *de exemplu*, anticorpul 9E4.

În plus, datele care prezintă că o versiune mutantă D265A nulă efectorie a aslo0452-ngl-3 este la fel de eficientă precum aslo0452-ngl-3 la reducerea răspândirii alfa-sinucleinei în model indică că profilaxia mediată de anticorpi a răspândirii alfa-sinucleinei nu necesită funcțiile efectorie asociate Fc ca un mecanism cheie de acțiune și, în particular, aceasta indică că nu pare să existe o necesitate sau rol pentru receptorii Fc (Fc γ RIIB și Fc γ RIII) prezenți pe microglia în blocarea mediată de anticorpi a răspândirii alfa-sinucleinei.

În rezumat, anticorpii prezentei dezvăluiri care țintesc alfa-sinucleina, precum și fragmentul acesteia de legare de antigen, au potențialul de a modifica boala în PD sau DLB sau MSA prin blocarea sau încetinirea captării patologice a alfa-sinucleinei în celulele primare și prevenind înșămânțarea și transmiterea patologiei alfa-sinucleinei între regiunile creierului conectate anatomic. În acest fel, anticorpii care țintesc alfa-sinucleina pot trata sau preveni progresia bolii și pot fi spre beneficiu terapeutic pentru pacienții cu sinucleinopatii, precum PD, DLB sau MSA.

Exemplul 13: Generarea de anticorpi bispecifici 0452 ngl-3-BBBt0626gl

Anticorpii bispecifici tipici conform prezentei dezvăluiri cuprinzând scheletul IgG1 TM uman asociat cu un fragment cu lanț unic (scFv) de BBBt0626gl, greșat la N-terminus (format Bis2) sau C-terminus (format Bis3) al lanțului greu al aslo0452 ngl-3 au fost generați așa cum s-a descris mai jos.

Un anticorp bispecific conform prezentei dezvăluiri, într-un format Bis2, a fost generat prin producerea în mod sintetic a unui fragment de ADN care codifică Bbbt0626glscFv-(G4S)x2-aslo0452 ngl-3 VH sau Bbbt0626wt-(G4S)x2-aslo0452 VH care conține BssHII și BstEII flancând situsurile de restricție a endonucleazei, în amonte de Bbbt0626glscFv sau Bbbt0626wt și, respectiv, în aval de aslo0452 ngl-3 VH. Fragmentele de ADN digerate au fost apoi clonate direcțional în scheletul vectorului hIgG1TM.

Un anticorp bispecific conform prezentei dezvăluiri, într-un format Bis3, a fost generat prin amplificare PCR urmată de clonarea direcțională utilizând situsuri de restricție a endonucleazei (SfiI și XbaI). Au fost generate două fragmente PCR: (1) amplificarea domeniului hIgG1TM -CH3 de la situsul de restricție SfiI la capătul C-terminal al domeniului CH3 și (2) un fragment PCR suprapus cu un oligo PCR sens care încorporează capătul C-terminal al linkerului CH3-(G4S)x3 (SECV ID NR: 57) și capătul N-terminal al scFv Bbbt0626gl împreună cu un oligo care amplifică capătul C-terminal al scFv Bbbt0626gl și secvența vectorului imediat în aval dincolo de situsul de restricție XbaI. Ambele fragmente de PCR au fost prinse împreună într-o reacție PCR de tip pull-through și apoi clonate direcțional în pEU1_4 (vector IgG1TM uman) prin situsurile de restricție a endonucleazei SfiI și XbaI.

Acești anticorpi bispecifici au fost exprimați într-un sistem de expresie bazat pe CHO și anticorpii rezultați purificați prin purificarea pe coloană cu proteină A. Toți anticorpii bispecifici derivați de Bbbt0626 au fost testați pentru legarea in vitro de linia de celule endoteliale a creierului de șoarece (b.end3) pentru a confirma activitatea de legare a porțiunii transportor prin BBB și, de asemenea, au fost testați pentru competiția de legare a aslo0452 ngl-3 într-un test de competiție cu epitopii bazat pe HTRF pentru a confirma legarea de epitopul aslo0452 ngl-3.

LISTA DE SECVENȚE

<110> MEDIMMUNE LIMITED

<120> ANTICORPI ÎMPOTRIVA ALFA-SINUCLEINEI ȘI UTILIZĂRI A ACESTORA

<130> 1848081-0002-091-WO1

<140>

<141>

<150> 62/344,746

<151> 2016-06-02

<160> 61

<170> Patent În versiunea 3.5

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
35 40 45

Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
50 55 60

Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
65 70 75 80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
85 90 95

Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
100 105 110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
115 120 125

Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
130 135 140

<210> 2

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Gly Ala Val Asn Val Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Asn Asn Val Gly Asn
 20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
 35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
 65 70 75 80

Leu Phe Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Met Val Trp His Ser Gly Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110

10 Thr Val Leu
 115

<210> 4
 <211> 122
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (50)..(50)
 20 <223> /inlocuiește="Ala"

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (53)..(53)
 25 <223> /inlocuiește="Gly"

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (54)..(54)
 30 <223> /inlocuiește="Ser"

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (101)..(101)
 35 <223> /inlocuiește="Arg"

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (102)..(102)
 40 <223> /inlocuiește="Arg"

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (103)..(103)
 5 <223> /înlocuiește="Gly"

 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (104)..(104)
 10 <223> /înlocuiește="Arg"

 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (105)..(105)
 15 <223> /înlocuiește="Ile"

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(122)
 20 <223> /notă="Reziduurile variantă date în secvență nu au preferințe față de cele din adnotările pentru pozițiile variantelor"

 <400> 4
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Gly Gly Ala Asn His Val Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 25
 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 5

 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5
 35
 <210> 6
 <211> 17

<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <220>
<221> VARIANTA
<222> (1)..(1)
<223> /înlocuiește="Ala"

10 <220>
<221> VARIANTA
<222> (4)..(4)
<223> /înlocuiește="Gly"

15 <220>
<221> VARIANTA
<222> (5)..(5)
<223> /înlocuiește="Ser"

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> /notă="Reziduurile variantă date în secvență nu au preferințe față de cele din adnotările pentru pozițiile variantelor"

25 <400> 6

Ser	Ile	Ser	His	Leu	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

30 <210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <220>
<221> VARIANTA
<222> (3)..(3)
<223> /înlocuiește="Arg"

40 <220>
<221> VARIANTA
<222> (4)..(4)
<223> /înlocuiește="Arg"

45 <220>
<221> VARIANTA
<222> (5)..(5)
<223> /înlocuiește="Gly"

50 <220>
<221> VARIANTA
<222> (6)..(6)
<223> /înlocuiește="Arg"

55 <220>
<221> VARIANTA
<222> (7)..(7)
<223> /înlocuiește="Ile"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(13)
 5 <223> /notă="Reziduurile variantă date în secvență nu au preferințe față de cele din adnotările pentru pozițiile variantelor"

 <400> 7

 Gly Ala Asn His Val Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 10 1 5 10

 <210> 8
 <211> 114
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (27)..(27)
 20 <223> /inlocuiește="Ser"

 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (28)..(28)
 25 <223> /inlocuiește="Gly"

 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (29)..(29)
 30 <223> /inlocuiește="Asp"

 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (30)..(30)
 35 <223> /inlocuiește="Phe"

 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (31)..(31)
 40 <223> /inlocuiește="Ser"

 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (32)..(32)
 45 <223> /inlocuiește="Arg"

 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (42)..(42)
 50 <223> /inlocuiește="Pro"

 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (82)..(82)
 55 <223> /inlocuiește="Leu"

