



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **125136**

(13) **C2**

(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2018 00574	(72) Винахідник(и):	Білманн Рьонн Ларс Крістіан (DK), Малік Ібрагім Джон (DK), Ставенхаген Джеффри Бі. (DK), Крістенсен Сьорен (DK), Егебьєрг Ян (DK), Геррітсен Арно (NL), ван ден Брінк Едвард (NL), Паррен Пол (NL), де Йонг Роб (NL)
(22) Дата подання заявки:	12.07.2016	(73) Володілець (володільці):	Х. ЛУННБЕК А/С, Ottiliavej 9, 2500 Valby, Denmark (DK)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	20.01.2022	(74) Представник:	Кістерський Кирило Арсенійович, реєстр. №207
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	1512215.3	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	DE MUYNCK LOUIS ET AL, "The neurotrophic properties of progranulin depend on the granulin E domain but do not require sortilin binding", NEUROBIOLOGY OF AGING, (20130524), vol. 34, no. 11, doi:10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2013.04.022, ISSN 0197-4580, pages 2541 - 2547, XP028691739 Bd Transduction Laboratories, "Purified Mouse Anti- Neurotensin Receptor 3 Product Information - Technical Data Sheet", (20080101), pages 1-2, URL: http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/612100.pdf, (20160922), XP055304695 W. C. LEE ET AL, "Targeted manipulation of the sortilin-progranulin axis rescues progranulin haploinsufficiency", HUMAN MOLECULAR GENETICS, (20131026), vol. 23, no. 6, doi:10.1093/hmg/ddt534, ISSN 0964-6906, pages 1467-1478, XP055193340
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	13.07.2015		
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	GB		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.07.2018, Бюл.№ 13		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	19.01.2022, Бюл.№ 3		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2016/066516, 12.07.2016		

(54) АНТИТІЛА, ЯКІ ЗВ'ЯЗУЮТЬСЯ З СОРТИЛІНОМ І ПРИГНІЧУЮТЬ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ПРОГРАНУЛІНУ

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіл, здатних специфічно зв'язуватися з сортиліном і пригнічувати або знижувати зв'язування PGRN з сортиліном, та їх застосування при лікуванні лобно-скроневої деменції (FTD), бічного аміотрофічного склерозу (ALS) або протеїнопатії TDP43.

UA 125136 C2

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Цей винахід відноситься до моноклональних антитіл до сортиліну, застосовних в корекції дефіцитного рівня програнуліну (PGRN). Зокрема, ці антитіла можна застосовувати при лікуванні лобно-скроневої деменції (FTD) і бічного аміотрофічного склерозу (ALS). Крім того, передбачається, що моноклональні антитіла також можуть бути застосовні для лікування нейродегенеративних порушень, таких як хвороба Альцгеймера (AD).

Посилання на перелік послідовностей

Ця заявка містить один або декілька переліків послідовностей згідно з параграфами 1.821 і наступними розділу 37 CFR, які розкриті на машинопрочитуваних носіях (назва файлу: 0993 ST25.txt, створений 22 червня 2016 року і має розмір 144 кБ), при цьому даний файл включений в даний опис шляхом посилання у його повному обсязі.

Рівень техніки

Сортилін є рецептором, який, як повідомлялося, опосередковує проапоптичні ефекти пронеїротрофінів і опосередковує транспорт і сортування нейротрофінових рецепторів (Nykjaer et al, 2012, Trends Neurosci. 2012;35(4):261-70; Glerup et al, Handb Exp Pharmacol, 2014;220:165-89, Carlo et al, J Mol Med (Berl). 2014 Sep;92(9):905-11). Був ідентифікований ряд лігандів сортиліну, включаючи нейротензин, розташування високоафінного сайту зв'язування якого, як було визначено за допомогою рентгенівської кристалографії, знаходиться в молекулі сортиліну в порожнині бета-пропелера (Quistgaard et al, Nat Struct Mol Biol. 2009 Jan; 16(1):96-8; Quistgaard et al, Protein Sci. 2014, Sep;23(9):1291-300). Зовсім недавно було показано, що сортилін функціонує як високоафінний рецептор для фактора зростання програнуліну (PGRN, Hu et al. Neuron. 2010 Nov 18;68(4):654-67).

PGRN (проепітелін, попередник грануліну-епітеліну, фактор росту, що походить від клітин РС, акрогранін) є глікозилованим білком, що секретується, з протизапальними діями і діями, подібними до нейротропічних (для недавнього огляду див. Nguyen, Trends Endocrinol Metab. 2013 Dec;24(12):597-606). PGRN розщеплюється протеолітичним шляхом до гранулінів, проте багато що ще належить дізнатися про фізіологічну роль PGRN і гранулінів і ідентичності їх рецепторів. PGRN був залучений в декілька клітинних функцій, включаючи регуляцію клітинного циклу і рухову активність клітин (He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 57:600-612 (2003); Monami, G., et al., Cancer Res. 5(5):7103-7110 (2006)), загоєння ран, запалення (Zhu, J., et al., Cell 777:867-878 (2002)), індукцію синтезу факторів росту, таких як ендотеліальний фактор росту судин (VEGF) (Tangkeangsittsin, W. & Serrero, G, Carcinogenesis 25:1587-1592 (2004)), і онкогенез (He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 81:600-612 (2003), Monami, G., et al., Cancer Res 5(5):7103-7110 (2006); Serrero, G., Biochem Biophys. Res. Commun. 505:409-413 (2003), Lu, R & Serrero, G., Proc. Natl Acad Sci U.S.A 98 142-147 (2001); Liau, L M., et al., Cancer Res. 60:1353-1360 (2000)). Повідомлялося, що PGRN зв'язується з рецептором TNF (Tang W et al., Science 2011, 332(6028):478-84), проте інші автори ставлять під сумнів це спостереження (Chen et al., J Neurosci. 2013, 33(21):9202-9213).

Зв'язування PGRN з сортиліном було картовано в сайті нейротензину, і повідомлялося, що воно опосередковується виключно за рахунок С-кінцевого домену PGRN (Zheng et al. PLoS One. 2011; 6(6):e21023; Lee et al. Hum Mol Genet. 2013) подібним до нейротензину чином, і, відповідно, було показано, що нейротензин блокує взаємодію сортиліну з PGRN і іншими лігандами. Після зв'язування сортилін опосередковує виведення PGRN лізосомами і за рахунок цього регулює рівні позаклітинного PGRN (Hu et al. 2010). Таким чином, було показано, що нокдаун або надекспресія сортиліну регулює рівні позаклітинного PGRN в культурі клітин (Carrasquillo et al. Am J Hum Genet. 2010 Dec 10;87(6):890-7) і у мишей, при цьому повідомлялося, що дефіцит сортиліну підвищує рівні PGRN і відновлює рівні PGRN в плазмі крові і головному мозку у PGRN+/- мишей (Hu et al. 2010). Цікаво відзначити, що одонуклеотидний поліморфізм (SNP) в гені сортиліну був асоційований із зниженими рівнями PGRN в плазмі крові і підвищеними рівнями мПНК сортиліну (Carrasquillo et al. Am J Hum Genet. 2010 Dec 10; 87(6):890-7). Ці спостереження дають підставу припустити, що сортилін є ключовим регулятором позаклітинного PGRN.

Був знайдений зв'язок PGRN з лобно-скроневою деменцією (FTD), прогресуючою формою деменції, що характеризується змінами в поведінці і здатності розуміння значення слів, а також лобно-скроневою лобарною дегенерацією (FTLD) і наявністю включень в нейронах, що містять включення TAR-ДНК-зв'язувального білка 43 (TDP-43) або тау-білка (Baker et al, 2006, Nature. 2006 Aug 24;442(7105):916-9; Cruts et al, Nature 442: 920-924 (2006); Am J Hum Genet. 2010 Dec 10;87(6):890-7, M et al, Trends in Genetics 24: 186-194 (2008)). В більшості випадків спорадичної і спадкової форми FTD спостерігається патологія TDP-43 (~50 %), подібна тій, що зустрічається при ALS, і деякі автори вважають, що FTD-TDP43 і ALS є захворюваннями одного спектру (Ito D

Neurology. 2011 Oct 25; 77(17):1636-43; Boxer AL et al, *Alzheimers Dement.* 2013 Mar; 9(2):176-88; Rademakers et al, *Nat Rev Neurol.* 2012 August; 8(8): 423-434) внаслідок однакових патологічних процесів і генетичних факторів, а також деякого збігу в симптоматиці. Для FTD не існує ніяких варіантів симптом-модифікувальної терапії. У деякої частини страждаючих лобно-скронцевою деменцією пацієнтів з патологією TDP-43 спостерігаються мутації в гені грануліну (GRN), що забезпечують втрату функції, що приводить до гаплонедостатності PGRN. На сьогоднішній день 69 різних мутацій в гені грануліну, всі з яких приводять до знижених рівнів PGRN і/або функції, були асоційовані з FTD, і вважають, що підвищення рівня позаклітинного PGRN в плазмі крові і головному мозку протидіятиме хворобливому процесу.

Також був знайдений зв'язок мутацій PGRN з хворобою Альцгеймера (AD) (Sheng et al., 2014, *Gene.* 2014 Jun 1; 542(2):141-5; Brouwers et al., 2008, *Neurology.* 2008 Aug 26; 71(9):656-64), що дає підставу припустити, що дефіцит PGRN може грати важливу роль в патогенезі AD. Крім того, в мишачих моделях AD були відмічені нейропротекторні ефекти PGRN (Minami et al, 2014, *Nat Med.* 2014 Oct; 20(10):1157-64), які підкріплюють думку, що підвищені рівні PGRN можуть бути корисними при AD і, ймовірно, інших нейродегенеративних станах.

У цій заявці описано отримання і ідентифікацію антитіл до сортиліну людини, які можуть регулювати PGRN в клітинних моделях і на мишах. Такі антитіла, несподівано, зв'язуються з ділянкою в сортиліні, яка віддалена від сайту зв'язування програнуліну, про який раніше повідомлялося, так званого сайту нейротензину, і при цьому здатні пригнічувати взаємодію сортилін-PGRN і за рахунок цього підвищувати рівень позаклітинного PGRN.

Автори цього винаходу визначили шість ділянок зв'язування сортиліну і несподівано ідентифікували, що найбільш ефективні антитіла зв'язують певну ділянку ("ділянку D"). Оскільки PGRN має нейропротекторний і протизапальний ефекти, то отримані авторами цього винаходу результати указують, що такі націлені на сортилін антитіла, ймовірно, матимуть корисний ефект при лікуванні ряду нейродегенеративних порушень, зокрема FTD/FTLD. У деякої частини даних пацієнтів є мутація в гені, що кодує PGRN, яка приводить до гаплонедостатності. Отже, антитіла до сортиліну, ймовірно, матимуть подібні терапевтичні переваги для пацієнтів, страждаючих іншими протеїнопатіями TDP-43 і захворюваннями, при яких рівні PGRN можуть впливати на функцію TDP43 і патологію, включаючи ALS і AD.

Суть винаходу

Автори цього винаходу отримали моноклональні антитіла, які здатні пригнічувати зв'язування PGRN з сортиліном і які несподівано зв'язуються з новою ділянкою сортиліну, яку назвали "ділянкою D", визначеною в SEQ ID NO:170. Декілька антитіл, ідентифікованих авторами цього винаходу, характеризуються властивостями, подібними властивостям антитіл до ділянки D, і експериментальні дані указують, що їх зв'язування також відбувається в ділянці D, і такі антитіла в даному описі називаються як антитіла до D+. Відповідно, в одному аспекті цей винахід відноситься до таких антитіл, до композицій і/або наборів, що містять такі антитіла, а також до пов'язаних з ними способів і шляхів застосування.

Цей винахід також відноситься до способу попередження або лікування захворювання, що асоціюється із зниженими рівнями PGRN в головному мозку пацієнта, який включає введення ефективною дози антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, які зв'язуються з ділянкою D сортиліну. Такі захворювання включають серед інших FTD, ALS і протеїнопатії TDP43, як, наприклад, AD.

Стислий опис ілюстративних матеріалів

На фігурі 1 представлений загальний огляд, що стосується співвіднесення ділянок антитіл людини на підставі зв'язування ділянки сортиліну, ефекту щодо зв'язування PGRN і рівнів PGRN і щодо перехресного блокування між антитілами.

Антитіла, що зв'язують сортилін, відбирали і співвідносили з ділянками A-E на підставі зв'язування з конструктами, отриманими перетасовуванням, в яких послідовність відповідала послідовності сортиліну голкочеревних в межах вибраних ділянок білка (приклад 1, фігура 2).

Відібрали 20 антитіл, які пригнічували зв'язування сортилін-PGRN (що вимірювали за допомогою аналізу HTRF) (див. приклад 10, фігуру 5 і фігуру 6). З цих антитіл 15 були антитілами до ділянки D, тоді як 3 були антитілами до D+ (фігура 6). Подальший аналіз перехресного блокування підтвердив, що 18 антитіл до ділянки D і D+ (антитіла до D+ характеризувалися іншим профілем зв'язування з конструктами, отриманими перетасовуванням, в порівнянні з антитілами до ділянки D; проте, антитіла до D+ не можуть бути з точністю віднесені до ділянок зв'язування A-E, як викладено вище, проте вони мають загальні функціональні характеристики (у клітинних аналізах і т. д.), подібні характеристикам антитіл до ділянки D), при цьому усі, перехресно блокували один одного, підтверджуючи те, що вони взаємодіяли з однією і тією ж ділянкою сортиліну (приклад 9, фігура 7). При тестуванні

антитіл до сортиліну із класів відповідності іншим ділянкам в аналізі HTRF по зв'язуванню сортиліну-PGRN тільки два з 41 антитіла демонстрували пригнічувальний ефект. Одне з цих двох антитіл перехресно блокувало D і D+, але воно характеризувалося нетиповим профілем зв'язування з конструктором, отриманим перетасовуванням (подібно D, за винятком того, що воно зв'язувало ділянку hB01-05), тоді як інше антитіло перехресно не блокувало інші антитіла, які пригнічують зв'язування PGRN-сортилін, підтверджуючи таким чином твердження, що воно зв'язується з іншою ділянкою сортиліну.

Ці спостереження показують, що антитіла, що зв'язуються з ділянкою в сортиліні, визначеною як ділянка D, мають потенціал пригнічувати зв'язування сортилін-PGRN.

19 перехресно блокуючих антитіл, з яких 18 були антитілами до ділянки D і D+, підвищували рівень позаклітинного PGRN в клітинному аналізі (приклад 13, фігура 10 і фігура 11). Три з цих антитіл тестували *in vivo* і виявили, що вони підвищують рівень PGRN в плазмі крові (фігура 13, приклад 15).

Блоки на фігурі 1 ілюструють стадії відбору антитіл. A-E означають ділянки, до яких відносили відповідні антитіла, що зв'язують сортилін, на основі конструктів, отриманих перетасовуванням, як описано в прикладі 1 і SEQ ID NO:171-179. "Інше" відноситься до антитіла, яке не можна співвіднести ні з однією ділянкою і яке може зв'язуватися в межах граничної поверхні між ділянками A і B. Tet відноситься до антитіл, що зв'язують також сортилін голкочеревних.

На додаток до показаних антитіл людини отримували і характеризували так само певну кількість антитіл миші до сортиліну людини. Два з цих антитіл відносили до ділянки D, і було показано, що їх перехресно блокують антитіла людини до ділянки D і D+, що вони пригнічують зв'язування сортилін-PGRN і підвищують рівень позаклітинного PGRN (див. фігуру 4).

На фігурі 2 показано співвіднесення антитіл з ділянками на підставі зв'язування з конструкторами сортиліну, отриманими перетасовуванням.

На панелі A показана ілюстрація в лінійному вигляді конструктів, отриманих перетасовуванням, вживаних для співвіднесення антитіл з ділянками, як описано в прикладі 1. Конструкти сортиліну, отримані перетасовуванням, отримували на основі послідовності сортиліну людини (SEQ ID NO:169) (відрізки показані сірим кольором), в якій амінокислотні залишки замінювали на відповідну амінокислоту із послідовності сортиліну голкочеревних (показана чорним кольором) (SEQ ID NO:173) (прикладі 1-3).

На панелі B показана передбачена структура конструктів, отриманих перетасовуванням, проілюстрованих в лінійному вигляді на панелі A. Залишки темного кольору указують на залишки, змінені на відповідні послідовності голкочеревних в конструкторах, отриманих перетасовуванням.

На панелі C проілюстрований профіль зв'язування антитіл, віднесених до класів відповідності ділянці D і ділянці E, відповідно. Знак "+" указує на зв'язування з вказаним конструктором, отриманим перетасовуванням, а знак "-" указує на відсутність зв'язування. На підставі профілю зв'язування з різними конструкторами, отриманими перетасовуванням, антитіла співвідносили з ділянками. Класи відповідності ділянкам отриманих антитіл позначені A-E. Що стосується проілюстрованих антитіл до ділянок D і E, то обидва зв'язували людські послідовності (повністю сірі), на що указує "+", і жодне не зв'язувало послідовність голкочеревних (повністю чорні), на що указує "-", тоді як антитіло до ділянки E зв'язувало конструкт hB45678, отриманий перетасовуванням, при цьому антитіло до ділянки D не зв'язувало її в результаті локалізації ділянки зв'язування, як проілюстровано на панелі A. Що стосується антитіл до ділянки D, спостерігали зв'язування з наступними ділянками, отриманими перетасовуванням: hsort, hB06-10, B12390. Антитіла не зв'язувалися з hB01-05, B45678, tet. Що стосується антитіл до D+, спостерігали зв'язування з наступними ділянками, отриманими перетасовуванням: hsort, B12390. Антитіла не зв'язувалися з hB01-05, hB06-10, B45678, tet. Профіль зв'язування F був подібним до профілю зв'язування D, за винятком того, що для антитіл до D+ не спостерігали зв'язування з hB06-10.

Антитіла не зв'язувалися з повним білком сортиліну голкочеревних, за винятком двох. Два антитіла, здатні зв'язуватися з послідовністю голкочеревних, позначено як "tet". "Інше" відноситься до антитіла, яке не можна співвіднести ні з однією ділянкою.