 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (99)..(99)
 60 <223> /inlocuiește="Ser"

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (100)..(100)
 5 <223> /inlocuiește="Ser"

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (102)..(102)
 10 <223> /inlocuiește="Ala"

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (104)..(104)
 15 <223> /inlocuiește="Tyr"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(114)
 20 <223> /notă="Reziduurile variantă date în secvență nu au preferințe față de cele din adnotările pentru pozițiile variantelor"

<400> 8
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
 35 40 45
 Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
 65 70 75 80
 Leu Phe Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met
 85 90 95
 Val Trp Asp His Gly Val Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
 100 105 110

25 Val Leu
 <210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (5)..(5)
 <223> /inlocuiește="Ser"

35 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (6)..(6)

```

<223> /înlocuiește="Gly"

<220>
<221> VARIANTA
5 <222> (7)..(7)
<223> /înlocuiește="Asp"

<220>
<221> VARIANTA
10 <222> (8)..(8)
<223> /înlocuiește="Phe"

<220>
<221> VARIANTA
15 <222> (9)..(9)
<223> /înlocuiește="Ser"

<220>
<221> VARIANTA
20 <222> (10)..(10)
<223> /înlocuiește="Arg"

<220>
<221> MISC_FEATURE
25 <222> (1)..(14)
<223> /notă="Reziduurile variantă date în secvență nu au preferințe față de cele din adnotările pentru
pozițiile variantelor"

<400> 9
30
Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys Tyr Arg Ile Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 11
35 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser
40 1 5 10

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
45 <213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANTA
<222> (4)..(4)
50 <223> /înlocuiește="Ser"

<220>
<221> VARIANTA
<222> (5)..(5)
55 <223> /înlocuiește="Ser"

<220>
<221> VARIANTA
<222> (7)..(7)

```

<223> /înlocuiește="Ala"

<220>

<221> VARIANTA

5 <222> (9)..(9)

<223> /înlocuiește="Tyr"

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(9)

<223> /notă="Reziduurile variantă date în secvență nu au preferințe față de cele din adnotările pentru pozițiile variantelor"

<400> 11

15

Met Val Trp Asp His Gly Val Trp Val
1 5

<210> 12

<211> 452

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Gly Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

5 <210> 13
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS

<222> (1)..(366)

<400> 13

gag	gtg	cag	ctg	ttg	gag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggg	ggg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		

tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ttt	agc	agc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			

gcc	atg	agc	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtc	144
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				

tca	tcc	att	tcc	cac	ctt	ggt	ggt	agc	aca	tac	tac	gca	gac	tcc	gtg	192
Ser	Ser	Ile	Ser	His	Leu	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					

aag	ggc	cgg	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	tcc	aag	aac	acg	ctg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70				75					80		

ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gcc	gag	gac	acg	gcc	gtg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		

gcg	gga	ggg	gca	aac	cac	ggg	aag	tac	tac	tac	gga	atg	gac	aag	tgg	336
Ala	Gly	Gly	Ala	Asn	His	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Lys	Trp	
			100					105					110			

ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca							366
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120									

5

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 14

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Gly Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys
 1 5 10

<210> 17
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys
 20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Met Val Trp Asp His Gly Val Trp Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
115 120 125

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
130 135 140

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
145 150 155 160

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
165 170 175

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
180 185 190

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
195 200 205

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215 220

<210> 18

5 <211> 345

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 18

10

caggctgtgc tgactcagcc ggcttcacctc tctgcgtctc ctggagcatc agccagtctc 60

acctgcacct tgcgcagtg ggcgcccctg ccgaagtata ggatatactg gtatcagcag 120

aagccaggga gtctctccca gtatctcctg aggtacaaat cagacgcaga taaacaccag 180

ggctctggag tccccagccg cttttctgga tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt 240

ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attattgtat ggtttgggac 300

cacggcgtct ggtatttcgg cggagggacc aagctgaccg tccta 345

15

<210> 19

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Met Val Trp Asp His Gly Val Trp Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

Thr Val Leu
115

5

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 20

Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys Tyr Arg Ile Tyr
1 5 10

15

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 21

Met Val Trp Asp His Gly Val Trp Tyr
1 5

25

<210> 22

<211> 452

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	Arg	Gly	Arg	Ile	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Lys	Trp	100	105	110	
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	115	120	125	
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	130	135	140	
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	145	150	155	160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	165	170	175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	180	185	190	
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	195	200	205	
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	210	215	220	
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	225	230	235	240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 23

5 <211> 366

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 23

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gggaggggca      300
cggcgcgggc gcatctacta cggaatggac aaatggggcc aagggaacaac ggtcaccgtc      360
tcctca                                     366

```

<210> 24
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

```

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

```

```

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

```

```

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

```

```

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

```

```

Ala Gly Gly Ala Arg Arg Gly Arg Ile Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp
          100          105          110

```

```

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

```

Ser Tyr Ala Met Ser
1          5

```

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27

5 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

10

Gly Ala Arg Arg Gly Arg Ile Tyr Tyr Gly Met Asp Lys
1 5 10

<210> 28

<211> 221

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Ser Gly Asp Phe Ser Arg
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Met Val Trp Ser Ser Gly Ala Trp Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

20

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
115 120 125

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
130 135 140

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
145 150 155 160

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
165 170 175

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
180 185 190

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
195 200 205

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215 220

5 <210> 29
<211> 345
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 29
caggctgtgc tgactcagcc ggcttccttc tctgcgtctc ctggagcatc agccagtctc 60
acctgcacct tgcgcagttc cggggacttc tcccggtata ggatatactg gtatcagcag 120
aagccaggga gtcctcccca gtatctcctg aggtacaaat cagacgcaga taaacaccag 180
ggctctggag tccccagccg cttttctgga tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt 240
ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attattgtat ggtttggtcc 300
10 agcggcgctt ggtacttcgg cggagggacc aagctgaccg tccta 345

<210> 30
<211> 115
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 30

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Ser Gly Asp Phe Ser Arg
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Met Val Trp Ser Ser Gly Ala Trp Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

Thr Val Leu
115

5 <210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 31

Thr Leu Arg Ser Ser Gly Asp Phe Ser Arg Tyr Arg Ile Tyr
1 5 10

15 <210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

20 Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser
1 5 10

25 <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

30 Met Val Trp Ser Ser Gly Ala Trp Tyr
1 5

<210> 34
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <220>
<221> VARIANTA
<222> (1)..(1)
<223> /inlocuiește="Val"

40 <220>
<221> VARIANTA
<222> (11)..(11)
<223> /inlocuiește="Leu"

45 <220>
<221> VARIANTA
<222> (75)..(75)

<223> /înlocuiește="Arg"

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (1)..(123)

<223> /notă="Reziduurile variantă date în secvență nu au preferințe față de cele din adnotările pentru pozițiile variantelor"

<400> 34

10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35

<211> 108

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTA

20 <222> (15)..(15)

<223> /înlocuiește="Gly" sau "Ala"

<220>

<221> VARIANTA

25 <222> (28)..(28)

<223> /înlocuiește="Arg"

<220>

<221> VARIANTA

30 <222> (29)..(29)

<223> /înlocuiește="Arg" sau "Thr"

<220>

<221> VARIANTA

35 <222> (32)..(32)

<223> /înlocuiește="Thr"

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (33)..(33)
 <223> /înlocuiește="Ser"
 5
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (37)..(37)
 <223> /înlocuiește="Gln"
 10
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (44)..(44)
 <223> /înlocuiește="Ile"
 15
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (47)..(47)
 <223> /înlocuiește="Ile"
 20
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (50)..(50)
 <223> /înlocuiește="Glu"
 25
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (51)..(51)
 <223> /înlocuiește="Asp"
 30
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (57)..(57)
 <223> /înlocuiește="Ile"
 35
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (65)..(65)
 <223> /înlocuiește="Arg"
 40
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (68)..(68)
 <223> /înlocuiește="Thr"
 45
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (92)..(92)
 <223> /înlocuiește="Asn"
 50
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (93)..(93)
 <223> /înlocuiește="Thr"
 55
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (95)..(95)
 <223> /înlocuiește="Lys" sau "His"
 60

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (96)..(96)
 <223> /înlocuiește="Pro"
 5
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (97)..(97)
 <223> /înlocuiește="Trp"
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(108)
 <223> /notă="Reziduurile variantă date în secvență nu au preferințe față de cele din adnotările pentru
 15 pozițiile variantelor"
 <400> 35
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Arg Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Thr Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
 35 40 45
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 20 <210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (6)..(6)
 <223> /înlocuiește="Arg"
 30 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (7)..(7)
 <223> /înlocuiește="Arg" sau "Thr"
 35 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (10)..(10)
 <223> /înlocuiește="Thr"

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (11)..(11)
 <223> /înlocuiește="Ser"
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(11)
 <223> /notă="Reziduurile variantă date în secvență nu au preferințe față de cele din adnotările pentru
 10 pozițiile variantelor"
 <400> 36
 Gln Gly Asp Ser Leu Thr Ser Tyr Tyr Ala Asn
 1 5 10
 15
 <210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (2)..(2)
 <223> /înlocuiește="Glu"
 25
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (3)..(3)
 <223> /înlocuiește="Asp"
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(7)
 <223> /notă="Reziduurile variantă date în secvență nu au preferințe față de cele din adnotările pentru
 35 pozițiile variantelor"
 <400> 37
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5
 40
 <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (5)..(5)
 <223> /înlocuiește="Asn"
 50
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (6)..(6)
 <223> /înlocuiește="Thr"
 55
 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (8)..(8)
 <223> /înlocuiește="Lys" sau "His"

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (9)..(9)
 5 <223> /înlocuiește="Pro"

 <220>
 <221> VARIANTA
 <222> (10)..(10)
 10 <223> /înlocuiește="Trp"

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(11)
 15 <223> /notă="Reziduurile variante dată în secvență nu au preferințe față de cele din adnotările pentru pozițiile variantelor"

 <400> 38

 20 Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val
 1 5 10

 <210> 39
 <211> 123
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 39

 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

 Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

 30 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens

 <400> 40

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 42
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 42

Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 43
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
 1 5 10

5 <210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 45

10 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 46
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val
 20 1 5 10

<210> 47
 <211> 123
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> sursa
 <223> /notă="Bbbt0626 VH"
 30 <400> 47

Gly Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Arg Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

35 <210> 48
 <211> 122
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Tyr
20 25 30

Ser Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Val Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 49

Thr Tyr Ser Ile Thr
1 5

15

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 50

Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe Gln
1 5 10 15

Gly

25

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 51

Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 52
 <211> 122
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 52

 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Tyr
 20 25 30

 Ser Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

 Gly Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe
 50 55 60

 Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Val Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 10 Ala Lys Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

 Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 53
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 53

 Thr Tyr Ser Ile Thr
 20 1 5

 <210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

 <400> 54

 Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe Gln
 1 5 10 15

 Gly
 30
 <210> 55
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 55

Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro
 1 5 10
 <210> 56
 5 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <221> sursa
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: polipeptidă sintetică"
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(50)
 <223> /notă="Această secvență poate cuprinde 1-10 unități repetate 'Gly Gly Gly Gly Ser'
 <220>
 20 <221> sursa
 <223> /notă="A se vedea specificația așa cum s-a depus pentru descrierea detaliată a substituțiilor și a
 variantelor preferate"
 <400> 56
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45
 Gly Ser
 25 50
 <210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursa
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: peptidă sintetică"
 35 <400> 57
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 40 <210> 58
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 58

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys

5

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 59

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

15

<210> 60
<211> 102
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 60

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ile Asn Val Gly Thr
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Met Ile Trp His Trp Val
100

<210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 61

 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10
 10

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- D. GAMES ET AL: "Reducing C-Terminal-Truncated Alpha-Synuclein by Immunotherapy Attenuates Neurodegeneration and Propagation in Parkinson's Disease-Like Models", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 34, no. 28, 9 July 2014 (2014-07-09), pages 9441-9454, XP055322627, US ISSN: 0270-6474, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5314-13.2014
- WO-A1-2011/104696
- WO-A1-2014/132210
- JUN SUNG LEE ET AL: "Mechanism of Anti-[alpha]-Synuclein Immunotherapy", JOURNAL OF MOVEMENT DISORDERS, vol. 9, no. 1, 1 January 2016 (2016-01-01) , pages 14-19, XP055399298, ISSN: 2005-940X, DOI: 10.14802/jmd.15059
- WO-A1-2015/075011
- WO-A2-2008/103472

(57) Revendicări:

1. Anticorp sau fragment al acestuia de legare de antigen care se leagă de α -sinucleina umană, în care anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen cuprinde:

a) trei CDR-uri ale lanțului greu având secvențele:

- (i) H-CDR1 din SECV ID NR: 5,
- (ii) H-CDR2 din SECV ID NR: 15; și
- (iii) H-CDR3 din SECV ID NR: 16 și

b) trei CDR-uri ale lanțului ușor având secvențele:

- (i) L-CDR1 din SECV ID NR: 20,
- (ii) L-CDR2 din SECV ID NR: 10; și
- (iii) L-CDR3 din SECV ID NR: 21.

2. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen al revendicării 1, în care anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen se leagă de α -sinucleina umană cu o K_D de mai puțin de 500 pM.

3. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen al revendicării 1 sau 2, în care anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen cuprinde un lanț variabil greu cuprinzând o secvență de aminoacizi care este cel puțin 90% identică cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 14.

4. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-3, în care anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen cuprinde cuprinde un lanț variabil greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 14.

5. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-4, în care anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen cuprinde un lanț variabil ușor

cuprinzând o secvență de aminoacizi care este cel puțin 90% identică cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 19.

6. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-5, în care anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen cuprinde un lanț variabil ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 19.

7. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-6, în care anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen este un anticorp.

8. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-7, în care anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen cuprinde o mutație triplă în regiunea Fc corespunzătoare numerotării L234F/L235E/P331S pe baza numerotării Kabat.

9. Anticorp sau fragment acestuia de legare de antigen, conform oricăreia dintre revendicările de la 1 până la 8, pentru utilizare în profilaxia sau tratamentul unei α -sinucleinopatii.

10. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen, pentru utilizare conform revendicării 9, în care α -sinucleinopatia este selectată dintre boala Parkinson (PD), demența cu corpi Lewy (DLB) și atrofia multisistemică (MSA).

11. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen, pentru utilizare conform revendicării 10, în care α -sinucleinopatia este boala Parkinson (PD).

12. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare de antigen, pentru utilizare conform revendicării 10, în care α -sinucleinopatia este atrofia multisistemică (MSA).