На фігурі 3 показані показники афінності зв'язування для антитіл людини до ділянки D і D+. Показники афінності зв'язування з конструкторами сортиліну, отриманими перетасовуванням, отримані за допомогою інтерферометрії біошару із застосуванням Octet 384RED, як описано в прикладі 8 (EC50, нг/мл). Відсутність затінювання указує на значення EC50, що становить 0,1-10 нг/мл, затінювання світло-сірим кольором указує на значення EC50, що становить >10 нг/мл, і затінювання сірим кольором указує на відсутність зв'язування (NB). Співвіднесення з ділянками,

засноване на профілях зв'язування, проілюстровано на фігурі 2. Конструкти, отримані перетасовуванням, проілюстровані на фігурі 2, і послідовності наведені в SEQ ID NO:171-179. mAb = моноклональне антитіло.

На фігурі 4 показані показники афінності зв'язування антитіл миші до сортиліну людини з конструктами, отриманими перетасовуванням, отримані за допомогою інтерферометрії біошару із застосуванням Octet 384RED, як описано в прикладі 8 (EC₅₀, нг/мл). Відсутність затінювання указує на зв'язування, а затінювання сірим кольором указує на відсутність зв'язування (NB). Співвіднесення з ділянками, засноване на профілях зв'язування, проілюстровано на фігурі 2.

На фігурі 5 показаний ефект антитіла до сортиліну щодо зв'язування сортиліну з PGRN. Моноклональне антитіло 45 людини (humAb) до ділянки D сортиліну (зафарбовані кола) запобігало зв'язуванню PGRN з сортиліном на відміну від контрольного антитіла до ділянки E сортиліну (зафарбовані трикутники) і контролю IgG, IgG1-b12 (незафарбовані трикутники), які не перешкоджали зв'язуванню. Зв'язування антитіл визначали шляхом вимірювання зсуву зв'язування PGRN з сортиліном за допомогою гомогенної флуоресценції з розрізненням за часом (HTRF) (приклад 10). Оцінку залежності доза-відповідь для антитіл виконували при десяти концентраціях, що охоплюють діапазон від 50 пМ до 1 мкМ, за кривими, побудованими при 3-кратному розведенні. Значення концентрації напівмаксимального пригнічення (IC₅₀) розраховували за допомогою нелінійної регресії з використанням сигмоїдальної кривої концентрація-відповідь (із змінною крутизною) в XLfit 4 (IDBS, Великобританія).

На фігурі 6 стисло представлені результати ефекту антитіл щодо зв'язування сортилін-PGRN, визначені за допомогою аналізу методом гомогенної флуоресценції з розрізненням за часом (HTRF), як показано на фігурі 5. В цілому тестували 62 антитіла - при цьому було виявлено, що 15 антитіл до ділянки D і 3 антитіла до ділянки D+ пригнічують зв'язування сортилін-PGRN, а також визначали значення IC₅₀. Для двох додаткових антитіл (до E і інших ділянок) спостерігали пригнічувальний ефект. Решта антитіл показала негативний результат в тесті. * ефект антитіла був дуже слабким для підбирання кривої залежності доза-відповідь, 6 % пригнічення при 1 мкМ. ** ефект контрольного (контр.) антитіла був дуже слабким для підбирання кривої залежності доза-відповідь, 37 % пригнічення при 1 мкМ.

Ці спостереження показують, що антитіла до сортиліну, що охарактеризовані їх віднесенням до ділянки D або D+, пригнічують безпосереднє зв'язування сортиліну з PGRN і здатні пригнічувати зв'язування сортилін-PGRN.

На фігурі 7 показано перехресне блокування між антитілами. Всі з антитіл людини і антитіл миші тестували в одному експерименті, в якому кожне антитіло зв'язувалося з сортиліном людини дикого типу (WT) (фігура 7). Потім всі інші антитіла тестували щодо зв'язування із попередньо утвореним комплексом сортилін:антитіло (приклад 9). Усі з вибраних 15 антитіл людини до ділянки D і 3 антитіл людини до ділянки D+ (на підставі їх ефекту в аналізі HTRF, що проводиться щодо PGRN-сортилін (фігура 5 і фігура 6) і двох антитіл миші до ділянки D пригнічували один одного щодо зв'язування з сортиліном людини WT.

Антитіла перехресно не блокувалися антитілами, віднесеними до класів відповідності іншим ділянкам (як проілюстровано для антитіл, що розпізнають ділянку A, ділянку E і сортилін голкочеревних, вказаних в таблиці як AbA1-x, AbE1-x і Abtet, відповідно), за винятком одного перехресно блокуючого антитіла до ділянки A, одне антитіло з невідомим співвіднесенням з ділянкою ("інше"), і при цьому їх частково блокувало антитіло 548 до D+. Ці дані підтверджують, що всі антитіла до ділянки D і D+, здатні пригнічувати зв'язування сортилін-PGRN в аналізі HTRF, взаємодіяли з однією і тією ж ділянкою сортиліну.

Перехресне блокування між антитілами до однієї і тієї ж або різних ділянок сортиліну (ділянки, визначені на підставі зв'язування з конструктами, отриманими перетасовуванням, як проілюстровано на фігурі 2) визначали шляхом аналізу перешкоджання зв'язуванню антитіла-сортиліну. Зв'язування антитіл з сортиліном-ECD-His визначали за допомогою інтерферометрії біошару із застосуванням Octet 384RED (приклад 9). У лівому стовпці вказані первинні (імобілізовані) антитіла, а у верхньому рядку вказані вторинні антитіла (антитіла, що випробовуються стосовно імобілізованих антитіл). Зв'язування як первинних, так і вторинних антитіл з сортиліном-ECD-His приводить до значення відповіді більше 0,1 і вказуватиме, що обидва антитіла зв'язалися з різними ділянками білка. Значення відгуку менше 0,1 показує відсутність зв'язування вторинного антитіла і ефективне перехресне блокування імобілізованим (первинним) антитілом, що свідчить про те, що обидва антитіла зв'язуються з однією і тією ж ділянкою сортиліну.

На фігурі 8 показаний ефект антитіл до ділянки D і D+ сортиліну щодо зв'язування з сортиліном селективного ліганду AF38469, що є малою молекулою. Було показано, що сайт зв'язування AF38469 аналогічний сайту зв'язування нейротензину, і його характеризували за

допомогою рентгенівської кристалографії (Schröder et al. Bioorg Med Chem Lett. 2014 Jan 1;24(1):177-80). Повідомлялося, що PGRN зв'язується з одним і тим же сайтом (Lee et al. Hum Mol Genet. 2013), що й антитіла 45 і 68, які зв'язуються з ділянкою D і D+, відповідно, не пригнічуючи зв'язування AF38469 з сортиліном. Ці дані свідчать про те, що ці антитіла мають сайт зв'язування сортиліну, відмінний від сайту зв'язування AF38469. Отже, антитіла 45 і 68 пригнічують зв'язування PGRN-сортилін за рахунок сайту зв'язування, відмінного від передбачуваного раніше сайту зв'язування PGRN в сортиліні.

Фігура 9. Ефект антитіл 45 і 68 щодо клітинного зв'язування і ендоцитозу PGRN (приклад 12). Антитіла 45 і 68 пригнічували зв'язування і/або ендоцитоз PGRN клітинами, що надекспресують сортилін. Додавання нейротензину (NT, 10 мкМ) так само знижувало зв'язування або ендоцитоз PGRN, що відображалось в зниженій інтенсивності флуоресценції, при цьому, як і очікувалося, ізотипічне контрольне антитіло B12 не впливало на рівні флуоресценції PGRN.

Антитіла (100 нМ), які слід тестувати, додавали до клітин S18 за 30 хвилин перед додаванням рекомбінантного PGRN на 4 години. Потім клітини фіксували, забарвлювали для виявлення PGRN і аналізували за допомогою Cellomics. Флуоресценцію PGRN вимірювали у вигляді середньої флуоресценції в розрахунок на одну клітину. Дані представлені у вигляді середнього значення $\pm$ SD. Дані аналізували за допомогою однофакторного Anova з подальшим аналізом з використанням критерію Даннета, при цьому всі групи порівнювали з PGRN. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Фігура 10. Рівні позаклітинного PGRN, визначені за допомогою ELISA в середовищах від культур клітин HEK (S18), що надекспресують сортилін. Антитіла до ділянки D (45, 811) і D+ (68) сортиліну підвищували рівні PGRN і подібний ефект спостерігали для ліганду сортиліну нейротензину, тоді як контрольне антитіло B12 не надавало ефекту. Ці спостереження указують на те, що антитіла до ділянки D і D+ сортиліну були здатні пригнічувати опосередковане сортиліном виведення PGRN, підвищуючи за рахунок цього рівень позаклітинного PGRN. Всі антитіла тестували при концентрації 100 нМ. Нейротензин тестували при концентрації 10 мкМ. Рівні PGRN нормалізували щодо контролю (CTRL). Дані представлені у вигляді середнього значення $\pm$ SD. Дані аналізували за допомогою однофакторного Anova з подальшим аналізом з використанням критерію Даннета, при цьому всі групи порівнювали з контролем * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (приклад 13).

На фігурі 11 показаний ефект антитіл щодо рівня позаклітинного PGRN в клітинах HEK людини, що надекспресують сортилін, вимірюваного за допомогою ELISA, як описано в прикладі 13. Всі відібрані антитіла до ділянки D і три відібрані антитіла до D+ підвищували рівень позаклітинного PGRN. Рівні PGRN аналізували так само, як вказано вище. Рівні PGRN нормалізували щодо необроблених контролів і переводили в %. Два антитіла до сортиліну людини отримували від миші (1F2F4 і 5E1F6), а решта були антитілами людини. Ab = моноклональне антитіло.

На фігурі 12 (верхня і нижня панелі) показаний ефект антитіла до сортиліну щодо рівня позаклітинного PGRN в диференційованих з клітин iPSC нейронах (приклад 14). Антитіло 45 до ділянки D сортиліну і антитіло 68 до D+ підвищували рівні PGRN, тоді як контрольні антитіла B12 і антитіло до HEL не надавали ефекту.

Диференційовані з клітин iPSC нейрони висівали в 96-лунковий планшет. Через один тиждень до клітин додавали антитіла. Середовище від клітин збирали через 48 годин або 96 годин і аналізували за допомогою ELISA для PGRN людини (Enzo Life sciences), і при цьому зразки аналізували згідно з інструкціями виробника. Антитіла людини до сортиліну 45 і 68 підвищували рівні PGRN в середовищах, зібраних в обидва моменти часу. Контрольні ізотипічні антитіла B12 і антитіло до Hel (негативний контроль) не змінювали рівень позаклітинного PGRN. Дані представлені у вигляді середнього значення $\pm$ SD. Дані аналізували за допомогою однофакторного Anova з подальшим аналізом з використанням критерію Даннета * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (приклад 14).

На фігурі 13 (панелі A-C) показані рівні PGRN в плазмі крові у мишей з нокіном (KI), за рахунок якого у них експресується сортилін людини, оброблених антитілом до сортиліну людини (приклад 15). Антитіло до сортиліну 45 підвищувало рівні PGRN в плазмі крові, тоді як контрольне антитіло не надавало ефекту.

А. Дослідження в динаміці. Після введення шляхом ін'єкції антитіла 45 (антитіла до ділянки D) спостерігали підвищені рівні PGRN в плазмі крові. Мишам вводили sc шляхом ін'єкції антитіло 45 (n=5) або контрольне антитіло (n=3) в дозі 10 мг/кг. Кожну групу виводили з експерименту в різні моменти часу. У мишей, оброблених контрольними антитілами (антитілами до Hel), не спостерігали зміни щодо рівня PGRN в плазмі крові, тоді як у мишей, оброблених

антитілом 45, спостерігали поступове підвищення рівнів PGRN. Ефект досягав свого піку в проміжку від 24 до 48 годин і поступово знижувався до днів 4-7.

В. Дослідження середньої тривалості. Мишей обробляли двічі на тиждень за допомогою 10 мг/кг антитіла 45 і контрольного антитіла (антитіла до Hel). Зразки збирали з щічної вени кожного тижня. Рівень PGRN в плазмі крові був підвищений на 1-му тижні і залишався приблизно на тому ж рівні впродовж всього дослідження в порівнянні з тваринами, обробленими контрольним антитілом (n=20).

С. Дослідження залежності доза-відповідь. Різні дози (4 дози: 0,1, 0,4, 2 і 10 мг/кг) антитіла до сортиліну (45) і контрольних антитіл (антитіл до Hel) вводили шляхом ін'єкції і мишей убивали на 2-й день. Рівень PGRN в плазмі крові був підвищений у мишей, оброблених антитілом 45 (10 і 2 мг/кг), при цьому нижчі дози (0,4 і 0,1 мг/кг) не надавали ефекту щодо рівня PGRN в плазмі крові. Дані представлені у вигляді середнього значення $\pm$ SD. Дані аналізували за допомогою двофакторного Анова з подальшим аналізом з використанням критерію Бонферроні * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (приклад 15).

На фігурі 14 представлена ілюстрація ділянок сортиліну, визначених на основі конструктів сортиліну, отриманих перетасовуванням, накладених на передбачену структуру сортиліну. Ділянки є частиною сегментів білка сортиліну, в яких зміна вибраних амінокислотних залишків з людської послідовності на характерні для послідовності голкочеревних приводить до пригнічення зв'язування з антитілами класу відповідності такій ділянці. Стрілкою показаний високоафінний сайт зв'язування нейротензину і PGRN, про який раніше повідомлялося (Quistgaard Nat Struct Mol Biol. 2009 Jan;16(1):96-8, Lee et al, Hum Mol Genet. 2013).

На фігурах 15a (панелі 1-6) і 15b (панелі 1-3) показані ілюстративні пептиди, що охоплюють конформаційний епітоп антитіла 45, 68 і 811. Всі з показаних пептидів характеризуються ступенем захисту від обміну більш 0,5D, за винятком пептиду 115-125. Пептид 115-125 є прикладом пептиду, на який не впливає наявність антитіла 45, 68 або 811, і тому вони не є частиною конформаційного епітопу зв'язування (приклад 16).

На фігурах 16a (панелі 1-6) і 16b (панелі 1-3) показані ілюстративні пептиди, що охоплюють конформаційний епітоп антитіла 30. Всі з показаних пептидів характеризуються ступенем захисту від обміну більш 0,5D, за винятком пептиду 563-572, пептиду 646-656 і пептиду 704-714. Ці три пептиди є прикладами пептидів, на які не впливає наявність антитіла 30, і тому вони не є частиною, що відповідає за конформаційне зв'язування (приклад 16).

На фігурі 17 показана ілюстрація процедури мікродіалізу.

На фігурі 18a показана динаміка щодо ефекту системного введення антитіла 45 або PBS (50 мг/кг, 10 мл/кг, s.c.) за 24 години до проведення мікродіалітичних експериментів щодо рівнів PRGN в гіпокампі мишей hSORT1, що вільно рухаються, за часом (24 години) (приклад 17).

На фігурі 18b показані об'єднані результати 24 годин діалізу: початковий рівень PRGN в гіпокампі мишей hSORT1, що вільно рухаються, у мишей, оброблених mab№45 і PBS в дозі 3,3 $\pm$ 0,3 нг/мл і 1,1 $\pm$ 0,1 нг/мл, відповідно, оцінені за допомогою двотактного мікродіалізу (приклад 17).

На фігурі 18c представлена таблиця, що демонструє рівні PRGN (середні значення $\pm$ SEM) в гіпокампі мишей hSORT1, що вільно рухаються, які вимірювали кожні 2 години протягом 24 годин через 1 день після обробки тварин за допомогою mab№45 (n=10) або PBS (n=8) (приклад 17).

Докладний опис винаходу

Використовуваний в даному описі винаходу термін "сортилін" є синонімом "білка сортиліну" (ідентифікованого, наприклад, в UniProt як Q99523, 1 і 2). Нумерація амінокислот сортиліну наведена відносно SEQ ID NO:169, показаною нижче, при цьому Met є амінокислотою 1:

MERPWGAADG LSRWPHGLGL LLLLQLPPS TLSQDRLDAP PPPAAPLPRW
SGPIGVSWGL RAAAAGGAFP RGGRWRRSAP GEDEECGRVR DFVAKLANNT
HGHVFDLRLG SVLSWVGDS TGVLVLTTF HVPLVIMTFG QSKLYRSEDY
GKNFKDITDL INNTFIRTEF GMAIGPENSG KVVLTAEVSG GSRGGRIFRS
SDFAKNFVQT DLPFHPLTQM MYSPQNSDYL LALSTENGLW VSKNFGGKWE
EIHKAVCLAK WGSNTIFFT TYANGSCKAD LGALELWRTS DLGKSFKTIG
VKIYSFGLGG RFLFASVMAD KDTTRRIHVS TDQGDTSMA QLPSVGQEQQF
YSILAANDDM VFMHVDEPGD TGFGTIFTSD DRGIVYSKSL DRHLYTTTGG
ETDFTNVTSL RGVYITSVLS EDNSIQTMIT FDQGGRWTHL RKPENSECDA
TAKNKNECSL HIHASYSISQ KLVNPMAPLS EPNAVGVIA HGSVGDAISV
MVPDVYISDD GGYSWTKMLE GPHYTYTILDS GGIIVAIHES SRPINVIKFS
TDEGQCWQTY TFRDPIYFT GLASEPGARS MNISIWGFTE SFLTQWVSY
TIDFKDILER NCEEKDYTIW LAHSTDPEDY EDGCILGYKE QFLRLRKSSV

CQNGRDYVVT KQPSICLCSL EDFLCDFGY Y RPENDSKC VE QPELKGHDL E
 FCLYGREEHL TTNGYRKIPG DKCQGGVNPV REVKDLKKKC TSNFLSPEKQ
 NSKSNSVPII LAIVGLMLVT VVAGVLIVKK YVCGGRFLVH RYSVLQQHAE
 ANGVDGVDAL DTASHTNKSG YHDDSDEDLLE.

5 Під використанням в даному описі терміном "ділянка D" мається на увазі ділянка сортиліну (відповідна залишкам 523-610 в SEQ ID NO:169), що складається з амінокислот за SEQ ID NO:170, як показано нижче:

HYTILDSGG IIVAIHSSR PINVIKFTD EGQCWQTYTF TRDPIYFTGL
 ASEPGRSMN ISIWGFTESE LTSQWVSYTI DFKDILER.

10 Що стосується антитіл до ділянки D, спостерігали зв'язування з наступними ділянками, отриманими перетасовуванням: hsort, hB06-10, B12390. Антитіла не зв'язувалися з hB01-05, B45678, tet. Що стосується антитіл до D+, спостерігали зв'язування з наступними ділянками, отриманими перетасовуванням: hsort, B12390. Антитіла не зв'язувалися з hB01-05, hB06-10, B45678, tet. Для антитіл, названих "D+", спостерігали подібний профіль зв'язування як у антитіл до ділянки "D", за винятком того, що для антитіл до D+ не спостерігали зв'язування з hB06-10.
 15 Не дивлячись на різний профіль зв'язування з конструктами, отриманими перетасовуванням, антитіла до D+ мали спільні з антитілами до ділянки D функціональні характеристики (у клітинних аналізах і т. д.).

Певні антитіла, що зв'язують D і D+, зокрема, зв'язують ділянку, визначену в SEQ ID NO:185, 20 186 або 187. Таким чином, цей винахід відноситься в певних варіантах здійснення до антитіл або їх антигензв'язувальних фрагментів, які зв'язуються з послідовністю ділянки D за SEQ ID 170 і послідовностями за SEQ ID NO:185, 186 або 187 в межах цієї ділянки. За рахунок зв'язування ці антитіла або антигензв'язувальні фрагменти впливають на рівні PGRN, і тому їх можна застосовувати для лікування захворювань, що асоціюються з PGRN, таких як FTD, ALS і AD.
 25 AD.

Шляхом додаткового аналізу зв'язування антитіл до D і D+ за цим винаходом було ідентифіковано часткове зв'язування деяких з антитіл з суміжною ділянкою (ділянкою A). Ця ділянка відповідає амінокислотам 78-254 з SEQ ID NO:169, як показано в SEQ ID NO:180 і нижче:

30 SAPGEDEECG RVRDFVAKLA NNTQHVFDD LRGSVSLSWV GDSTGVILVL
 TTFHVPLVIM TFGQSKLYRS EDYGKNFKDI TDLINNTFIR TFGMAIGPE
 NSGKVVLTAE VSGGSRGGRI FRSSDFAKNF VQTDLPFHPL TQMMYSPQNS
 DYLLALSTEN GLWVSKNFGG KWEEIHK.

Ця ділянка була названа "ділянкою A".

35 Таким чином, в певних варіантах здійснення цей винахід відноситься до антитіл або їх антигензв'язувальних фрагментів, які зв'язують ділянку D, визначену вище і в SEQ ID NO: 170, 185, 186 або 187, і додатково мають афінність до ділянки A, ідентифікованої в SEQ ID NO: 180. В межах ділянки A певні антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти мають афінність до амінокислот ділянки A, ідентифікованих в SEQ ID NO: 181, 182, 183 або 184.

40 PGRN (проепітелін, попередник грануліну-епітеліну, фактор росту, що походить від клітин РС, акрогранін) кодує глікопротеїн, що секретується, розміром 68,5 кДа, який містить 7,5 повторів мотивів грануліну меншого розміру, що знаходяться в діапазоні 6-25 кДа, які можуть бути відщеплені ферментативним шляхом від попередника PGRN (He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 81:600-6 × 2 (2003)). У відмінних від нейронів клітинах PGRN був асоційований з рядом явищ, як, наприклад, регуляцією клітинного циклу і рухливостю клітин (He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 57:600-612 (2003); Monami, G., et al, Cancer Res. (5(5:7103-7110 (2006)), загоєнням ран, запаленням (Zhu, J., et al, Cell 777:867-878 (2002)), індукуванням синтезу факторів росту, таких як ендотеліальний фактор росту судин (VEGF) (Tangkeangsittsin, W. & Serrero, G, Carcinogenesis 25:1587-1592 (2004)), і онкогенезом (He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 81:600-612 (2003), Monami, G., et al., Cancer Res (5(5:7103-7110 (2006); Serrero, G., Biochem Biophys. Res. Commun. 505:409-413 (2003), Lu, R & Serrero, G., Proc. Natl Acad Sci U.S.A 98 142-147 (2001); Liao, L M., et al., Cancer Res. 60:1353-1360 (2000)).

Мутації PGRN приводять до гаплонедостатності (Baker, M., et al, Nature 442:916-919 (2006); Cruts, M., et al, Nature 442:920-924 (2006)) і, як відомо, мають місце в близько 50 % випадків спадкової форми FTD, що робить мутацію PGRN головним генетичним фактором, відповідальним за розвиток FTD (Cruts, M. & Van Broeckhoven, C, Trends Genet. 24:186-194 (2008); Le Ber, I., et al, Brain 129:3051-3065 (2006)). Гетерозиготний характер мутацій PGRN, що забезпечують втрату функції, означає те, що у здорових індивідуумів експресія PGRN грає важливу роль з дозозалежним характером в забезпеченні захисту здорових індивідуумів від розвитку FTD.
 60 розвитку FTD.

Термін "антитіло" (Ab) в контексті цього винаходу відноситься до молекули імуноглобуліну або, відповідно до деяких варіантів здійснення цього винаходу, фрагменту молекули імуноглобуліну, що має здатність специфічно зв'язуватися з епітопом молекули ("антигену"). Антитіла, що зустрічаються в природі, зазвичай являють собою тетрамер, який зазвичай складається щонайменше з двох важких (H) ланцюгів і щонайменше з двох легких (L) ланцюгів. Кожен важкий ланцюг складається з варіабельного домену важкого ланцюга (скорочено позначеного в даному описі винаходу як VH) і константного домену важкого ланцюга, що зазвичай складається з трьох доменів (CH1, CH2 і CH3). Важкі ланцюги можуть відноситися до будь-якого ізотипу, включаючи IgG (підтипи IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4), IgA (підтипи IgA1 і IgA2), IgM і IgE. Кожен легкий ланцюг складається з варіабельного домену легкого ланцюга (скорочено позначеного в даному описі як VL) і константного домену легкого ланцюга (CL). Легкі ланцюги включають каппа-ланцюги і лямбда-ланцюги. Варіабельний домен важкого і легкого ланцюгів зазвичай відповідає за розпізнавання антигену, тоді як константний домен важкого і легкого ланцюгів може опосередковувати зв'язування імуноглобуліну з тканинами або факторами хазяїна, зокрема з різними клітинами імунної системи (наприклад, ефекторними клітинами) і першим компонентом (C1q) класичної системи комплементу. VH- і VL-домени можна додатково підрозділити на ділянки гіперваріабельності, що називаються "ділянками, що визначають комплементарність (гіперваріабельні ділянки)", які чергуються з доменами з більш консервативною послідовністю, що називаються "каркасними ділянками" (FR). Кожен VH і VL складається з трьох CDR-доменів і чотирьох FR-доменів, розташованих від аміно-кінця до карбокси-кінця в наступному порядку: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Варіабельні домени важкого і легкого ланцюгів містять зв'язувальний домен, який взаємодіє з антигеном. На особливу увагу заслуговують антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти, які були "виділені" так, щоб вони існували у фізичному середовищі, відмінному від середовища, в якому вони можуть зустрічатися в природі, або які були модифіковані так, щоб вони відрізнялися за амінокислотною послідовністю від антитіла, що зустрічається в природі.

Термін "епітоп" означає антигенну детермінанту, здатну специфічно зв'язуватися з антитілом. Епітопи зазвичай складаються з поверхневих груп молекул, таких як амінокислоти або бічні ланцюги цукрів, і зазвичай мають специфічні характеристики тривимірної структури, а також специфічні характеристики заряду. Конформаційні і лінійні епітопи відрізняються тим, що зв'язування з першими, але не з останніми, завжди втрачається у присутності денатуруючих розчинників. Епітоп може містити амінокислотні залишки, що безпосередньо беруть участь в зв'язуванні, і інші амінокислотні залишки, які безпосередньо не беруть участь в зв'язуванні, такі як амінокислотні залишки, які ефективно блокуються пептидом, що специфічно зв'язується з антигеном (іншими словами, амінокислотний залишок знаходиться в межах ділянки розпізнавання пептиду, що специфічно зв'язується з антигеном).

Використовуваний в даному описі винаходу термін "антигензв'язувальний фрагмент антитіла" означає фрагмент, частину, ділянку або домен антитіла (незалежно від того, як він отриманий (наприклад, за допомогою розщеплювання, рекомбінантним шляхом, за допомогою синтезу і т. д.)), який може зв'язуватися з епітопом, і, таким чином, термін "антигензв'язувальний" означає те ж саме, що і "епітопзв'язувальний", так що, наприклад, термін "антигензв'язувальний фрагмент антитіла" призначений позначати те ж, що і "епітопзв'язувальний фрагмент антитіла". Антигензв'язувальний фрагмент може містити 1, 2, 3, 4, 5 або усі 6 CDR-доменів такого антитіла і, не дивлячись на те, що він здатний зв'язуватися з таким епітопом, він може проявляти специфічність, афінність або селективність відносно такого епітопу, який відрізняється від епітопу такого антитіла. Переважно, проте, щоб антигензв'язувальний фрагмент містив усі 6 CDR-доменів такого антитіла. Антигензв'язувальний фрагмент антитіла може бути частиною одного поліпептидного ланцюга (наприклад, scFv), або містити його, або може представляти собою частину двох або більше поліпептидних ланцюгів, або містити їх, причому кожний з них має амінокінець і карбоксильний кінець (наприклад, діатіло, Fab-фрагмент, Fab₂-фрагмент і т. д.). Фрагменти антитіл, які проявляють антигензв'язувальну здатність, можна отримати, наприклад, шляхом розщеплювання інтактних антитіл протеазами. Переважніше, щоб, не дивлячись на те, що два домени Fv-фрагмента, VL і VH, в природних умовах кодуються окремими генами або полінуклеотидами, які кодують такі послідовності генів (наприклад, їх кодуючою кДНК), можна було з'єднати за допомогою рекомбінантних способів гнучким лінкером, який забезпечує можливість їх отримання у вигляді одного білкового ланцюга, в якому VL- і VH-ділянки асоціюються з утворенням одновалентних антигензв'язувальних молекул (відомих як одноланцюгові Fv (scFv), див., наприклад, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 і Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883). Як альтернатива, шляхом використання

гнучкого лінкера, який є дуже коротким (наприклад, має довжину менш ніж приблизно 9 залишків) для того, щоб забезпечити можливість асоціації VL- і VH-доменів одного поліпептидного ланцюга один з одним, можна утворити біспецифічне антитіло, діатіло або аналогічну молекулу (у якій два такі поліпептидні ланцюги асоціюються один з одним з утворенням двовалентної антигензв'язувальної молекули) (див., наприклад, PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993) відносно опису діатілу). Приклади антигензв'язувальних фрагментів, що охоплюються цим винаходом, включають (i) Fab'- або Fab-фрагмент - одновалентний фрагмент, що складається з VL-, VH-, CL- і CH1-доменів, або одновалентне антитіло, описане в WO2007059782; (ii) F(ab')₂-фрагменти - двовалентні фрагменти, що містять два Fab-фрагменти, сполучені дисульфідним містком в шарнірному домені; (iii) Fd-фрагмент, що по суті складається з VH- і CH1-доменів; (iv) Fv-фрагмент, що по суті складається з VL- і VH-доменів, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), який по суті складається з VH-домену і також називається доменними антитілами (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11): 484-90); (vi) антитіла верблющої або нанотіла (Revels et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5_1(I): 11-24) і (vii) виділену ділянку, що визначає комплементарність (CDR). Крім того, не дивлячись на те, що два домени Fv-фрагмента, VL і VH, кодується окремими генами, вони можуть бути з'єднані за допомогою рекомбінантних способів з синтетичним лінкером, який забезпечує можливість їх отримання у вигляді одного білкового ланцюга, в якому VL- і VH-домени знаходяться в парі з утворенням одновалентних молекул (відомих як одноланцюгові антитіла або одноланцюгові Fv (scFv), див., наприклад, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) і Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Ці і інші фрагменти антитіл, застосовні в контексті цього винаходу, додатково обговорюються в даному описі винаходу. Також слід розуміти, що термін "антитіло", якщо не вказане інше, також включає антитілоподібні поліпептиди, такі як химерні антитіла і гуманізовані антитіла, і фрагменти антитіл, що зберігають здатність зв'язуватися з антигеном (антигензв'язувальні фрагменти), отримувані за допомогою будь-якої відомої методики, такої як ферментативне розщеплювання, синтез пептидів і рекомбінантні методики. Отримане антитіло може мати будь-який ізотип. Як використовується в даному описі винаходу, "ізотип" відноситься до класу імуноглобуліну (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4), що кодується генами константних доменів важких ланцюгів. Такі фрагменти антитіл отримують за допомогою традиційних методик, відомих фахівцям в даній галузі техніки; при цьому відповідні фрагменти, здатні зв'язуватися з бажаним епітопом, можна без зусиль піддати скринінгу стосовно корисності таким же чином, як і інтактне антитіло.

Термін "біспецифічне антитіло" відноситься до антитіла, що містить два незалежні антигензв'язувальні фрагменти, кожен з яких націлений на незалежні мішені. Ці мішені можуть бути епітопами, присутніми в різних білках, або різними епітопами, присутніми в одній і тій же мішені. Молекули біспецифічних антитіл можна отримати за допомогою компенсаторних амінокислотних змін в константних доменах HC початкових молекул моноспецифічних двовалентних антитіл. Отримане в результаті гетеродимерне антитіло містить один Fab, внесок в утворення якого вносять два різні початкові моноспецифічні антитіла. Амінокислотні зміни в Fc-домені приводять до підвищеної стабільності гетеродимерного антитіла з біспецифічністю, яка стабільна за часом. (Ridgway et al., Protein Engineering 9, 617-621 (1996), Gunasekaran et al., JBC 285, 19637-1(2010), Moore et al., MAbs 3:6 546-557 (2011), Strop et al., JMB 420, 204-219 (2012), Metz et al., Protein Engineering 25:10 571-580 (2012), Labrijn et al., PNAS 110:113, 5145-5150 (2013), Spreter Von Kreudenstein et al., MAbs 5:5 646-654 (2013)). Біспецифічні антитіла також можуть включати молекули, які отримані за допомогою злиття ScFv. Потім два моноспецифічні scfv незалежно з'єднують з Fc-доменами, які можуть утворювати стабільні гетеродимери, з отриманням однієї біспецифічної молекули (Mabry et al., PEDS 23:3 115-127 (2010)). Біспецифічні молекули мають здатність до подвійного зв'язування.

"Антитіло проти сортиліну" або "антитіло до сортиліну" (використовувані в даному описі винаходу взаємозамінним чином залежно від контексту, в якому вони написані) являють собою антитіло, його антигензв'язувальний фрагмент, які специфічно зв'язуються з сортиліном, і особливо з ділянкою D сортиліну, SEQ ID NO:170. Антитіло до сортиліну, яке зв'язується з ділянкою D сортиліну, зазвичай зв'язуватиметься з конформаційним епітопом або лінійним епітопом з 3, 4, 5, 6 або 7 послідовних амінокислот, розташованих в межах ділянки D (наприклад, SEQ ID NO:185, 186 або 187), з афінністю (IC₅₀), що становить 22 нМ або менше, як, наприклад, від 22 нМ до 1 нМ, від 10 нМ до 1 нМ або від 5 нМ до 1 нМ. Відповідно до деяких варіантів здійснення антитіла до сортиліну можуть також зв'язуватися з ділянкою A (SEQ ID NO:180, 181, 182, 183 або 184), проте слід підкреслити, що їх основна біологічна функція, як вважають, досягається за рахунок зв'язування з ділянкою D.

Ідентифікований сайт зв'язування є досить унікальним, як показано на прикладі зв'язування

селективного ліганду AF38469, що є малою молекулою, з сортиліном. Було показано, що сайт зв'язування AF38469 аналогічний сайту зв'язування нейротензину, і його характеризували за допомогою рентгенівської кристалографії (Schroder et al. Bioorg Med Chem Lett. 2014 Jan 1;24(1):177-80). Повідомлялося, що PGRN зв'язується з тим же сайтом (Lee et al. Hum Mol Genet. 2013). Антитіла 45 і 68, що зв'язуються з ділянкою D і D+, відповідно, не пригнічували зв'язування AF38469 з сортиліном. Ці дані свідчать про те, що ці антитіла мають сайт зв'язування сортиліну, відмінний від сайту зв'язування AF38469 і нейротензину. Отже, в певних варіантах здійснення цей винахід відноситься до антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, здатних специфічно зв'язуватися з сортиліном і пригнічувати зв'язування PGRN з сортиліном, але при цьому їх зв'язування не пригнічує або не пригнічує в значній мірі зв'язування нейротензину або AF38469 з сортиліном. Це може бути показано за допомогою, наприклад, зсуву зв'язування з сортиліном із застосуванням сцинтиляційного аналізу зближення (SPA) (приклад 11). Один із способів пояснення цього результату може полягати в тому, що антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти зв'язуються з поверхневими ділянками сортиліну, тоді як малі молекули, такі як нейротензин, зв'язуються усередині зв'язуючої кишені.

Використовуваний в даному описі винаходу термін "антитіло людини" (який може бути скорочений до "humAb" або "HuMab") призначений включати антитіла, що мають варіабельні і константні домени, отримані з послідовностей імуноглобуліну зародкової лінії людини. Антитіла людини за цим винаходом можуть включати амінокислотні залишки, що не кодуються послідовностями імуноглобуліну зародкової лінії людини (наприклад, мутації, введені за допомогою випадкового або сайт-специфічного мутагенезу *in vitro*, або під час перебудови гена, або за допомогою соматичної мутації *in vivo*).

Використовувані в даному описі терміни "моноклональне антитіло" або "композиція на основі моноклональних антитіл" відносяться до препарату з молекул антитіл єдиного молекулярного складу. Традиційна композиція на основі моноклональних антитіл характеризується єдиною специфічністю зв'язування і афінністю до конкретного епітопу. У певних варіантах здійснення моноклональне антитіло може складатися із понад одного Fab-домени, за рахунок чого підвищується специфічність більш ніж до однієї мішені. Терміни "моноклональне антитіло" або "композиція на основі моноклональних антитіл" не призначені для обмеження будь-яким конкретним способом отримання (наприклад, рекомбінантним, трансгенним, гібридомним і т. д.).