Figura 1

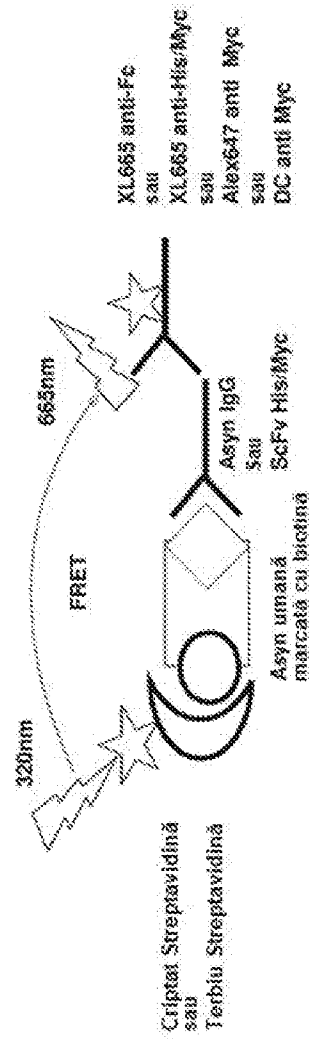


Figura 2

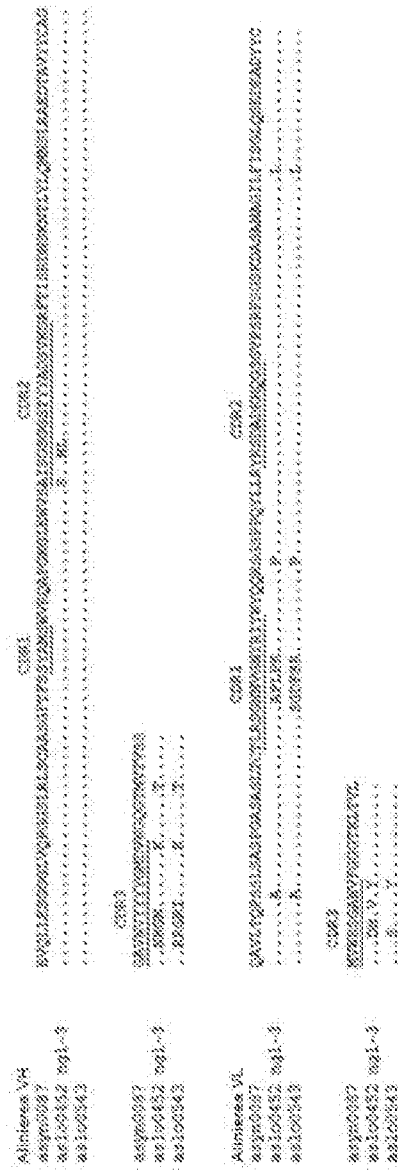


Figure 3A

GAG GTG CAG CTG TTG GAG TGT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCG GGG GGG TCC CTG
 E V Q L L E S S G G L V Q R G G S L
 AAG CTC TTC TCT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGG TAT GTC ACC AAG ACC TGG
 K L S C A A A S G P T F S S Y A M S W
 GTC TTC CAG GCT GCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA TCC ATT TCC CAC CTC
 V R Q A P G R G L E R Y S S L S R L
 GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC GGG TTC ACC ATC TCC AGA
 G S S T Y X A D S V X G W R S L S G
 GAC AAT TTC AAG AAC AGC CTG TAT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GTC GAG GAC
 D N S R R T L Y L Q M R S L A A E D
 AGS GTC CTG TAT TAC TGT GCG GGA GGG GCA AAG CAC GGG AAG TAC TAC TAC GGA
 T A V Y Y C A G G A R R R G K Y Y Y G
 AAG GAC AAG TGG GGC CAA GGG ACC AAG GTC ACC GTC TCC TCA
 M S L N G G T X Y T V S S

Figure 3B

CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG GCT TTC CTG TTT GGG TCT CCG GGA GCA TCA GCG
 Q A V L T T Q P A S L S A S P G A S A
 AAT CTC ACG TCG ACC TTG GAG GGC AAT GAG GGG CCG CTG CCG AAG TAT AAG ATA TAC
 S L T C T L A S G A P L P K Y R L I I
 TGG TAT CAG CAG AAG GTA GGG AGT CTC CCG GAG TAT CTC CTG AAG TAC AAA TCA
 N Y Q G K P G S P Q Y L L R Y K S
 GAC GCA GAT AAA CAG CAG CCG TCT GGA GTC GGC AGC CTC TTT TCT GGA TCC AAA
 D A D R R G G S G V P S R R S G S X
 GAT GCT TCG GCG AAT GCA GGG ATT TTA CTG ATC TCT GGG CTC CAG TCT GAG GAT
 D A S A R A G L L L L S G L Q G S D
 GAG GGT GAC TAT TAT TGG GTT TGG GAG CAG GGC GTC TGG TAT TTC GAG GGA
 S A D T L T C N Y R D R H G V M Y F G G
 GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA
 G T K L T V L

as100452 ng1-3
 10003-23*01
 Vernier (*)

```

EVQLLEGGGSLVQPGGGSLRLSCAASGFTFSVYAVENYRQAPGGGLENNVS
*
EVQLLEGGGSLVQPGGGSLRLSCAASGFTFSVYAVENYRQAPGGGLENNVS
***
  
```

VHCDR1

Figura 3C

as100452 ng1-3
 10003-23*01
 Vernier (*)

```

SIHLLGGSTYYADSVGGFTISRDNSKNTILYLNHSLRAZEDAVYYCAQ
*
AIHSGGGSTYYADSVGGFTISRDNSKNTILYLNHSLRAZEDAVYYCAQ
***
  
```

VHCDR2

as100452 ng1-3
 10003-23*01
 Vernier (*)

```

GARRGRYYGNDKNGQSTIVSS
*
NGQSTIVSS
  
```

VHCDR3

as100452 ng1-3
 10003-45*01
 Vernier (*)

```

QAVLTGPASLSRPGASRLCTIGGAPLWIKIYWGQKSSPPQVLR
*
QAVLTGPASLSRPGASRLCTIGGAPLWIKIYWGQKSSPPQVLR
***
  
```

VLCDR1

Figura 3D

as100452 ng1-3
 10003-45*01
 Vernier (*)

```

YPSDADRHQGGGVSRFSRSDAANAGILISGLSEEDADYTCVWDSGVWY
*
YPSDADRHQGGGVSRFSRSDAANAGILISGLSEEDADYTCVWDSGVWY
***
  