Антитіла за цим винаходом і їх антигензв'язувальні фрагменти, що зв'язують сортилін, переважно будуть людськими або, наприклад, мишачими антитілами (позначені як 1F2, 5E1), зокрема "гуманізованими" у разі використання в терапевтичних цілях. Термін "гуманізований" відноситься до молекули, що отримується, як правило, з використанням рекомбінантних методик, яка має антигензв'язувальний сайт, отриманий з імуноглобуліну від виду, відмінного від людини, і решту структури імуноглобуліну, в основі якої лежить структура і/або послідовність імуноглобуліну людини. Антигензв'язувальний сайт може містити або повні варіабельні домени антитіла, відмінного від людського, злиті з людськими константними доменами, або тільки гіперваріабельні ділянки (CDR) таких варіабельних доменів, прищені до відповідних людських каркасних ділянок варіабельних доменів людини. Залишки каркасних ділянок таких гуманізованих молекул можуть бути дикого типу (наприклад, повністю людськими), або вони можуть бути модифіковані так, щоб містити одну або декілька амінокислотних замін, які не зустрічаються в антитілі людини, послідовність якого послужила основою для гуманізації. Гуманізація зменшує або усуває вірогідність того, що константний домен молекули виступатиме в ролі імуногена у людей, але зберігається можливість імунної відповіді на чужорідний варіабельний домен (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). Інший підхід фокусується не тільки на отриманні константних доменів людського походження, але також і на модифікації варіабельних доменів, з тим щоб реконструювати їх якомога ближче до людської форми. Відомо, що варіабельні домени як важкого, так і легкого ланцюгів містять по три гіперваріабельні ділянки (CDR), які розрізняються за відповіддю на дані антигени і визначають здатність до зв'язування, фланковані чотирма каркасними ділянками (FR), які є відносно консервативними у даного виду і які імовірно виконують роль остову для CDR. Якщо відмінні від людських антитіла отримують до певного антигену, варіабельні домени можна "реконструювати" або "гуманізувати" шляхом щеплення CDR, отриманих з антитіла, відмінного від людського, до FR, присутніх в антитілі людини, що підлягає модифікації. Про застосування такого підходу до різних антитіл повідомлялося в Sato, K. et al. (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity",

Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation", Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity", Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991)
 5 "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo", Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992)
 10 "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; i Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen", J. Immunol. 148:1149-1154. У деяких варіантах здійснення гуманізованих антитіл зберігають всі послідовності CDR (наприклад, гуманізоване антитіло миші, яке містить усі шість CDR антитіл миші). У інших варіантах здійснення гуманізованих антитіл містять одну або декілька CDR (одну, дві, три, чотири, п'ять, шість), які змінені відносно початкового антитіла і які також називаються однією або декількома CDR, "отриманими з" одного або декількох CDR початкового антитіла. Можливість гуманізації антигену добре відома (див., наприклад, патенти США №№ 5225539, 5530101, 5585089, 5859205, 6407213, 6881557).

Термін "антитіло "XX" призначений позначати антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент (наприклад, антитіло "5E1"), що містять легкий ланцюг, варіабельний домен легкого ланцюга або CDR1-3 варіабельного домену легкого ланцюга, визначені за їх відповідними SEQ ID NO, і важкий ланцюг, варіабельний домен важкого ланцюга або CDR1-3 варіабельного домену важкого ланцюга, визначені за їх відповідними SEQ ID NO, або що складаються з них. У певних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент визначені їх повним варіабельним доменом важкого ланцюга, визначеним за його SEQ ID NO, і їх варіабельним доменом легкого ланцюга, визначеним за його SEQ ID NO, що містяться в них.

Нумерація амінокислотних залишків в цій ділянці відповідає IMGT®, міжнародній інформаційній системі ImMunoGeneTics® або Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesmann, K. S. & Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е видання, U.S. Department of Health and Human Services, публікація NIH № 91-3242; Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987). Canonical structures For The Hypervariable domains Of Immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196, 901-917.

Як використовується в даному описі винаходу, говорять, що антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент "специфічно" зв'язуються з ділянкою іншої молекули (тобто епітопом), якщо вони реагують або асоціюють з цим епітопом частіше, швидше, з більшою тривалістю і/або з більшою афінністю або авідністю в порівнянні з альтернативними епітопами. У одному варіанті здійснення антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за цим винаходом зв'язуються щонайменше в 10 разів сильніше зі своєю мішенню (сортиліном), ніж з іншою молекулою; переважно щонайменше в 50 разів сильніше і переважніше щонайменше в 100 разів сильніше. Переважно, антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент зв'язуються у фізіологічних умовах, наприклад, in vivo. Таким чином, під "специфічним зв'язуванням з сортиліном" мається на увазі здатність антитіла або його антигензв'язувального фрагмента зв'язуватися з сортиліном з такою специфічністю і/або в таких умовах. Способи, відповідні для визначення такого зв'язування, будуть відомі фахівцям в даній галузі техніки, і ілюстративні способи описані в прикладах, що додаються. Використовуваний в даному описі винаходу термін "зв'язування" в контексті зв'язування антитіла із попередньо визначеним антигеном зазвичай відноситься до зв'язування з афінністю, відповідною KD, що становить приблизно 10^{-7} М або менше, як, наприклад, приблизно 10^{-8} М або менше, як, наприклад, приблизно 10^{-9} М або менше, при визначенні за допомогою, наприклад, технології поверхневого плазмонного резонансу (SPR) на приладі BIAcore® 3000 або T200 із застосуванням антигену як ліганду і антитіла як аналізованої речовини, і до зв'язування із попередньо визначеним антигеном з афінністю, відповідною KD, щонайменше вдесятеро нижчою, як, наприклад, щонайменше в 100 разів нижчою, наприклад, щонайменше в 1000 разів нижчою, як, наприклад, щонайменше в 10000 разів нижчою, наприклад, щонайменше в 100000 разів нижчою, ніж його афінність при зв'язуванні з неспецифічним антигеном (наприклад, BSA, казеїном), відмінним від попередньо визначеного антигену, або близькоспорідненим антигеном. Ступінь, на яку афінність є нижчою, залежить від KD антитіла, так що якщо KD антитіла є дуже низькою (тобто антитіло є високоспецифічним), то ступінь, на яку афінність до антигену є нижчою, ніж афінність до неспецифічного антигену, може бути щонайменше 10000-кратною. Зокрема, цей винахід відноситься до антитіл до сортиліну, які проявляють афінність зв'язування, що становить 22 нМ або менше, як, наприклад, від 22 нМ до 1 нМ, від 10 нМ до 1 нМ або від 5 нМ до 1 нМ, при

визначенні, наприклад, за допомогою інтерферометрії біошару із застосуванням Octet 384RED (приклад 8).

У певних варіантах здійснення цього винаходу цей винахід відноситься до антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, здатних конкурувати з humAb антитілом 45 або humAb антитілом 68 за зв'язування з сортиліном. У іншому варіанті здійснення цей винахід відноситься до антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, які здатні конкурувати з антитілом 45 за зв'язування з ділянкою D сортиліну, визначеною в SEQ ID NO:170. Таке конкурентне пригнічення зв'язування можна визначити за допомогою аналізів і способів, добре відомих з рівня техніки, наприклад, із застосуванням чипів BIAcore® з іммобілізованим сортиліном людини і інкубації з еталонним антитілом (таким як антитіло "45" або "68") з поліпептидом антитіла, що підлягає тестуванню, або без нього. Як альтернативу можна застосовувати підхід попарного картування, при якому еталонне антитіло (таке як антитіло "45" або "68") іммобілізують на поверхні чипа BIAcore®, при цьому антиген сортиліну людини зв'язується з іммобілізованим антитілом, а потім друге антитіло тестують щодо здатності одночасного зв'язування з людським сортиліном (див. "Керівництво з аналізу BIAcore®", GE Healthcare Life Sciences, 29-0194-00 AA 05/2012; розкриття якого включено в даний опис шляхом посилання).

Використовуваний в даному описі винаходу термін "kd" (с-1 або 1/с) відноситься до константи швидкості дисоціації для конкретної взаємодії антитіла і антигену. Вказане значення також називають значенням koff.

Використовуваний в даному описі винаходу термін "ka" (M-1 x c-1 або 1/M·с) відноситься до константи швидкості асоціації для конкретної взаємодії антитіла і антигену.

Використовуваний в даному описі винаходу термін "KD" (M) відноситься до рівноважної константи дисоціації для конкретної взаємодії антитіла і антигену, отримуваної шляхом ділення kd на ka.

Використовуваний в даному описі винаходу термін "KA" (M-1 або 1/M) відноситься до рівноважної константи асоціації для конкретної взаємодії антитіла і антигену, отримуваної шляхом ділення ka на kd.

У одному варіанті здійснення цей винахід відноситься до антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, які проявляють одне або декілька з наступних властивостей:

афінність зв'язування (K_D) з сортиліном, що становить 0,5-10 нМ, як, наприклад, 1-5 нМ або 1-2 нМ;

здатність знижувати і/або пригнічувати зв'язування PGRN з сортиліном;

здатність знижувати і/або пригнічувати виведення PGRN клітинами, експресуючими сортилін;

здатність знижувати і/або пригнічувати ендоцитоз PGRN клітинами, експресуючими сортилін;

здатність підвищувати кількість і/або концентрацію PGRN в плазмі крові у мишей з нокіном, за рахунок якого у них експресується сортилін людини.

Під терміном "здатність знижувати і/або пригнічувати зв'язування PGRN з сортиліном" мається на увазі антитіло, яке має здатність пригнічувати зв'язування з PGRN при значенні IC50, що становить менше 50 нМ, але переважно від 10 нМ до 0,2 нМ, яке визначають за допомогою флуоресцентного аналізу з розрізненням за часом (HTFR), розкритого в прикладі 10.

Під терміном "здатність знижувати і/або пригнічувати виведення PGRN клітинами, експресуючими сортилін" мається на увазі здатність підвищувати концентрацію PGRN в середовищі щонайменше на 25 %, як, наприклад, від 25 % до 500 %, від 25 % до 400 % або від 25 % до 200 %, що вимірюють за допомогою аналізу ELISA, як розкрито в прикладі 13.

Під "здатністю знижувати і/або пригнічувати ендоцитоз PGRN клітинами, експресуючими сортилін" мається на увазі здатність знижувати внутріклітинну концентрацію PGRN щонайменше на 10 %, але переважно від 20 до 100 %, що вимірюють за допомогою аналізу, заснованого на cellomics, як розкрито в прикладі 12.

Під "здатністю підвищувати кількість і/або концентрацію PGRN в плазмі крові у мишей з нокіном, за рахунок якого у них експресується сортилін людини" мається на увазі здатність підвищувати концентрацію PGRN в плазмі крові щонайменше на 25 %, але переважно від 50 до 500 відсотків, що вимірюють за допомогою аналізу ELISA, як розкрито в прикладі 15.

Передбачається, що здатність підвищувати рівень PGRN в головному мозку можна також аналізувати, наприклад, за допомогою мікродіалізу. Таким чином, під "здатністю підвищувати кількість і/або концентрацію PGRN в головному мозку" мається на увазі здатність підвищувати концентрацію PGRN в головному мозку щонайменше на 25 %, але переважно від 50 до 500 відсотків, що вимірюють за допомогою мікродіалізу.

У деяких антитілах для збереження зв'язування в гуманізованому антитілі необхідна лише

частина CDR, а саме підмножина залишків CDR, необхідних для зв'язування, що називаються SDR. Залишки CDR, що не контактують з відповідним епітопом і не містяться в SDR, можна ідентифікувати на підставі попередніх досліджень (наприклад, залишки H60-H65 в CDR H2 часто не є необхідними), із ділянок CDR за Kabat, розташованих зовні гіперваріабельних петель за Chothia (див. Kabat et al. (1992) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, публікація № 91-3242; Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins", *J. Mol. Biol.* 196:901-917), за допомогою молекулярного моделювання, і/або емпіричним шляхом, або як описано в Gonzales, N.R. et al. (2004) "SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity", *Mol. Immunol.* 41:863-872. У таких гуманізованих антитілах в положеннях, в яких відсутні один або декілька залишків донорної CDR або в яких відсутня вся донорна CDR, амінокислота, що займає положення, може бути амінокислотою, що займає відповідне положення (згідно з нумерацією за Kabat) в акцепторній послідовності антитіла. Кількість таких заміни акцепторних амінокислот на донорні в CDR, які потрібно включити, відображає баланс альтернативних думок. Такі заміни є потенційно переважними для зниження кількості амінокислот миші в гуманізованому антитілі і, отже, для зниження потенційної імуногенності. Проте, заміни також можуть викликати зміну афінності, а переважним є уникати значних зменшень афінності. Положення для заміни в межах CDR і амінокислоти, що підлягають заміні, також можна вибрати емпіричним шляхом.

Той факт, що зміна однієї амінокислоти в залишку CDR може привести до втрати функціонального зв'язування (Rudikoff, S. etc. (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79(6):1979-1983), забезпечує можливість систематичної ідентифікації альтернативних функціональних послідовностей CDR. У одному переважному способі отримання таких варіантів CDR полінуклеотид, що кодує CDR, піддають мутації (наприклад, шляхом випадкового мутагенезу або за допомогою сайт-спрямованого способу (наприклад, з ампліфікацією, опосередкованою полімеразною ланцюговою реакцією, з праймерами, які кодує мутантний локус)) з отриманням CDR, що має замінений амінокислотний залишок. Шляхом порівняння ідентичності початкової (функціональної) послідовності CDR за відповідним залишком з ідентичністю варіанта послідовності CDR із заміною (нефункціональної) для цієї заміни можна визначити вагу заміни згідно з BLOSUM62.iiij. У системі BLOSUM представлена матриця амінокислотних заміни, що створюється шляхом аналізу бази даних послідовностей відносно достовірних вирівнювань (Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?", *Nature Biotech.* 22(8):1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89:10915-10919; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective", *J. Mol. Biol.* 219, 555-565. В даний час найбільш досконалою базою даних BLOSUM є база даних BLOSUM62 (BLOSUM62.iiij). У таблиці 1 представлені значення ваги заміни згідно з BLOSUM62.iiij (чим більше вага, тим консервативнішою є заміна і, таким чином, тим ймовірніше, що заміна не впливатиме на функцію). Якщо, наприклад, антигензв'язувальний фрагмент, що містить отриману в результаті CDR, не може зв'язуватися з сортиліном, то вагу заміни згідно з BLOSUM62.iiij вважають недостатньо консервативною і вибирають і проводять нову кандидатну заміну, що має більшу вагу заміни. Так, наприклад, якщо початковим залишком був глутамат (E), а нефункціональним заміноючим залишком був гістидин (H), то вага заміни згідно з BLOSUM62.iiij дорівнюватиме 0, а консервативніші зміни (наприклад, аспартат, аспарагін, глутамін або лізин) є переважними.

Таблиця 1

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

Таким чином, цей винахід передбачає застосування випадкового мутагенезу для ідентифікації поліпшених CDR. У контексті цього винаходу консервативні заміни можуть бути визначені як заміни в межах класів амінокислот, відображених в одній або декількох з наступних трьох таблиць.

5

Класи амінокислотних залишків для консервативних замін

Таблиця 2

Кислі залишки	Asp (D) і Glu (E)
Основні залишки	Lys (K), Arg (R) і His (H)
Гідрофільні незаряджені залишки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) і Gln (Q)
Аліфатичні незаряджені залишки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) і Ile (I)
Неполярні незаряджені залишки	Cys (C), Met (M) і Pro (P)
Ароматичні залишки	Phe (F), Tyr (Y) і Trp (W)

Альтернативні класи амінокислотних залишків для консервативних замін

10

Таблиця 3

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

Альтернативні фізичні і функціональні класифікації амінокислотних залишків

Таблиця 4

Залишки, що містять спиртову групу	SiT
Аліфатичні залишки	I, L, ViM
Залишки, зв'язані з циклоалкенілом	F, H, WiY
Гідрофобні залишки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, WiY
Негативно заряджені залишки	DiE
Полярні залишки	C, D, E, H, K, N, Q, R, SiT
Позитивно заряджені залишки	H, KiR
Маленькі залишки	A, C, D, G, N, P, S, TiV
Дуже маленькі залишки	A, GiS
Залишки, що беруть участь в утворенні вигину	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, PiT
Гнучкі залишки	Q, T, K, S, G, P, D, EiR

Групи більш консервативних замінів включають валін-лейцин-ізолейцин, фенілаланін-тирозин, лізин-аргінін, аланін-валін і аспарагін-глутамін.

5 Додаткові групи амінокислот також можуть бути складені за допомогою принципів, описаних, наприклад, в Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Company.

10 Як альтернативу можна застосовувати технологію фагового дисплея для підвищення (або зниження) афінності CDR. Ця технологія, яка називається дозріванням афінності, передбачає використання мутагенезу або "прогулянки по CDR", а повторний відбір передбачає застосування цільового антигену або його антигенного антигензв'язувального фрагмента для ідентифікації антитіл, що мають CDR, які зв'язуються з вищою (або нижчою) афінністю з антигеном в порівнянні з первинним або початковим антитілом (див., наприклад, Glaser et al. (1992) *J. Immunology* 149:3903). Мутагенез цілих кодонів, а не окремих нуклеотидів, приводить до отримання напіввипадкового набору амінокислотних мутацій. Можна конструювати бібліотеки, що складаються з пулу варіантів клонів, кожен з яких відрізняється однією зміною амінокислоти в одній CDR і який містить варіанти, що представляють кожну можливу амінокислотну заміну для кожного залишку CDR. Мутанти з підвищеною (або зниженою) афінністю зв'язування з антигеном можна піддати скринінгу шляхом приведення в контакт іммобілізованих мутантів з міченим антигеном. Для ідентифікації антитіл мутантів з підвищеною або зниженою афінністю до антигену можна застосовувати будь-який відомий з рівня техніки спосіб скринінгу (наприклад, ELISA) (див. Wu et al. 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 95:6037; Yelton et al., 1995, *J. Immunology* 155:1994). Можливе застосування методики "прогулянки по CDR", за допомогою якої рандомізують легкий ланцюг (див. Schier et al., 1996, *J. Mol. Bio.* 263:551).

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

45 Таким чином, послідовність варіантів CDR охоплених антитілом або їх антигензв'язувальних фрагментів може відрізнятися від послідовності CDR початкового антитіла завдяки замінам; наприклад, замінені 4 амінокислотним залишком, 3 амінокислотним залишком, 2

амінокислотним залишкам або 1 амінокислотному залишку. Відповідно до одного варіанта здійснення цього винаходу додатково передбачається те, що амінокислоти в CDR-ділянках можуть бути замінені шляхом консервативних замінів, визначених в 3 таблицях нижче.

Термін "трансгенна тварина, відмінна від людини" відноситься до тварини, що відмінна від людини, що має геном, що містить один або декілька людських трансгенів або трансхромосом, що кодують важкий і/або легкий ланцюги (інтегрованих або не інтегрованих в природну геномну ДНК тварини), яка здатна експресувати повністю людські антитіла. Наприклад, трансгенна миша може мати трансген, що кодує людський легкий ланцюг, і або трансген, що кодує людський важкий ланцюг, або трансхромосому, що кодує людський важкий ланцюг, унаслідок чого у миші виробляється людське антитіло до сортиліну при імунізації сортилініним антигеном і/або клітинами, експресуючими сортилін. Трансген, що кодує людський важкий ланцюг, може бути інтегрований в хромосомну ДНК миші, як у випадку з трансгенними мишами, наприклад, мишами HuMAb, такими як миші HCo7 або HCo12, або трансген, що кодує людський важкий ланцюг, може зберігатися позахромосомно, як у випадку з трансхромосомними мишами KM, описаними в WO02/43478. Такі трансгенні і трансхромосомні миші (що в сукупності називаються в даному описі "трансгенними мишами") здатні виробляти декілька ізотипів моноклональних антитіл людини до даного антигену (таких як IgG, IgA, IgM, IgD і/або IgE), шляхом піддавання V-D-J-рекомбінації і перемиканню ізотипу.

Трансгенну тварину, відмінну від людини, також можна використовувати для отримання антитіл до специфічного антигену шляхом введення генів, що кодують таке специфічне антитіло, наприклад, шляхом формування функціонального зв'язку генів з геном, що експресується в молоці тварини.

Використовуваний в даному описі винаходу термін "лікування" або "здійснення лікування" означає полегшення, уповільнення, ослаблення або обернення розвитку або тяжкості захворювання або порушення або полегшення, уповільнення, ослаблення або усунення одного або декількох симптомів або побічних ефектів такого захворювання або порушення. Для цілей цього винаходу термін "лікування" або "здійснення лікування" додатково означає підхід для отримання сприятливих або бажаних клінічних результатів, де термін "сприятливі або бажані клінічні результати" включає без обмеження зменшення інтенсивності прояву симптому, зниження ступеня тяжкості порушення або захворювання, стабілізацію (тобто відсутність погіршення) стану захворювання або порушення, затримку або уповільнення прогресу стану захворювання або порушення, полегшення або пом'якшення стану захворювання або порушення і ремісію захворювання або порушення, або частково, або повністю, що піддається виявленню або не піддається виявленню.

Термін "ефективна кількість", вживаний відносно антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за цим винаходом, відноситься до кількості, яка при введенні в необхідних дозах і протягом необхідних періодів часу є достатньою для досягнення наміченого біологічного ефекту або бажаного терапевтичного результату, включаючи, без обмеження, досягнення клінічних результатів. Фраза "терапевтично ефективна кількість", вживана відносно антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за цим винаходом, призначена позначати кількість антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, яка є достатньою для полегшення, пом'якшення, стабілізації, обернення, уповільнення, ослаблення або затримки прогресу порушення або хворобливого стану або симптому порушення або захворювання. У одному варіанті здійснення спосіб за цим винаходом передбачає введення антитіла або його антигензв'язувального фрагмента в комбінаціях з іншими сполуками. У такому разі "ефективною кількістю" є кількість комбінації, достатня для того, щоб викликати намічений біологічний ефект.

Терапевтично ефективна кількість антитіла до сортиліну або його антигензв'язувального фрагмента за цим винаходом може мінятися залежно від таких чинників, як стан хвороби, вік, стать і вага індивідуума, а також здатність антитіла до сортиліну або його антигензв'язувального фрагмента викликати бажану відповідь у індивідуума. Терапевтично ефективна кількість також є кількістю, при якій терапевтично сприятливі ефекти перевершують будь-які токсичні або пагубні ефекти антитіла або частини антитіла.

Антитіла переважно являють собою людське або гуманізоване антитіло.

Нумерація амінокислотних залишків в цій ділянці відповідає IMGT®, міжнародній інформаційній системі ImMunoGeneTics® або Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesmann, K. S. & Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е видання, U.S. Department of Health and Human Services, публікація NIH № 91-3242; Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987). Canonical structures For The Hypervariable domains Of Immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196, 901-917.

Антитіло 002

Відповідно до іншого варіанта здійснення цей винахід відноситься до антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, що містять

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO:161;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO:162;
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO:163;
- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO:164;
- (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO:165; і
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO:166, або що складаються з них.

Переважно, моноклональне антитіло може містити варіабельний домен важкого ланцюга за SEQ ID NO:168 і варіабельний домен легкого ланцюга за SEQ ID NO:167 або складатися з них.

Відповідно до одного варіанта здійснення антитіла, згадані вище, можуть додатково містити варіант з не більше ніж 4 відмінностями в амінокислотах, або не більше ніж 3 відмінностями в амінокислотах, або не більше ніж 2 відмінностями в амінокислотах, або не більше ніж 1 відмінністю в амінокислотах в порівнянні з вказаними послідовностями CDR1, CDR2 і/або CDR3 (VH і/або VL).

Крім того, антитіла можуть бути представлені в композиції разом з фармацевтично прийнятним носієм. Антитіла за цим винаходом можна застосовувати в терапії. Зокрема, антитіла за цим винаходом можна застосовувати при лікуванні FTD, або ALS, або протеїнопатій TDP43, таких як хвороба Альцгеймера (AD).

Лікування, що передбачається цим винаходом, може бути довгостроковим, і пацієнт може отримувати лікування щонайменше протягом 2 тижнів, як, наприклад, протягом щонайменше 1 місяця, 6 місяців, 1 року або довше.

Антитіла за цим винаходом можуть представляти собою, наприклад, моноклональні антитіла, що отримуються за допомогою гібридомного способу, вперше описаного в Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), або можуть представляти собою моноклональні антитіла, що отримуються за допомогою рекомбінантних ДНК або інших способів. Моноклональні антитіла також можна виділяти з фагових бібліотек антитіл за допомогою методик, описаних, наприклад, в Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) і Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991). Моноклональні антитіла можна отримувати від будь-якого відповідного джерела. Так, наприклад, моноклональні антитіла можна отримати з гібридом, отриманих з В-лімфоцитів селезінки миші, отриманих від мишей, імунізованих антигеном, що представляє інтерес, або нуклеїновою кислотою, що кодує антиген, що представляє інтерес, наприклад, у вигляді клітин, що експресують антиген на поверхні. Моноклональні антитіла також можна отримувати з гібридом, отриманих з клітин, що експресують антитіла, від імунізованих людей або ссавців, відмінних від людини, таких як щури, кролі, собаки, вівці, кози, примати і т. д.

У одному варіанті здійснення антитіло за цим винаходом є антитілом людини. Моноклональні антитіла людини, спрямовані проти сортиліну, можна отримувати з використанням трансгенних або трансхромосомних мишей, що несуть частини імунної системи людини замість системи миші. Такі трансгенні і трансхромосомні миші включають мишей, що називаються в даному описі мишами HuMAb і мишами KM, відповідно.

Миша HuMAb містить мінілокус гена імуноглобуліну людини, який кодує нереаранжовані послідовності варіабельних і константних доменів важких ланцюгів (μ і γ) і варіабельних і константних доменів легких ланцюгів (κ) імуноглобуліну людини, разом з цільовими мутаціями, які інактивують ендегенні локуси, що кодують μ - і κ -ланцюги (Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)). Відповідно, ці миші характеризуються зниженою експресією IgM або IgK миші, і у відповідь на імунізацію введені трансгени людського важкого і легкого ланцюга піддаються перемикаючому класу і соматичній мутації, щоб утворювати високоафінні моноклональні антитіла IgG людини κ -ізо типу (Lonberg, N. et al. (1994), вище; огляд яких наведений в Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. том 13, 65-93 (1995) і Harding, F. and Lonberg, N., Ann. N. Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)). Отримання мишей HuMAb детально описано в Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993), Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Див. також US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5789650, US 5877397, US 5661016, US 5814318, US 5874299, US 5770429, US 5545807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 і WO 01/09187.

Миші HCo7, HCo12, HCo17 і HCo20 мають порушення JKD в своїх ендегенних генах легкого

ланцюга (каппа) (як описано в Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)), порушення CMD в своїх ендогенних генах важкого ланцюга (як описано в прикладі 1 публікації WO 01/14424) і трансген KCo5, що кодує людський легкий каппа-ланцюг (як описано в Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)). Додатково, миші HCo7 мають трансген HCo7, що кодує людський важкий ланцюг (як описано в US 5770429), миші HCo12 мають трансген HCo12, що кодує людський важкий ланцюг (як описано в прикладі 2 WO 01/14424), миші HCo17 мають трансген HCo17, що кодує людський важкий ланцюг (як описано в прикладі 2 WO 01/09187), а миші HCo20 мають трансген HCo20, що кодує людський важкий ланцюг. Отримані в результаті миші експресують трансгени, що кодують важкий і легкий каппа-ланцюги імуноглобуліну людини в генетичному оточенні, гомозиготному стосовно руйнування ендогенних локусів мишачого важкого ланцюга і легкого каппа-ланцюга.

У мишей лінії KM ендогенний ген мишачого легкого каппа-ланцюга був підданий гомозиготному руйнуванню, як описано в Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993), і ендогенний ген мишачого важкого ланцюга був підданий гомозиготному руйнуванню, як описано в прикладі 1 WO 01/09187. Ця лінія мишей несе трансген KCo5, що кодує людський легкий каппа-ланцюг, як описано в Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Ця лінія мишей також несе трансхромосому, що кодує людський важкий ланцюг, що складається з фрагмента hCF (SC20) хромосоми 14, як описано в WO 02/43478. Мишей HCo12-Balb/c, HCo17-Balb/c і HCo20-Balb/c можна отримати шляхом схрещування HCo12, HCo17 і HCo20 з KCo5[J/K](Balb), як описано в WO 09/097006.

У мишей лінії KM ендогенний ген мишачого легкого каппа-ланцюга був підданий гомозиготному руйнуванню, як описано в Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993), і ендогенний ген мишачого важкого ланцюга був підданий гомозиготному руйнуванню, як описано в прикладі 1 WO 01/09187. Ця лінія мишей несе трансген KCo5, що кодує людський легкий каппа-ланцюг, як описано в Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Ця лінія мишей також несе трансхромосому людського важкого ланцюга, що складається з антигензв'язувального фрагмента hCF (SC20) хромосоми 14, як описано в WO 02/43478.

Спленоцити від цих трансгенних мишей можна застосовувати для отримання гібридом, які секретують моноклональні антитіла людини, відповідно до добре відомих методик. Моноклональні або поліклональні антитіла людини за цим винаходом або антитіла за цим винаходом, що походять від інших видів, також можна отримувати трансгенним шляхом за допомогою отримання іншого ссавця, відмінного від людини, або рослини, що є трансгенними стосовно послідовностей важких і легких ланцюгів імуноглобуліну, що представляють інтерес, і отримання з нього антитіла у добувній формі. Що стосується отримання антитіл у ссавців трансгенним шляхом, антитіла можуть бути отримані в молоці кіз, корів або інших ссавців і добути з нього. Див., наприклад, US 5827690, US 5756687, US 5750172 і US 5741957.

Антитіло за цим винаходом може відноситися до будь-якого ізо типу. Вибір ізо типу зазвичай визначається бажаними ефекторними функціями, такими як індукція ADCC. Ілюстративними ізо типами є IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Можна використовувати константні домени будь-якого з людських легких ланцюгів каппа- або лямбда-типу. За необхідності, клас антитіла до сортиліну за цим винаходом можна перемкнути за допомогою відомих способів. Наприклад, антитіло за цим винаходом, яке спочатку було IgM, можна піддати перемиканню класу на антитіло IgG за цим винаходом. Додатково, методики перемикання класу можна застосовувати для перетворення IgG одного підкласу на іншій, наприклад з IgG1 на IgG2. Таким чином, ефекторну функцію антитіл за цим винаходом можна змінити шляхом перемикання ізо типу, наприклад, на антитіло IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE або IgM для різних терапевтичних шляхів застосування. У одному варіанті здійснення антитіло за цим винаходом є антитілом IgG1, наприклад, IgG1 к-ізо типу. Вважають, що антитіло відноситься до конкретного ізо типу, якщо його амінокислотна послідовність найбільш гомологічна такому ізо типу в порівнянні з іншими ізо типами.

У одному варіанті здійснення антитіло за цим винаходом являє собою повнорозмірне антитіло, переважно антитіло IgG, зокрема антитіло IgG1 к-ізо типу. У іншому варіанті здійснення антитіло за цим винаходом є антигензв'язувальним фрагментом антитіла або одноланцюговим антитілом.

Антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти можна отримувати, наприклад, шляхом фрагментації на антигензв'язувальні фрагменти із застосуванням традиційних методик, а антигензв'язувальні фрагменти піддавати скринінгу стосовно корисності таким же чином, як описано в даному описі винаходу для повних антитіл. Наприклад, антигензв'язувальні F(ab')₂-фрагменти можна отримувати шляхом обробки антитіла пепсином. Отриманий в результаті антигензв'язувальний F(ab')₂-фрагмент можна обробити для відновлення дисульфідних містків

з отриманням антигензв'язувальних Fab'-фрагментів. Антигензв'язувальні Fab-фрагменти можна отримувати шляхом обробки антитіла IgG папаїном; антигензв'язувальні Fab'-фрагменти можна отримувати шляхом розщеплювання антитіла IgG пепсином. Антигензв'язувальний F(ab')-фрагмент також можна отримувати шляхом зв'язування описаного нижче Fab' за допомогою тіоетерного зв'язку або дисульфідного зв'язку. Антигензв'язувальний Fab'-фрагмент являє собою антигензв'язувальний фрагмент антитіла, отриманий шляхом розрізання дисульфідного зв'язку в шарнірному домені F(ab')₂. Антигензв'язувальний Fab'-фрагмент можна отримувати шляхом обробки антигензв'язувального F(ab')₂-фрагмента відновником, таким як дитіотреїтол. Антигензв'язувальний фрагмент антитіла також можна отримати шляхом експресії нуклеїнових кислот, що кодують такі антигензв'язувальні фрагменти, в рекомбінантних клітинах (див., наприклад, Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)). Наприклад, химерний ген, що кодує частину антигензв'язувального F(ab')₂-фрагмента, може включати послідовності ДНК, що кодують CH1-домен і шарнірний домен H-ланцюга, за якими розташований стоп-кодон для зупинки трансляції з отриманням такої усіченої молекули антигензв'язувального фрагмента антитіла.

У одному варіанті здійснення антитіло до сортиліну є одновалентним антитілом, переважно одновалентним антитілом, як описано в WO2007059782 (яка включена в даний опис шляхом посилання у її повному обсязі), що має делецію в шарнірній ділянці. Відповідно, в одному варіанті здійснення антитіло являє собою одновалентне антитіло, де вказане антитіло до сортиліну сконструйоване за допомогою способу, що включає i) забезпечення конструктором нуклеїнової кислоти, що кодує легкий ланцюг вказаного одновалентного антитіла, при цьому вказаний конструктор містить нуклеотидну послідовність, що кодує VL-ділянку вибраного антигенспецифічного антитіла до сортиліну, і нуклеотидну послідовність, що кодує константну CL-ділянку Ig, де вказана нуклеотидна послідовність, що кодує VL-ділянку вибраного антигенспецифічного антитіла, і вказана нуклеотидна послідовність, що кодує CL-ділянку Ig, функціонально зв'язані одна з одною, і де у випадку з підтипом IgG1 нуклеотидна послідовність, що кодує CL-ділянку, була модифікована так, щоб CL-ділянка не містила будь-яких амінокислот, здатних утворювати дисульфідні зв'язки або ковалентні зв'язки з іншими пептидами, що містять ідентичну амінокислотну послідовність CL-ділянки, у присутності поліклонального IgG людини або при введенні тварині або людині; ii) забезпечення конструктором нуклеїнової кислоти, що кодує важкий ланцюг вказаного одновалентного антитіла, при цьому вказаний конструктор містить нуклеотидну послідовність, що кодує VH-ділянку вибраного антигенспецифічного антитіла, і нуклеотидну послідовність, що кодує константну CH-ділянку Ig людини, де нуклеотидна послідовність, що кодує CH-ділянку, була модифікована так, щоб ділянка, що відповідає шарнірній ділянці, і, як того вимагає підтип Ig, іншим ділянкам CH-ділянки, таким як CH3-ділянка, не містила будь-яких амінокислотних залишків, що беруть участь в утворенні дисульфідних зв'язків або ковалентних або стабільних нековалентних зв'язків між важкими ланцюгами з іншими пептидами, що містять ідентичну амінокислотну послідовність CH-ділянки Ig людини, у присутності поліклонального IgG людини або при введенні тварині або людині, де вказана нуклеотидна послідовність, що кодує VH-ділянку вибраного антиген-специфічного антитіла, і вказана нуклеотидна послідовність, що кодує CH-ділянку вказаного Ig, функціонально зв'язані одна з одною; iii) забезпечення клітинною системою експресії для отримання вказаного одновалентного антитіла; iv) отримання вказаного одновалентного антитіла шляхом сумісної експресії конструкторів нуклеїнових кислот за (i) і (ii) в клітинах клітинної системи експресії за (iii).

Так само, в одному варіанті здійснення антитіло до сортиліну за цим винаходом являє собою одновалентне антитіло, яке містить

(i) варіабельний домен антитіла за цим винаходом, описаний в даному описі, або антигензв'язувальну частину вказаного домену, і

(ii) CH-домен імуноглобуліну або його домен, що містить CH2- і CH3-домени, де CH-домен або його домен був модифікований так, щоб домен, відповідний шарнірному домену і, якщо імуноглобулін не відноситься до підтипу IgG4, іншим доменам CH-домену, таким як CH3-домен, не містив будь-яких амінокислотних залишків, здатних утворювати дисульфідні зв'язки з ідентичним CH-доменом або інші ковалентні або стабільні нековалентні зв'язки між важкими ланцюгами з ідентичним CH-доменом у присутності поліклонального IgG людини.