```

VLCDR2

as100452 ng1-3
 10003-45*01
 Vernier (*)

```

FGGGTILTV---L
*
FGGGTILTV---L
  
```

VLCDR3

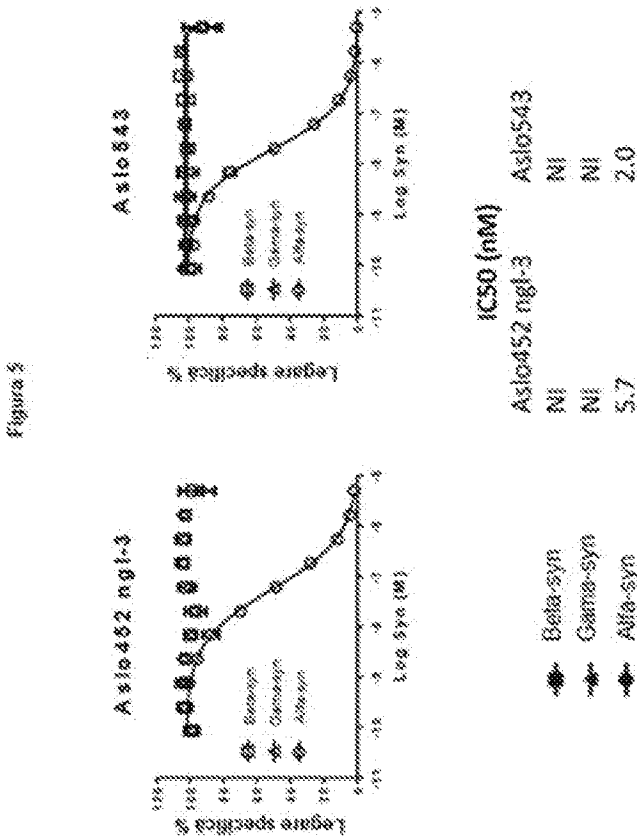
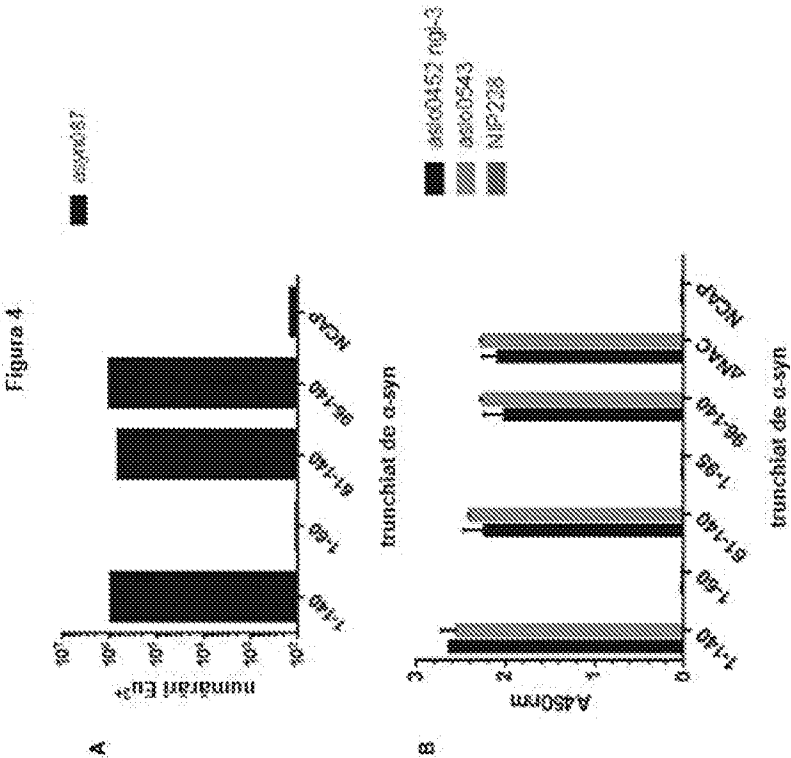


Figura 7A

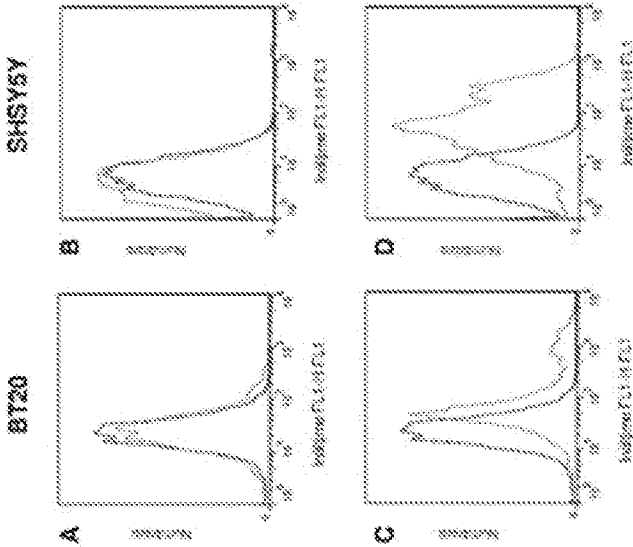


Figura 6

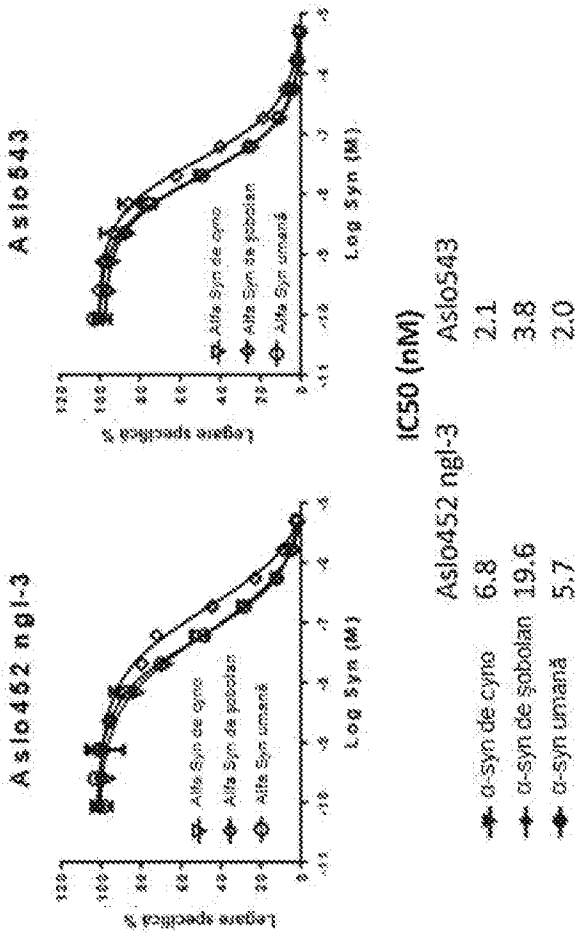


Figura 7B

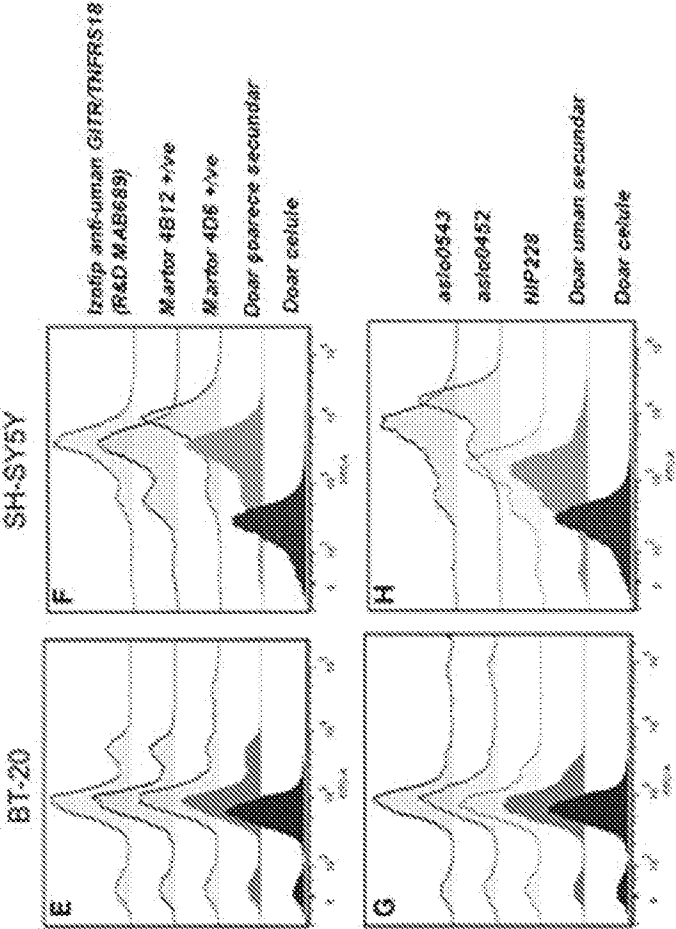


Figura 8

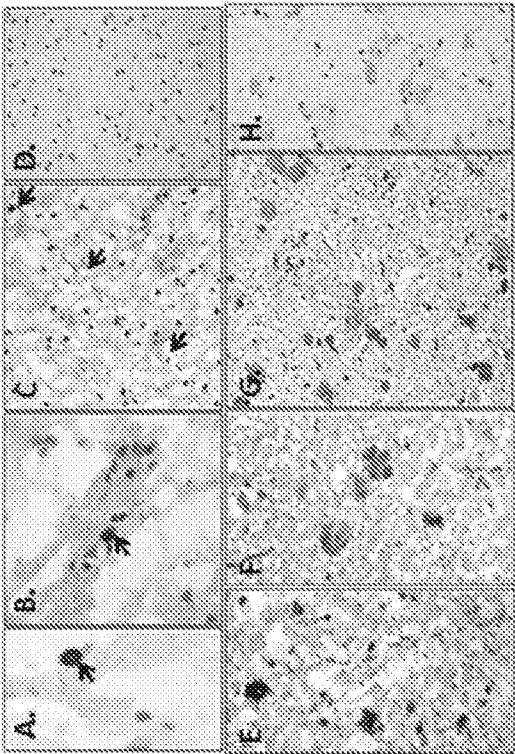
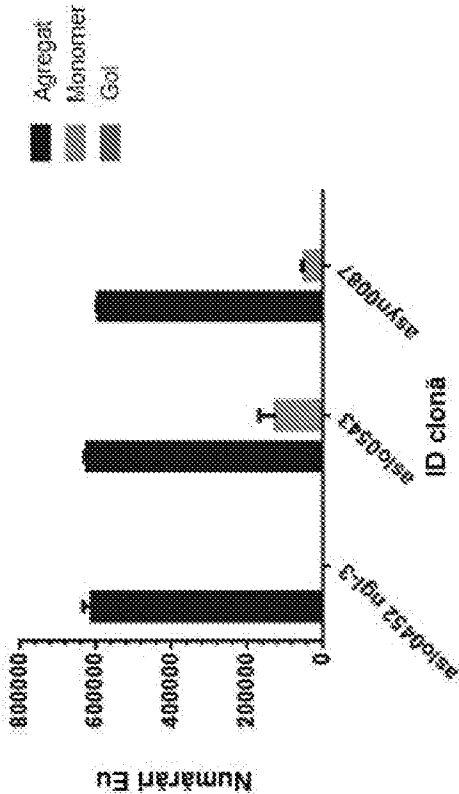