У додатковому варіанті здійснення важкий ланцюг одновалентного антитіла був модифікований так, щоб вся шарнірна ділянка була піддана делеції.

У іншому додатковому варіанті здійснення послідовність одновалентного антитіла була модифікована так, щоб вона не містила будь-яких акцепторних сайтів N-зв'язаного глікозилювання.

Цей винахід також включає "біспецифічні антитіла", де ділянка зв'язування антитіла з

сортиліном (наприклад, ділянка зв'язування з сортиліном моноклонального антитіла до сортиліну) є частиною двовалентного або полівалентного біспецифічного остову, націленого більш ніж на один епітоп (наприклад, другий епітоп може включати епітоп рецептора, що бере участь в активному транспорті, так що біспецифічне антитіло проявлятиме покращений

5 транцитоз через біологічний бар'єр, такий як гематоенцефалічний бар'єр). Таким чином, в іншому додатковому варіанті здійснення одновалентний Fab антитіла до сортиліну може бути з'єднаний з додатковим Fab або scFv, які націлюються на інший білок, з отриманням біспецифічного антитіла. Біспецифічне антитіло може мати подвійну функцію, наприклад терапевтичну функцію, що додається доменом, що зв'язується з сортиліном, і транспортну

10 функцію, завдяки якій воно може зв'язуватися з молекулою рецептора для посилення перенесення через біологічний бар'єр, такий як гематоенцефалічний бар'єр.

Антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти за цим винаходом також включають одноланцюгові антитіла. Одноланцюговими антитілами є пептиди, в яких Fv-домени важкого і легкого ланцюгів з'єднані один з одним. У одному варіанті здійснення цей винахід передбачає

15 одноланцюговий Fv (scFv), де важкий і легкий ланцюги в Fv антитіла до сортиліну за цим винаходом з'єднані за допомогою гнучкого пептидного лінкера (зазвичай завдовжки приблизно у 10, 12, 15 або більше амінокислотних залишків) в один пептидний ланцюг. Способи отримання таких антитіл описані, наприклад, в US 4946778, Pluckthun в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, том 113, під редакцією Rosenberg і Moore, Springer-Verlag, New York, стор. 269-315

20 (1994), Bird et al., Science 242, 423-426 (1988), Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) і McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990). Одноланцюгове антитіло може бути одновалентним, якщо використовується тільки один VH і VL, двовалентним, якщо використовуються два VH і VL, або полівалентним, якщо використовується більше двох VH і VL.

Описані в даному описі винаходу антитіла до сортиліну і їх антигензв'язувальні фрагменти

25 можна модифікувати шляхом включення будь-якої відповідної кількості модифікованих амінокислот і/або асоціацій з такими кон'югованими замісниками. Придатність в даному контексті загалом визначається здатністю щонайменше в значній мірі зберігати селективність щодо сортиліну і/або специфічність щодо сортиліну, властиву недериватизованому початковому антитілу до сортиліну. Включення однієї або декількох модифікованих амінокислот

30 може бути переважним, наприклад, для збільшення періоду напівжиття поліпептиду в сироватці крові, зменшення антигенності поліпептиду або підвищення стабільності поліпептиду при зберіганні. Амінокислота(и) піддається(ються) модифікації, наприклад, котрансляційно або посттрансляційно в ході отримання рекомбінантним шляхом (наприклад, N-зв'язане глікозилювання в мотивах N-X-S/T в ході експресії в клітинах ссавців), або піддається

35 модифікації за допомогою синтетичних способів. Необмежуючі приклади модифікованої амінокислоти включають глікозиловану амінокислоту, сульфатовану амінокислоту, преніловану (наприклад, фарнезиловану, геранілгераніловану) амінокислоту, ацетиловану амінокислоту, ациловану амінокислоту, ПЕГіловану амінокислоту, біотиніловану амінокислоту, карбоксиловану амінокислоту, фосфориловану амінокислоту і т. д. У літературі представлено

40 безліч джерел, які можуть бути керівництвом для фахівця з модифікації амінокислот. Приклади протоколів знаходяться в Walker (1998) Protein Protocols On CD-Rom, Humana Press, Totowa, NJ. Модифіковану амінокислоту можна вибрати, наприклад, з глікозилованої амінокислоти, ПЕГілованої амінокислоти, фарнезилованої амінокислоти, ацетилованої амінокислоти, біотинілованої амінокислоти, амінокислоти, кон'югованої з ліпідним фрагментом, або

45 амінокислоти, кон'югованої з органічним дериватизуючим засобом.

Антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти за цим винаходом також можна модифікувати хімічним шляхом за допомогою ковалентного кон'югування з полімером, наприклад, для збільшення їх періоду напівжиття в кровотоці. Ілюстративні полімери і способи приєднання їх до пептидів наведені, наприклад, в US 4766106, US 4179337, US 4495285 і US 4609546. Додаткові

50 ілюстративні полімери включають поліоксіетиловані поліоли і поліетиленгліколь (PEG) (наприклад, PEG з молекулярною масою від приблизно 1000 до приблизно 40000, наприклад, від приблизно 2000 до приблизно 20000, наприклад, приблизно 3000-12000 г/моль).

Антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти за цим винаходом можна додатково застосовувати в способі діагностики або як діагностичний візуалізуючий ліганд.

55 Згідно з одним варіантом здійснення передбачаються антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти за цим винаходом, що містять одну або декілька мічених радіоактивними ізотопами амінокислот. Мічене радіоактивним ізотопом антитіло до сортиліну можна застосовувати як в діагностичних, так і в терапевтичних цілях (ще однією можливою ознакою є кон'югування з міченими радіоактивним ізотопом молекулами). Необмежувальні приклади таких міток

60 включають без обмеження вісмут (^{213}Bi), вуглець (^{11}C , ^{13}C , ^{14}C), хром (^{51}Cr), кобальт (^{57}Co , ^{60}Co),

мідь (^{64}Cu), диспрозій (^{165}Dy), ербій (^{169}Er), фтор (^{18}F), гадоліній (^{153}Gd , ^{159}Gd), галій (^{68}Ga , ^{67}Ga), германій (^{68}Ge), золото (^{198}Au), гольмій (^{166}Ho), водень (^3H), індій (^{111}In , ^{112}In , ^{113}In , ^{115}In), йод (^{121}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), іридій (^{192}Ir), залізо (^{59}Fe), криптон ($^{81\text{m}}\text{Kr}$), лантан (^{140}La), лютецій (^{177}Lu), марганець (^{54}Mn), молібден (^{99}Mo), азот (^{13}N , ^{15}N), кисень (^{15}O), паладій (^{103}Pd), фосфор (^{32}P), калій (^{42}K), празеодим (^{142}Pr), прометій (^{149}Pm), реній (^{186}Re , ^{188}Re), родій (^{105}Rh), рубідій (^{81}Rb , ^{82}Rb), рутеній (^{82}Ru , ^{97}Ru), самарій (^{153}Sm), скандій (^{47}Sc), селен (^{75}Se), натрій (^{24}Na), стронцій (^{85}Sr , ^{89}Sr , ^{92}Sr), сірку (^{35}S), технецій (^{99}Tc), талій (^{201}Tl), олово (^{113}Sn , ^{117}Sn), ксенон (^{133}Xe), ітербій (^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Yb), ітрій (^{90}Y) і цинк (^{65}Zn). Способи отримання амінокислот, мічених радіоактивними ізотопами, і відповідних похідних пептидів відомі з рівня техніки (див., наприклад, Junghans et al., у *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2-е видання, під редакцією Chafner і Longo, Lippincott Raven (1996)) і US 4681581; US 4735210; US 5101827; US 5102990 (US RE35500), US 5648471 і US 5697902. Наприклад, радіоактивний ізотоп можна кон'югувати за допомогою способу із застосуванням хлораміну Т (Lindegren, S. et al. (1998) "Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstannyl) Benzoate As An Intermediate", *Nucl. Med. Biol.* 25(7):659-665; Kurth, M. et al. (1993) "Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor", *J. Med. Chem.* 36(9):1255-1261; Rea, D.W. et al. (1990) "Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors", *Cancer Res.* 50(3 Suppl):857s-861s).

Цей винахід також передбачає антитіла до сортиліну і їх антигензв'язувальні фрагменти, мічені за допомогою детективної флуоресцентної мітки (такої як хелат рідкоземельного елемента (наприклад, хелат європію)), мітки флуоресцеїнового типу (наприклад, флуоресцеїн, флуоресцеїнізотіоціанат, 5-карбоксифлуоресцеїн, 6-карбоксифлуоресцеїн, дихлортриазиніламінофлуоресцеїн), мітки родамінового типу (наприклад, ALEXA FLUOR® 568 (Invitrogen), TAMRA® або данзилхлорид), VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME™ (Perkin Elmer), фікоеритрину; умбеліферону, лісаміну; ціаніну; фікоеритрину, техаського червоного, BODIPY FL-SE® (Invitrogen) або його аналога, всі з яких підходять для оптичного виявлення. Можна використовувати хемілюмінесцентні мітки (наприклад, люмінол, люциферазу, люциферин і екворин). Таку діагностику і виявлення також можна здійснити шляхом зв'язування діагностичної молекули цього винаходу з придатними до виявлення речовинами, включаючи, без обмеження, різні ферменти, при цьому ферменти включають, без обмеження, пероксидазу хрину, лужну фосфатазу, бета-галактозидазу або ацетилхолінестеразу, або з комплексами з простетичними групами, такими як, без обмеження, стрептавідин/біотин і авідин/біотин.

Можна використовувати хемілюмінесцентні мітки (наприклад, люмінол, люциферазу, люциферин і екворин). Таку діагностику і виявлення також можна здійснити шляхом зв'язування діагностичної молекули цього винаходу з придатними до виявлення речовинами, включаючи, без обмеження, різні ферменти, при цьому ферменти включають, без обмеження, пероксидазу хрину, лужну фосфатазу, бета-галактозидазу або ацетилхолінестеразу, або з комплексами з простетичними групами, такими як, без обмеження, стрептавідин/біотин і авідин/біотин. Також можна використовувати парамагнітні мітки, і їх переважно виявляють за допомогою позитронно-емісійної томографії (PET) або однофотонної емісійної комп'ютерної томографії (SPECT). Такі парамагнітні мітки включають, без обмеження, сполуки, що містять парамагнітні іони алюмінію (Al), барію (Ba), кальцію (Ca), церію (Ce), диспрозію (Dy), ербію (Er), європію (Eu), гадолінію (Gd), гольмію (Ho), іридію (Ir), літію (Li), магнію (Mg), марганцю (Mn), молібдену (Mo), неодиму (Nd), осмію (Os), кисню (O), паладію (Pd), платини (Pt), родію (Rh), рутенію (Ru), самарію (Sm), натрію (Na), стронцію (Sr), тербію (Tb), тулію (Tm), олова (Sn), титану (Ti), вольфраму (W) і цирконію (Zr), і, зокрема, Co^{+2} , Cr^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Ga^{+3} , Mn^{+3} , Ni^{+2} , Ti^{+3} , V^{+3} і V^{+4} , позитронно-активні метали з використанням різних видів позитронно-емісійної томографії і нерадіоактивних парамагнітних іонів металів.

Таким чином, згідно з одним варіантом здійснення антитіла до сортиліну або його фрагмент, що зв'язується з сортиліном, за цим винаходом можуть бути мічені флуоресцентною міткою, хемілюмінесцентною міткою, парамагнітною міткою, радіоізотопною міткою або ферментною міткою. Мічене антитіло його фрагмент можна застосовувати для виявлення наявності або вимірювання кількості вказаного сортиліну в головному мозку суб'єкта. Цей спосіб може включати виявлення або вимірювання кількості антитіла до сортиліну або фрагмента, зв'язаного з вказаним сортиліном, за допомогою візуалізації *in vivo* і може включати візуалізацію *ex vivo* вказаного антитіла до сортиліну або фрагмента, зв'язаного з вказаним сортиліном.

Згідно з додатковим аспектом цей винахід відноситься до вектора експресії, що кодує одну або декілька поліпептидних ланцюгів антитіла за цим винаходом або його антигензв'язувального домену. Такі вектори експресії можна застосовувати для отримання антитіл і антигензв'язувальних фрагментів за цим винаходом рекомбінантним шляхом.

Вектор експресії в контексті цього винаходу може являти собою будь-який відповідний ДНК- або РНК-вектор, включаючи хромосомні, нехромосомні вектори і вектори на основі синтетичної нуклеїнової кислоти (послідовність нуклеїнової кислоти, що містить відповідний набір елементів контролю експресії). Приклади таких векторів включають похідні SV40, бактеріальні плазмиди, фагову ДНК, бакуловірус, дріжджові плазмиди, вектори, отримані в результаті об'єднання плазмід і фагової ДНК, і вектори на основі вірусної нуклеїнової кислоти (РНК або ДНК). У одному варіанті здійснення нуклеїнова кислота, що кодує антитіло до сортиліну, міститься у векторі на основі "голої" ДНК або РНК, що включає, наприклад, лінійний елемент експресії (описаний, наприклад, в Sykes and Johnston, *Nat Biotech* 12, 355-59 (1997)), векторі на основі щільно укладеної нуклеїнової кислоти (описаний, наприклад, в US 6077835 і/або WO 00/70087), плазмідному векторі, такому як pBR322, pUC 19/18 або pUC 118/119, векторі мінімального розміру "midge" на основі нуклеїнової кислоти (описаний, наприклад, в Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), або представлена у вигляді векторного конструку, що осаджується, на основі нуклеїнової кислоти, такого як конструкт, що осаджується CaPO₄ (описана, наприклад, в WO 00/46147, Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978), і Coraro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 2, 603 (1981)). Такі вектори на основі нуклеїнових кислот і їх застосування добре відомі з рівня техніки (див., наприклад, US 5589466 і US 5973972).

У одному варіанті здійснення вектор придатний для експресії антитіл до сортиліну або їх антигензв'язувальних фрагментів за цим винаходом в бактеріальній клітині. Приклади таких векторів включають вектори експресії, такі як BlueScript (Stratagene), вектори pIN (Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem* 264, 5503-5509 (1989), вектори pET (Novagen, Мадісон, Вісконсін) і т. п.).

Вектор експресії може також, або як альтернатива, бути вектором, відповідним для експресії в дріжджовій системі. Можна використовувати будь-який вектор, відповідний для експресії в дріжджовій системі. Відповідні вектори включають, наприклад, вектори, що містять конститутивні або індуковані промотори, такі як промотор гена фактора альфа, алкогольоксидази і PGH (огляд яких наданий в *Current Protocols in Molecular Biology*, під редакцією F. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987), Mattanovich, D. et al. *Methods Mol. Biol.* 824, 329-358 (2012), Celik, E. et al. *Biotechnol. Adv.* 30(5), 1108-1118 (2012), Li, P. et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142(2), 105-124 (2007), Boer, E. et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(3), 513-523 (2007), van der Vaart, J.M. *Methods Mol. Biol.* 178, 359-366 (2002), і Holliger, P. *Methods Mol. Biol.* 178, 349-357 (2002)).

У векторі експресії за цим винаходом нуклеїнові кислоти, що кодують антитіло до сортиліну, можуть містити будь-який відповідний промотор, енхансер і інші елементи, що сприяють експресії, або бути пов'язаними з ними. Приклади таких елементів включають сильні промотори експресії (наприклад, IE промотор/енхансер CMV людини, а також LTR промотори RSV, SV40, SL3-3, MMTV і HIV), ефективні полі-(A)-послідовності термінації, точку початку реплікації для продукту плазмиди в *E. coli*, ген стійкості до антибіотика як селективний маркер і/або відповідний сайт клонування (наприклад, полілінкер). Нуклеїнові кислоти також можуть містити індукований промотор, а не конститутивний промотор, такий як IE CMV (фахівець в даній галузі техніки зрозуміє, що такі терміни фактично описують ступінь експресії гена в певних умовах).

Згідно з ще одним додатковим аспектом цей винахід відноситься до рекомбінантної еукаріотичної або прокаріотичної клітини-хазяїна, такої як трансфектома, яка продукує антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за цим винаходом, визначені в даному описі винаходу, або біспецифічну молекулу за цим винаходом, визначену в даному описі винаходу. Приклади клітин-хазяїнів включають клітини дріжджів, бактерій і ссавців, такі як клітини CHO або HEK. Наприклад, в одному варіанті здійснення цей винахід передбачає клітину, яка містить нуклеїнову кислоту, стабільно інтегровану в клітинний геном, що містить послідовність, що кодує антитіло до сортиліну за цим винаходом або його антигензв'язувальний фрагмент, які експресуються. У іншому варіанті здійснення цей винахід передбачає клітину, яка містить неінтегровану нуклеїнову кислоту, таку як плазміда, косміда, фагміда або лінійний елемент експресії, що містить послідовність, що кодує антитіло до сортиліну або його антигензв'язувальний фрагмент за цим винаходом, які експресуються.

У додатковому аспекті цей винахід відноситься до способу отримання антитіла до сортиліну за цим винаходом, при цьому вказаний спосіб включає стадії: а) культивування гібридами або клітини-хазяїна за цим винаходом, описаних в даному описі вище, і b) очищення антитіла за цим винаходом від культурального середовища.

У одному варіанті здійснення цей винахід відноситься до препарату в тому сенсі, в якому цей термін використовується в даному описі винаходу, який містить антитіло до сортиліну,

визначене в даному описі, і який практично не містить антитіл, що утворюються в природних умовах, які або не здатні зв'язуватися з сортиліном, або істотним чином не змінюють антисортилінові функціональні характеристики препарату. Таким чином, такий препарат не охоплює сироватку крові, що утворюється в природних умовах, або очищений похідний продукт такої сироватки крові, що містить суміш антитіла до сортиліну і іншого антитіла, яке не змінює функціональні характеристики антитіла до сортиліну в препараті, де такі функціональні характеристики являють собою:

(i) афінність зв'язування (K_D) з сортиліном;

(ii) здатність знижувати і/або пригнічувати зв'язування PGRN з сортиліном;

(iii) здатність знижувати і/або пригнічувати виведення PGRN клітинами, що експресують сортилін;

(iv) здатність знижувати і/або пригнічувати ендоцитоз PGRN клітинами, що експресують сортилін;

(v) здатність підвищувати кількість і/або концентрацію PGRN в плазмі крові у мишей з нокіном, за рахунок якого у них експресується сортилін людини; здатність підвищувати кількість і/або концентрацію PGRN в головному мозку і/або

(vi) здатність забезпечувати лікування лобно-скроневої деменції (FTD) і/або бічного аміотрофічного склерозу (ALS) при його тривалому введенні.