Figura 9A

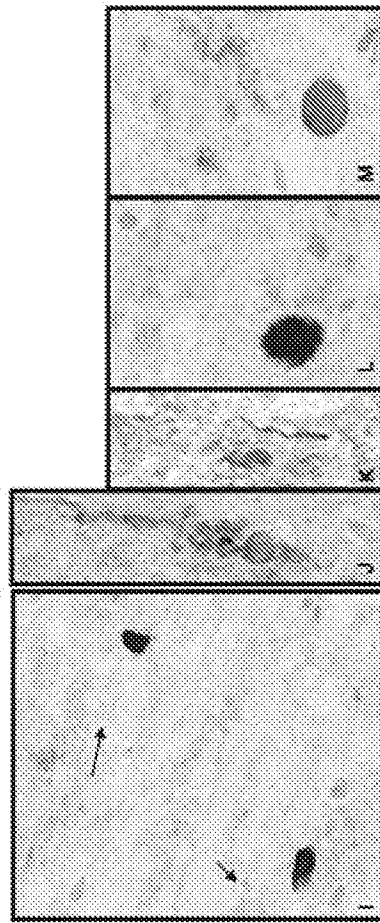


Figure 9B

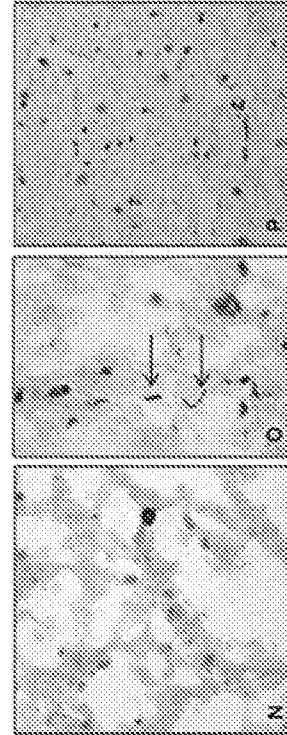


Figure 9C

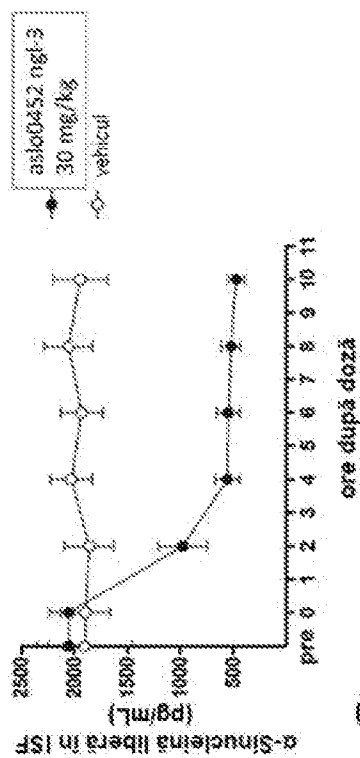


Figura 10A

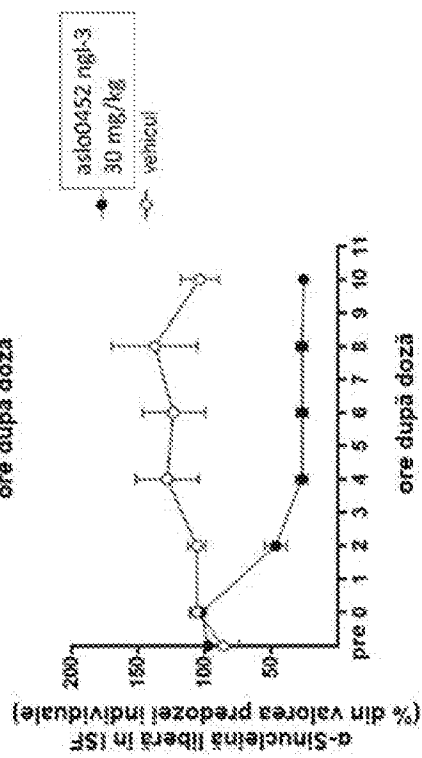


Figura 10B

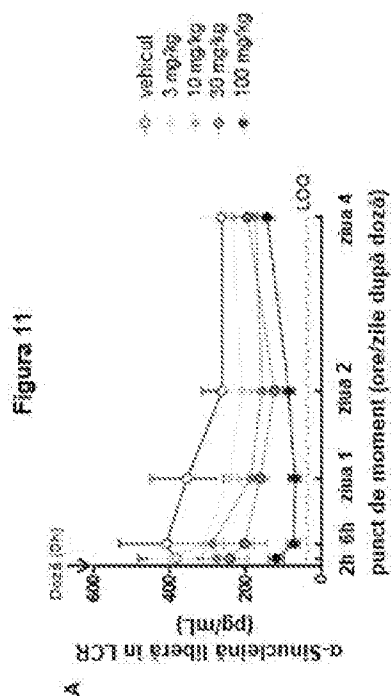


Figura 11

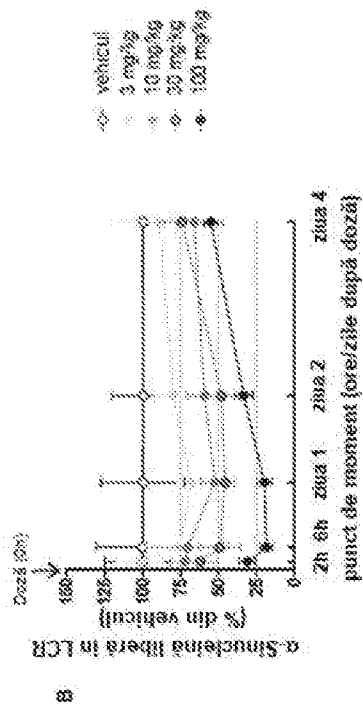


Figure 12

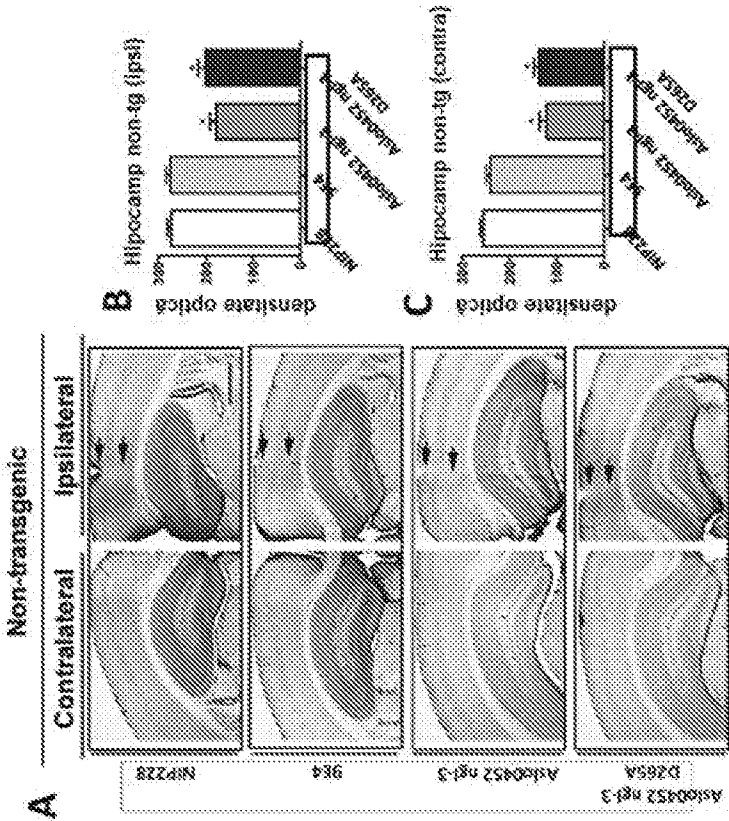


Figure 13

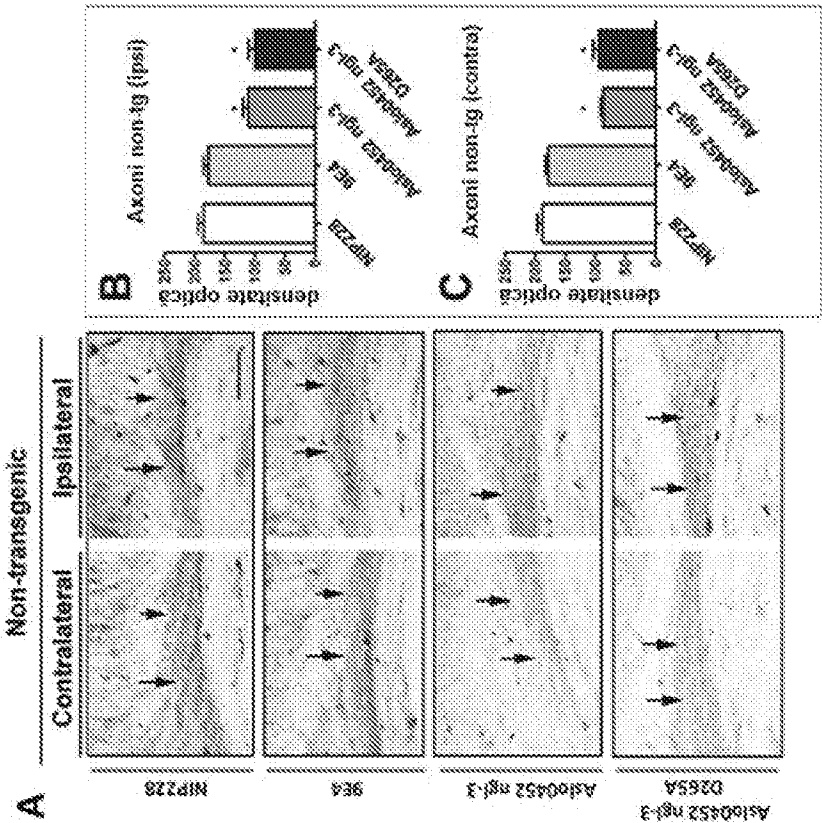


Figura 14

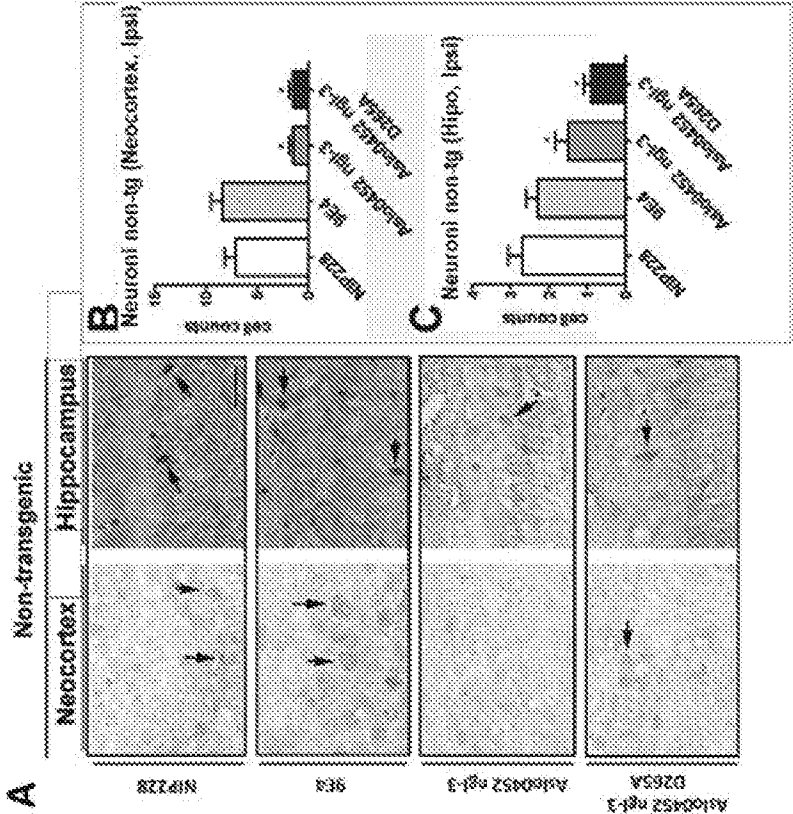


Figura 15

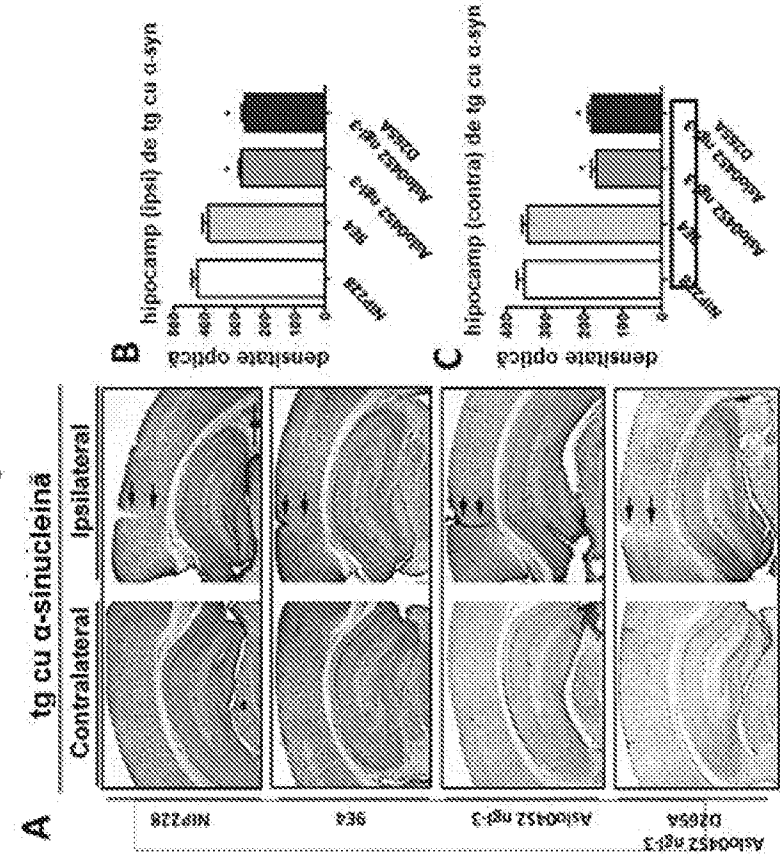


Figura 16

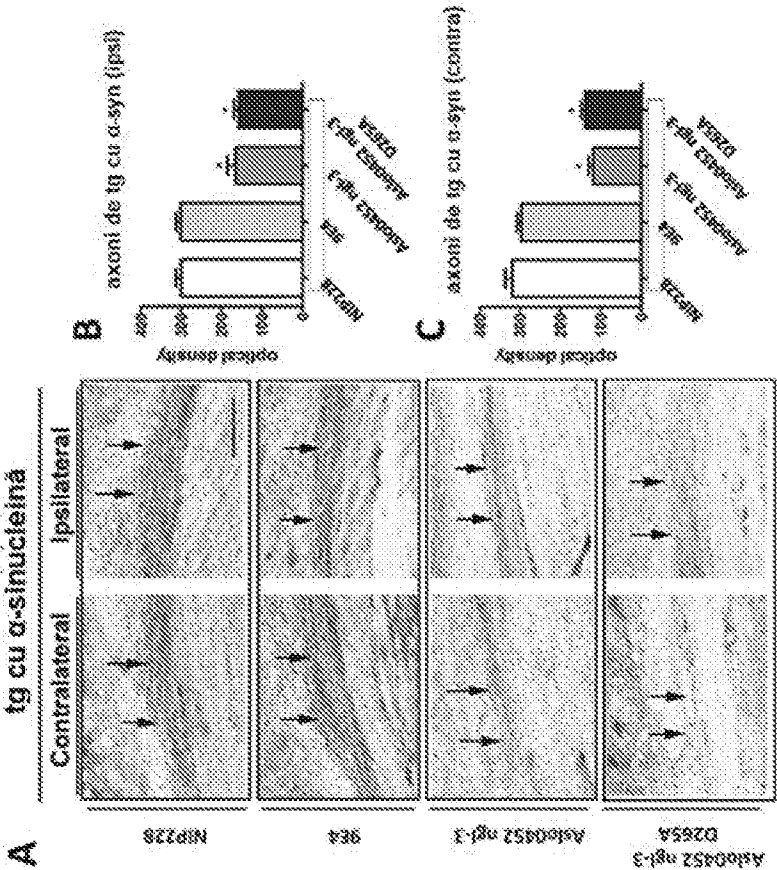


Figura 17

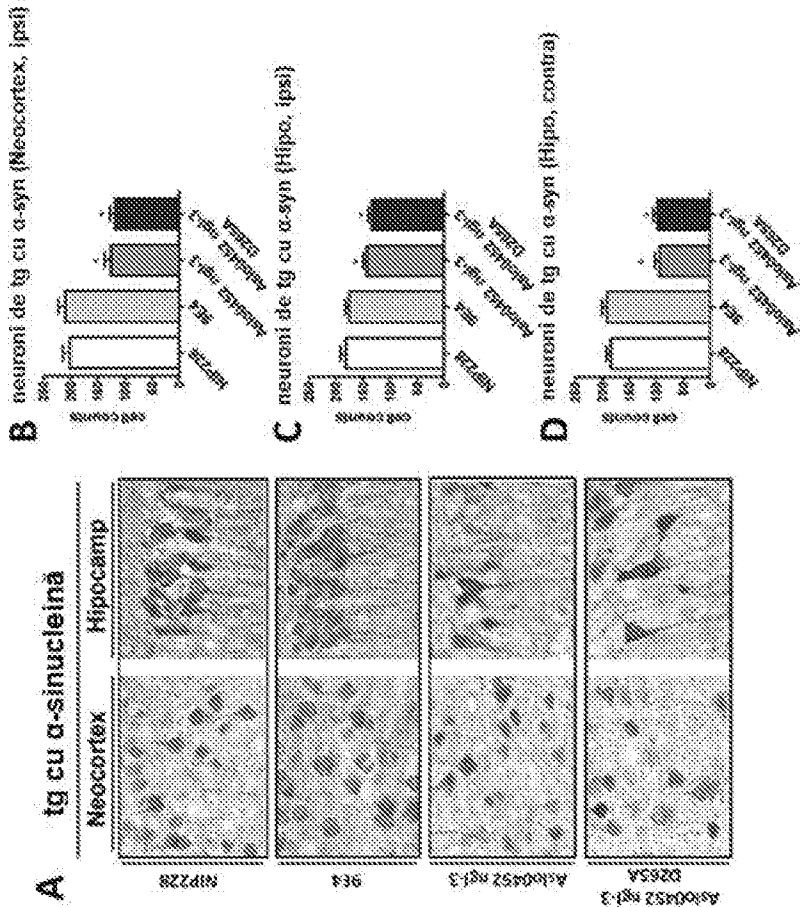


Figura 19

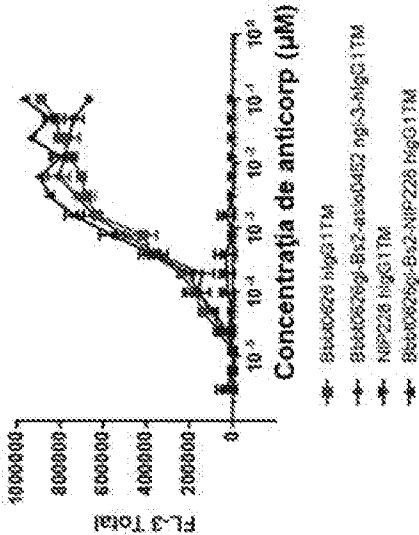
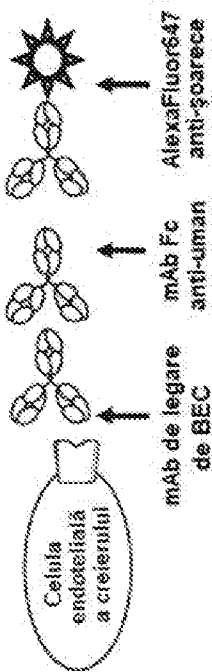


Figura 18