Цей винахід, зокрема, відноситься до препаратів такого антитіла до сортиліну, що має структурну зміну в своїй амінокислотній послідовності (у будь-яких своїх CDR, варіабельних доменах, залишках каркасної ділянки і/або константних доменах) в порівнянні із структурою антитіла до сортиліну, що зустрічається в природі, де вказана структурна зміна обумовлює прояв антитілом до сортиліну значно змінених функціональних характеристик (тобто більш ніж з 20 % різницею, більш ніж з 40 % різницею, більш ніж з 60 % різницею, більш ніж з 80 % різницею, більш ніж з 100 % різницею, більш ніж з 150 % різницею, більш ніж з 2-кратною різницею, більш ніж з 4-кратною різницею, більш ніж з 5-кратною різницею або більш ніж з 10-кратною різницею у функціональних характеристиках) в порівнянні з функціональними характеристиками, що проявляються вказаним антитілом до сортиліну, що зустрічається в природі; де вказані функціональні характеристики являють собою:

(i) афінність зв'язування (K_D) з сортиліном;

(ii) здатність знижувати і/або пригнічувати зв'язування PGRN з сортиліном;

(iii) здатність знижувати і/або пригнічувати виведення PGRN клітинами, що експресують сортилін;

(iv) здатність знижувати і/або пригнічувати ендоцитоз PGRN клітинами, що експресують сортилін;

(v) здатність підвищувати кількість і/або концентрацію PGRN в плазмі крові у мишей з нокіном, за рахунок якого у них експресується сортилін людини;

(vi) здатність підвищувати кількість і/або концентрацію PGRN в головному мозку і/або

(vii) здатність забезпечувати лікування лобно-скроневої деменції (FTD), бічного аміотрофічного склерозу (ALS) і/або хвороби Альцгеймера (AD) при його тривалому введенні особливо в тих випадках, де такі змінені функціональні характеристики є результатом структурної зміни і, отже, невіддільні від неї.

Термін "практично не містить антитіл, що утворюються в природних умовах" відноситься до повної відсутності таких антитіл, що утворюються в природних умовах, в таких препаратах або до включення таких антитіл, що утворюються в природних умовах, в такі препарати в концентрації, в якій вони істотним чином не впливають на властивості зв'язування з сортиліном даних препаратів. Говорять, що антитіло є "виділеним", якщо воно не має еквівалента, що утворюється в природних умовах, або було відокремлене або очищене від компонентів, які в природних умовах супроводжують його.

Термін "антитіла, що утворюються в природних умовах", використовуваний щодо таких препаратів, відноситься до антитіл (включаючи аутоантитіла, що утворюються в природних умовах), утворення яких викликається в організмі людей або інших тварин як природний наслідок функціонування їх імунних систем.

Таким чином, препарати за цим винаходом не виключають, а насправді явним чином охоплюють такі препарати, які містять антитіло до сортиліну і спеціально додане додаткове антитіло, здатне зв'язуватися з епітопом, що не міститься в сортиліні. Такі препарати, зокрема, включають варіанти їх здійснення, де даний препарат проявляє підвищену ефективність при лікуванні лобно-скроневої деменції (FTD) і/або бічного аміотрофічного склерозу (ALS).

Антитіла їх антигензв'язувальні фрагменти за цим винаходом можна отримати в різних лініях клітин, таких як клітинна лінія людини, клітинна лінія ссавця, відмінного від людини, і

клітинна лінія комахи, наприклад клітинна лінія CHO, клітинна лінія НЕК, клітинна лінія ВНК-21, клітинна лінія миші (така як клітинна лінія мієломи), клітинна лінія фібросаркоми, клітинна лінія PER.C6, клітинна лінія НКВ-11, клітинна лінія САР і клітинна лінія HuH-7 людини (Dumont et al, 2015, Crit Rev Biotechnol. Sep 18:1-13, зміст якої включено в даний опис шляхом посилання).

У ще одному додатковому аспекті цей винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить

(i) антитіло до сортиліну або його антигензв'язувальний фрагмент, обидва з яких визначені в даному описі винаходу, або препарат, в тому сенсі, в якому цей термін визначений в даному описі винаходу, який містить таке антитіло до сортиліну або його антигензв'язувальний фрагмент; і

(ii) фармацевтично прийнятний носій.

Фармацевтичні композиції можна складати з фармацевтично прийнятними носіями або розріджувачами, а також з будь-якими іншими відомими допоміжними засобами і наповнювачами згідно з традиційними методиками, такими як розкриті в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2013.

Фармацевтично прийнятні носії або розріджувачі, а також будь-які інші відомі допоміжні засоби і наповнювачі мають бути придатними для вибраної сполуки за цим винаходом і вибраного способу введення. Придатність носіїв і інших компонентів фармацевтичних композицій визначають на підставі відсутності значного негативного впливу на бажані біологічні властивості вибраної сполуки або фармацевтичної композиції за цим винаходом (наприклад, менш ніж істотного впливу (10 % або меншого відносного інгібування, 5 % або меншого відносного інгібування і т. п.) на зв'язування з епітопом).

Фармацевтична композиція за цим винаходом також може містити розріджувачі, наповнювачі, солі, буфери, детергенти (наприклад, неіонний детергент, такий як Tween-20 або Tween-80), стабілізатори (наприклад, цукри або вільні протеїногенні амінокислоти), консерванти, фіксатори тканин, солюбілізатори і/або інші матеріали, відповідні для включення у фармацевтичну композицію. Розріджувач вибирають так, щоб він не впливав на біологічну активність комбінації. Прикладами таких розріджувачів є дистильована вода, фізіологічний фосфатно-сольовий буферний розчин, розчини Рінгера, розчин декстрози і розчин Хенка. Крім того, фармацевтична композиція або склад також можуть містити інші носії або нетоксичні нетерапевтичні неімунотенні стабілізатори і т. п. Композиції також можуть містити великі макромолекули, що поволі метаболізуються, такі як білки, полісахариди, такі як хітозан, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти і сополімери (наприклад, функціоналізована латексом сефароза, агароза, целюлоза і т. п.), полімери амінокислот, сополімери амінокислот і ліпідні агрегати (наприклад, масляні краплі або ліпосоми).

Фактичні рівні доз активних інгредієнтів у фармацевтичних композиціях за цим винаходом можна змінювати так, щоб отримати кількість активного інгредієнта, ефективну для досягнення бажаної терапевтичної відповіді для конкретного пацієнта, композиції і способу введення. Вибраний рівень дози залежатиме від ряду фармакокінетичних чинників, зокрема активності конкретних використовуваних композицій за цим винаходом або їх амідів, шляху введення, часу введення, швидкості виведення конкретної використовуваної сполуки, тривалості лікування, інших лікарських засобів, сполук і/або матеріалів, вживаних в комбінації з конкретними використовуваними композиціями, віку, статі, ваги, стану, загального стану здоров'я і анамнезу пацієнта, що піддається лікуванню, а також аналогічних чинників, добре відомих в галузі медицини.

Фармацевтичну композицію можна вводити будь-яким відповідним шляхом і способом, зокрема парентеральним, місцевим, пероральним або інтраназальним шляхом, для профілактичного і/або терапевтичного лікування. У одному варіанті здійснення фармацевтичну композицію за цим винаходом вводять парентерально. Використовувані в даному описі винаходу фрази "парентеральне введення" і "що вводиться парентерально", означають способи введення, відмінні від ентерального і місцевого введення, зазвичай шляхом ін'єкції, і включають епідермальну, внутрішньовенну, внутрішньом'язову, внутрішньоартеріальну, інтратекальну, внутрішньокапсулярну, внутрішньоочную, внутрішньосерцеву, внутрішньошкірну, внутрішньочеревну, внутрішньосухожильну, транстрахеальну, підшкірну, субкутикулярну, внутрішньосуставну, підкапсулярну, субарахноїдальну, інтраспінальну, внутрічерепну, інтраторакальну, епідуральну і внутрішньогрудинну ін'єкцію і інфузію. Додаткові відповідні шляхи введення сполуки за цим винаходом *in vivo* і *in vitro* добре відомі з рівня техніки і можуть бути вибрані звичайними фахівцями в даній галузі техніки. Згідно з одним варіантом здійснення цю фармацевтичну композицію вводять за допомогою внутрішньовенної або підшкірної ін'єкції або інфузії.

Фармацевтично прийнятні носії включають всілякі відповідні розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні і протигрибкові засоби, засоби, що надають ізотонічність, антиоксиданти і засоби, що уповільнюють абсорбцію, і т. п., які є фізіологічно сумісними із сполуками за цим винаходом.

Приклади відповідних водних і неводних носіїв, які можна використовувати у фармацевтичних композиціях за цим винаходом, включають воду, сольовий розчин, фосфатно-сольовий буферний розчин, етанол, декстрозу, поліюли (такі як гліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь і т. п.), а також їх придатні суміші, рослинні олії, такі як оливкова олія, кукурудзяна олія, арахісова олія, бавовняна олія і кунжутна олія, колоїдні розчини карбоксиметилцелюлози, трагакантову камедь і придатні для ін'єкцій органічні естери, такі як етилолеат, і/або різні буфери. Інші носії добре відомі в галузі фармацевтики.

Фармацевтично прийнятні носії включають стерильні водні розчини або дисперсії і стерильні порошки для індивідуального отримання стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій. Застосування таких середовищ і засобів для фармацевтично активних речовин відоме з рівня техніки. За винятком випадків, коли будь-яке традиційне середовище або засіб є несумісними з активною сполукою, передбачається їх застосування у фармацевтичних композиціях цього винаходу.

Належну плинність можна підтримувати, наприклад, шляхом застосування матеріалів для покриття, таких як лецитин, шляхом підтримки необхідного розміру частинок у разі дисперсій і шляхом застосування поверхнево-активних речовин.

Фармацевтичні композиції за цим винаходом також можуть містити фармацевтично прийнятні антиоксиданти, наприклад, (1) водорозчинні антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота, гідрохлорид цистеїну, бісульфат натрію, метабісульфіт натрію, сульфїт натрію і т. п.; (2) жиророзчинні антиоксиданти, такі як аскорбілпальмітат, бутилований гідроксіанізол (BHA), бутилований гідрокситолуол (BHT), лецитин, пропілгалат, альфа-токоферол і т. п.; і (3) металохелатори, такі як лимонна кислота, етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA), сорбіт, винна кислота, фосфорна кислота і т. п.

Фармацевтичні композиції за цим винаходом також можуть містити засоби, що забезпечують ізотонічність, такі як цукри, багатоатомні спирти, такі як манїт, сорбіт, гліцерин, або хлорид натрію, в композиціях.

Фармацевтичні композиції за цим винаходом також можуть містити одну або декілька допоміжних речовин, відповідних для вибраного шляху введення, такі як консерванти, зволожувальні речовини, емульгатори, диспергуючі речовини, консерванти або буфери, які можуть збільшити термін зберігання або ефективність фармацевтичної композиції. Сполуки за цим винаходом можна отримувати з носіями, які захищатимуть сполуки від швидкого вивільнення, наприклад, у вигляді складу з контрольованим вивільненням, в тому числі у вигляді імплантатів, трансдермальних пластирів і мікроінкапсульованих систем доставки. Такі носії можуть включати желатин, гліцерилмоностеарат, гліцерилдистеарат, полімери, які руйнуються біологічно, біосумісні полімери, такі як сополімер етилену і вінілацетату, поліангідриди, полігліколеву кислоту, колаген, поліортоестери і полімолочну кислоту, окремо або разом з воском, або інші матеріали, добре відомі з рівня техніки. Способи отримання таких складів в цілому відомі фахівцям в даній галузі техніки. Див., наприклад, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

У одному варіанті здійснення сполуки за цим винаходом можна складати для забезпечення належного розподілу *in vivo*. Фармацевтично прийнятні носії для парентерального введення включають стерильні водні розчини або дисперсії і стерильні порошки для індивідуального приготування стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій. Застосування таких середовищ і засобів для фармацевтично активних речовин відоме з рівня техніки. За винятком випадків, коли які-небудь традиційні середовища або засіб є несумісними з активною сполукою, передбачається їх застосування у фармацевтичних композиціях цього винаходу. У композиції також можуть бути включені додаткові активні сполуки.

Фармацевтичні композиції для ін'єкцій як правило мають бути стерильними і стабільними в умовах виготовлення і зберігання. Композиція може бути складена у вигляді розчину, мікроемульсії, ліпосоми або іншої впорядкованої структури, відповідної для високої концентрації лікарського засобу. Носій може бути водним або неводним розчинником або дисперсійним середовищем, що містить, наприклад, воду, етанол, поліюли (такі як гліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь і т. п.) і відповідні їх суміші, рослинні олії, такі як оливкова олія, і придатні для ін'єкцій органічні естери, такі як етилолеат. Належну плинність можна підтримувати, наприклад, шляхом застосування покриття, такого як лецитин, шляхом підтримки необхідного розміру частинок у разі дисперсій і шляхом застосування поверхнево-активних речовин. В багатьох

випадках буде переважним включення засобів, що забезпечують ізотонічність, наприклад цукрів, багатоатомних спиртів, таких як гліцерин, маніт, сорбіт, або хлориду натрію в композицію. Тривалого всмоктування ін'єкційних композицій можна досягти шляхом включення в композицію засобу, що уповільнює всмоктування антитіла, наприклад моностеаратних солей і желатину. Стерильні ін'єкційні розчини можна отримати шляхом поміщення активної сполуки в необхідній кількості у відповідний розчинник з одним інгредієнтом або комбінацією інгредієнтів, наприклад, перелічених вище, при необхідності з подальшою стерилізуючою мікрофільтрацією. Зазвичай дисперсії отримують шляхом поміщення активної сполуки в стерильний наповнювач, який містить основне дисперсійне середовище і інші необхідні інгредієнти, наприклад, з перелічених вище. У разі стерильних порошків для приготування стерильних ін'єкційних розчинів прикладами способів отримання порошків є вакуумна сушка і сублімаційна сушка (ліофілізація), в результаті якої отримують порошкоподібний активний інгредієнт плюс будь-який додатковий бажаний інгредієнт з їх розчину, заздалегідь підданого стерилізуючій фільтрації.

Стерильні ін'єкційні розчини можна отримати шляхом поміщення активної сполуки в необхідній кількості у відповідний розчинник з одним інгредієнтом або комбінацією інгредієнтів, перелічених вище, при необхідності з подальшою стерилізуючою мікрофільтрацією. Зазвичай дисперсії отримують шляхом поміщення активної сполуки в стерильний наповнювач, який містить основне дисперсійне середовище і інші необхідні інгредієнти з перелічених вище. У разі стерильних порошків для отримання стерильних ін'єкційних розчинів прикладами способів приготування є вакуумна сушка і сублімаційна сушка (ліофілізація), в результаті якої отримують порошкоподібний активний інгредієнт плюс будь-який додатковий бажаний інгредієнт з їх розчину, заздалегідь підданого стерилізуючій фільтрації.

Схеми прийому у вищезгаданих способах лікування і застосуваннях, описаних в даному описі винаходу, коректують для отримання оптимальної бажаної відповіді (наприклад, терапевтичної відповіді). Наприклад, можна вводити одноразову болюсну дозу, можна вводити декілька розділених доз протягом деякого часу, або дозу можна пропорційно зменшувати або збільшувати, як визначається потребами терапевтичної ситуації. Композиції для парентерального введення можна складати у вигляді одиничної лікарської форми для простоти введення і рівномірності дозування. Одинична лікарська форма, використовувана в даному описі винаходу, відноситься до фізично дискретних одиниць, зручних як одиничні дози для суб'єктів, що підлягають лікуванню; при цьому кожна одиниця містить попередньо визначену кількість активної сполуки, розраховану для отримання бажаного терапевтичного ефекту, спільно з необхідним фармацевтичним носієм. Технічні вимоги до одиничних лікарських форм цього винаходу продиктовані (а) унікальними характеристиками активної сполуки і конкретним терапевтичним ефектом, якого необхідно досягти, і (б) обмеженнями, притаманними галузі складання такої активної сполуки для лікування чутливості у індивідуумів, і безпосередньо залежать від них.

Ефективні дози і схеми прийому для антитіл до сортиліну залежать від захворювання або стану, що підлягають лікуванню, і можуть бути визначені фахівцями в даній галузі техніки. Ілюстративний необмежувальний діапазон для терапевтично ефективної кількості антитіла за цим винаходом становить приблизно 0,1-10 мг/кг ваги тіла, як, наприклад, приблизно 0,1-5 мг/кг ваги тіла, наприклад, приблизно 0,1-2 мг/кг ваги тіла, як, наприклад, приблизно 0,1-1 мг/кг ваги тіла, наприклад, приблизно 0,15, приблизно 0,2, приблизно 0,5, приблизно 1, приблизно 1,5 або приблизно 2 мг/кг ваги тіла.

Лікар або ветеринар із стандартною кваліфікацією в даній галузі легко може визначити і призначити ефективну кількість необхідної фармацевтичної композиції. Наприклад, лікар або ветеринар може почати з доз антитіла до сортиліну, використовуваного у фармацевтичній композиції, нижчих рівнів, ніж потрібно для досягнення бажаного терапевтичного ефекту, і поступово підвищувати дозу до досягнення бажаного ефекту. В цілому, відповідною добовою дозою композиції за цим винаходом буде така кількість сполуки, яка є найнижчою дозою, ефективною для отримання терапевтичного ефекту. Така ефективна доза зазвичай залежатиме від описаних вище чинників. Введення може бути, наприклад, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, внутрішньочеревним або підшкірним, і, наприклад, введення можна здійснювати в безпосередній близькості від сайту мішені. За бажанням, ефективну добову дозу фармацевтичної композиції можна вводити у вигляді двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести або більше частин дози, що вводяться окремо з відповідними інтервалами протягом доби, необов'язково у вигляді одиничних лікарських форм. Хоча сполуки цього винаходу можна вводити окремо, переважно вводити сполуки у вигляді фармацевтичної композиції, описаної вище.

Мічені антитіла або їх антигенз'язувальні фрагменти за цим винаходом можна

застосовувати в діагностичних цілях для виявлення, діагностики або моніторингу захворювань або порушень. Цей винахід передбачає виявлення або діагностику нейродегенеративного або когнітивного захворювання або порушення, включаючи, без обмеження, FTD, ALS або протеїнопатії TDP43, таких як хвороба Альцгеймера (AD), що включають (а) проведення аналізу наявності піроглютамілованих Аβ-фрагментів у клітинах або зразках тканин суб'єкта із застосуванням одного або декількох антитіл, що специфічно зв'язуються з сортиліном; і (b) проведення порівняння рівня антигену з контрольним рівнем, наприклад, з рівнями в зразках нормальної тканини, при якому підвищення аналізованого рівня антигену в порівнянні з контрольним рівнем антигену свідчить про захворювання або порушення або свідчить про тяжкість захворювання або порушення.

Антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти за цим винаходом можна застосовувати для аналізу рівня сортиліну або антигензв'язувальних фрагментів сортиліну в біологічному зразку за допомогою імуногістохімічних способів, добре відомих з рівня техніки. Інші способи з використанням антитіл, застосовні для виявлення білка, включають імунологічні аналізи, такі як твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), радіоімунологічний аналіз (RIA), а також аналізи з використанням платформи Meso Scale Discovery (MSD). У таких наборах і способах можна застосовувати відповідні мітки для антитіл, і мітки, відомі з рівня техніки, включають ферментні мітки, такі як лужна фосфатаза і глюкозооксидаза; радіоізотопні мітки, такі як йод (^{125}I , ^{131}I), вуглець (^{14}C), сірка (^{35}S), тритій (^3H), індій (^{121}In) і технецій ($^{99\text{m}}\text{Tc}$); а також люмінесцентні мітки, такі як люмінол і люцифераза; і флуоресцентні мітки, такі як флуоресцеїн і родамін.

Наявність мічених антитіл до сортиліну або їх фрагментів, що зв'язуються з сортиліном, можна виявляти *in vivo* в діагностичних цілях. Згідно з одним варіантом здійснення діагностика передбачає а) введення суб'єктові ефективної кількості такої міченої молекули; b) очікування протягом деякого проміжку часу після введення для забезпечення концентрації міченої молекули в місцях відкладення Аβ (за наявності таких) і для забезпечення очищення від незв'язаної міченої молекули до фоновому рівню; c) визначення фоновому рівню і d) виявлення міченої молекули у суб'єкта, при цьому виявлення міченої молекули на рівні, що перевищує фоновий, свідчить про те, що суб'єкт має захворювання або порушення, або свідчить про тяжкість захворювання або порушення. Відповідно до такого варіанту здійснення молекулу мітять візуалізуючим фрагментом, відповідним для виявлення за допомогою конкретної системи візуалізації, відомої фахівцям в даній галузі техніки. Фонові рівні можна визначити за допомогою різних способів, відомих з рівня техніки, зокрема шляхом порівняння кількості виявленого міченого антитіла із стандартним значенням, заздалегідь визначеним для конкретної системи візуалізації. Способи і системи, які можна застосовувати в діагностичних способах цього винаходу, включають, без обмеження, комп'ютерну томографію (CT), сканування всього тіла, таке як позитронно-емісійна томографія (PET), магнітно-резонансна візуалізація (MRI) і ультразвукове дослідження.

У додатковому аспекті цей винахід відноситься до антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за цим винаходом для застосування в медицині.

У додатковому аспекті цей винахід відноситься до антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за цим винаходом для застосування при лікуванні захворювання, що асоціюється із зниженими рівнями PGRN в головному мозку пацієнта.

У додатковому аспекті цей винахід відноситься до застосування антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за цим винаходом при виготовленні лікарського препарату для лікування захворювання, що асоціюється із зниженими рівнями PGRN в головному мозку пацієнта.

У додатковому аспекті цей винахід відноситься до способу попередження або лікування захворювання, що асоціюється із зниженими рівнями PGRN в головному мозку пацієнта, який включає введення ефективної дози антитіла за цим винаходом або його антигензв'язувального фрагмента.

Переважно, що в цих застосуваннях і способах за даними аспектами цього винаходу захворювання являють собою FTD; ALS або протеїнопатії TDP43, як, наприклад, AD.

Переважно, в цих застосуваннях і способах за даними аспектами цього винаходу лікування є тривалим і переважно здійснюється щонайменше протягом 2 тижнів, наприклад, щонайменше протягом 1 місяця, 6 місяців, 1 року або довше.

У додатковому аспекті цей винахід передбачає набір, який містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за цим винаходом.

Послідовності антитіл

Ab 5E1		
Seq ID No:	1	CDR1 легкого ланцюга 5E1
Seq ID No:	2	CDR2 легкого ланцюга 5E1
Seq ID No:	3	CDR3 легкого ланцюга 5E1
Seq ID No:	4	CDR1 важкого ланцюга 5E1
Seq ID No:	5	CDR2 важкого ланцюга 5E1
Seq ID No:	6	CDR3 важкого ланцюга 5E1
Seq ID No:	7	VL 5E1
Seq ID No:	8	VH 5E1
Ab 1F2		
Seq ID No:	9	CDR1 легкого ланцюга 1F2
Seq ID No:	10	CDR2 легкого ланцюга 1F2
Seq ID No:	11	CDR3 легкого ланцюга 1F2
Seq ID No:	12	CDR1 важкого ланцюга 1F2
Seq ID No:	13	CDR2 важкого ланцюга 1F2
Seq ID No:	14	CDR3 важкого ланцюга 1F2
Seq ID No:	15	VL 1F2
Seq ID No:	16	VH 1F2
Ab 068		
Seq ID No:	17	CDR1 легкого ланцюга 068
Seq ID No:	18	CDR2 легкого ланцюга 068
Seq ID No:	19	CDR3 легкого ланцюга 068
Seq ID No:	20	CDR1 важкого ланцюга 068
Seq ID No:	21	CDR2 важкого ланцюга 068
Seq ID No:	22	CDR3 важкого ланцюга 068
Seq ID No:	23	VL 068
Seq ID No:	24	VH 068
Ab 1320		
Seq ID No:	25	CDR1 легкого ланцюга 1320
Seq ID No:	26	CDR2 легкого ланцюга 1320
Seq ID No:	27	CDR3 легкого ланцюга 1320
Seq ID No:	28	CDR1 важкого ланцюга 1320
Seq ID No:	29	CDR2 важкого ланцюга 1320
Seq ID No:	30	CDR3 важкого ланцюга 1320
Seq ID No:	31	VL 1320
Seq ID No:	32	VH 1320
Ab 93-05		
Seq ID No:	33	CDR1 легкого ланцюга 93-05
Seq ID No:	34	CDR2 легкого ланцюга 93-05
Seq ID No:	35	CDR3 легкого ланцюга 93-05
Seq ID No:	36	CDR1 важкого ланцюга 93-05
Seq ID No:	37	CDR2 важкого ланцюга 93-05
Seq ID No:	38	CDR3 важкого ланцюга 93-05
Seq ID No:	39	VL 93-05
Seq ID No:	40	VH 93-05
Ab 93-01		
Seq ID No:	41	CDR1 легкого ланцюга 93-01
Seq ID No:	42	CDR2 легкого ланцюга 93-01
Seq ID No:	43	CDR3 легкого ланцюга 93-01
Seq ID No:	44	CDR1 важкого ланцюга 93-01
Seq ID No:	45	CDR2 важкого ланцюга 93-01
Seq ID No:	46	CDR3 важкого ланцюга 93-01
Seq ID No:	47	VL 93-01
Seq ID No:	48	VH 93-01

Послідовності антитіл

Ab 924		
Seq ID No:	49	CDR1 легкого ланцюга 924
Seq ID No:	50	CDR2 легкого ланцюга 924
Seq ID No:	51	CDR3 легкого ланцюга 924
Seq ID No:	52	CDR1 важкого ланцюга 924
Seq ID No:	53	CDR2 важкого ланцюга 924
Seq ID No:	54	CDR3 важкого ланцюга 924
Seq ID No:	55	VL 924
Seq ID No:	56	VH 924
Ab 1276		
Seq ID No:	57	CDR1 легкого ланцюга 1276
Seq ID No:	58	CDR2 легкого ланцюга 1276
Seq ID No:	59	CDR3 легкого ланцюга 1276
Seq ID No:	60	CDR1 важкого ланцюга 1276
Seq ID No:	61	CDR2 важкого ланцюга 1276
Seq ID No:	62	CDR3 важкого ланцюга 1276
Seq ID No:	63	VL 1276
Seq ID No:	64	VH 1276
Ab 849		
Seq ID No:	65	CDR1 легкого ланцюга 849
Seq ID No:	66	CDR2 легкого ланцюга 849
Seq ID No:	67	CDR3 легкого ланцюга 849
Seq ID No:	68	CDR1 важкого ланцюга 849
Seq ID No:	69	CDR2 важкого ланцюга 849
Seq ID No:	70	CDR3 важкого ланцюга 849
Seq ID No:	71	VL 849
Seq ID No:	72	VH 849
Ab 531-02		
Seq ID No:	73	CDR1 легкого ланцюга 531-02
Seq ID No:	74	CDR2 легкого ланцюга 531-02
Seq ID No:	75	CDR3 легкого ланцюга 531-02
Seq ID No:	76	CDR1 важкого ланцюга 531-02
Seq ID No:	77	CDR2 важкого ланцюга 531-02
Seq ID No:	78	CDR3 важкого ланцюга 531-02
Seq ID No:	79	VL 531-02
Seq ID No:	80	VH 531-02
Ab 548-01		
Seq ID No:	81	CDR1 легкого ланцюга 548-01
Seq ID No:	82	CDR2 легкого ланцюга 548-01
Seq ID No:	83	CDR3 легкого ланцюга 548-01
Seq ID No:	84	CDR1 важкого ланцюга 548-01
Seq ID No:	85	CDR2 важкого ланцюга 548-01
Seq ID No:	86	CDR3 важкого ланцюга 548-01
Seq ID No:	87	VL 548-01
Seq ID No:	88	VH 548-01
Ab 548-02		
Seq ID No:	89	CDR1 легкого ланцюга 548-02
Seq ID No:	90	CDR2 легкого ланцюга 548-02
Seq ID No:	91	CDR3 легкого ланцюга 548-02
Seq ID No:	92	CDR1 важкого ланцюга 548-02
Seq ID No:	93	CDR2 важкого ланцюга 548-02
Seq ID No:	94	CDR3 важкого ланцюга 548-02
Seq ID No:	95	VL 548-02
Seq ID No:	96	VH 548-02

Послідовності антитіл

Ab1289-02		
Seq ID No:	97	CDR1 легкого ланцюга 1289-02
Seq ID No:	98	CDR2 легкого ланцюга 1289-02
Seq ID No:	99	CDR3 легкого ланцюга 1289-02
Seq ID No:	100	CDR1 важкого ланцюга 1289-02
Seq ID No:	101	CDR2 важкого ланцюга 1289-02
Seq ID No:	102	CDR3 важкого ланцюга 1289-02
Seq ID No:	103	VL 1289-02
Seq ID No:	104	VH 1289-02
Ab 811-02		
Seq ID No:	105	CDR1 легкого ланцюга 811-02
Seq ID No:	106	CDR2 легкого ланцюга 811-02
Seq ID No:	107	CDR3 легкого ланцюга 811-02
Seq ID No:	108	CDR1 важкого ланцюга 811-02
Seq ID No:	109	CDR2 важкого ланцюга 811-02
Seq ID No:	110	CDR3 важкого ланцюга 811-02
Seq ID No:	111	VL 811-02
Seq ID No:	112	VH 811-02
Ab 566-01		
Seq ID No:	113	CDR1 легкого ланцюга 566-01
Seq ID No:	114	CDR2 легкого ланцюга 566-01
Seq ID No:	115	CDR3 легкого ланцюга 566-01
Seq ID No:	116	CDR1 важкого ланцюга 566-01
Seq ID No:	117	CDR2 важкого ланцюга 566-01
Seq ID No:	118	CDR3 важкого ланцюга 566-01
Seq ID No:	119	VL 566-01
Seq ID No:	120	VH 566-01
Ab 562		
Seq ID No:	121	CDR1 легкого ланцюга 562
Seq ID No:	122	CDR2 легкого ланцюга 562
Seq ID No:	123	CDR3 легкого ланцюга 562
Seq ID No:	124	CDR1 важкого ланцюга 562
Seq ID No:	125	CDR2 важкого ланцюга 562
Seq ID No:	126	CDR3 важкого ланцюга 562
Seq ID No:	127	VL 562
Seq ID No:	128	VH 562
Ab 193		
Seq ID No:	129	CDR1 легкого ланцюга 193
Seq ID No:	130	CDR2 легкого ланцюга 193
Seq ID No:	131	CDR3 легкого ланцюга 193
Seq ID No:	132	CDR1 важкого ланцюга 193
Seq ID No:	133	CDR2 важкого ланцюга 193
Seq ID No:	134	CDR3 важкого ланцюга 193
Seq ID No:	135	VL 193
Seq ID No:	136	VH 193
Ab 88		
Seq ID No:	137	CDR1 легкого ланцюга 88
Seq ID No:	138	CDR2 легкого ланцюга 88
Seq ID No:	139	CDR3 легкого ланцюга 88
Seq ID No:	140	CDR1 важкого ланцюга 88
Seq ID No:	141	CDR2 важкого ланцюга 88
Seq ID No:	142	CDR3 важкого ланцюга 88
Seq ID No:	143	VL 88
Seq ID No:	144	VH 88

Послідовності антитіл

Ab 045		
Seq ID No:	145	CDR1 легкого ланцюга 045
Seq ID No:	146	CDR2 легкого ланцюга 045
Seq ID No:	147	CDR3 легкого ланцюга 045
Seq ID No:	148	CDR1 важкого ланцюга 045
Seq ID No:	149	CDR2 важкого ланцюга 045
Seq ID No:	150	CDR3 важкого ланцюга 045
Seq ID No:	151	VL 045
Seq ID No:	152	VH 045
Ab 044		
Seq ID No:	153	CDR1 легкого ланцюга 044
Seq ID No:	154	CDR2 легкого ланцюга 044
Seq ID No:	155	CDR3 легкого ланцюга 044
Seq ID No:	156	CDR1 важкого ланцюга 044
Seq ID No:	157	CDR2 важкого ланцюга 044
Seq ID No:	158	CDR3 важкого ланцюга 044
Seq ID No:	159	VL 044
Seq ID No:	160	VH 044
Ab 002		
Seq ID No:	161	CDR1 легкого ланцюга 002
Seq ID No:	162	CDR2 легкого ланцюга 002
Seq ID No:	163	CDR3 легкого ланцюга 002
Seq ID No:	164	CDR1 важкого ланцюга 002
Seq ID No:	165	CDR2 важкого ланцюга 002
Seq ID No:	166	CDR3 важкого ланцюга 002
Seq ID No:	167	VL 002
Seq ID No:	168	VH 002
Seq ID No:	169	Повна людська послідовність сортиліну ізоформи 1
Seq ID No:	170	"Ділянка D", ідентифікована в цьому винаході
Seq ID No:	171	Сортилін "hSORTECDBAP"
Seq ID No:	172	Сортилін SORTECDBAP_hBACK
Seq ID No:	173	Сортилін SORTECDBAP_tetra
Seq ID No:	174	Сортилін SORTECDBAP_hB01-05
Seq ID No:	175	Сортилін SORTECDBAP_hRIM
Seq ID No:	176	Сортилін SORTECDBAP_hB06-10
Seq ID No:	177	Сортилін SORTECDBAP_hB12390
Seq ID No:	178	Сортилін SORTECDBAP_hB45678
Seq ID No:	179	Сортилін SORTECD_HIS
Seq ID No:	180	"Ділянка A", ідентифікована в цьому винаході
Seq ID No:	181	109-114 ділянки A
Seq ID No:	182	126-153 ділянки A
Seq ID No:	183	126-144 ділянки A
Seq ID No:	184	154-159 ділянки A
Seq ID No:	185	570-572 ділянки D
Seq ID No:	186	588-597 ділянки D
Seq ID No:	187	593-597 ділянки D
Seq ID No:	188	Послідовності, що застосовуються для HDX

5 Перелічення або обговорення в даному описі документа, очевидно опублікованого раніше, не обов'язково повинні розглядатися як підтвердження того, що документ є частиною рівня техніки або загальнодоступними відомостями.

ВАРІАНТИ ЗДІЙСНЕННЯ

Як буде очевидно з тексту і прикладів, цей винахід додатково відноситься до наведених нижче варіантів здійснення.

1. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, здатні специфічно зв'язуватися з

сортиліном і пригнічувати зв'язування PGRN з сортиліном.

2. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 1, де антитіло містить інтактне антитіло або складається з нього.

3. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 1 або 2, де антигензв'язувальний фрагмент містить антигензв'язувальний фрагмент, вибраний з групи, що складається з Fv-фрагмента (наприклад, одноланцюгового Fv або зв'язаного дисульфідним зв'язком Fv); Fab-подібного фрагмента (наприклад, Fab-фрагмента або F(ab')₂-фрагмента) і доменного антитіла (наприклад, окремого варіабельного домену V_H або варіабельного домену V_L), або складається з нього.

4. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де антитіло вибрано з групи, що складається з антитіла підтипу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.

5. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де вказані антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент специфічно зв'язуються з ділянкою D сортиліну, визначеною в SEQ ID NO:170.

6. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де вказані антитіло або його фрагмент специфічно зв'язуються щонайменше з 3 послідовними амінокислотами, як, наприклад, 4, 5, 6 або 7 послідовними амінокислотами, ділянки D сортиліну, визначеної в SEQ ID NO:170.

7. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де антитіло або антигензв'язувальний фрагмент проявляють одне або декілька з наступних властивостей:

(i) афінність зв'язування (K_D) з сортиліном, що становить 0,5-10 нМ, як, наприклад, 1-5 нМ або 1-2 нМ;

(ii) здатність знижувати і/або пригнічувати зв'язування PGRN з сортиліном;

(iii) здатність знижувати і/або пригнічувати виведення PGRN клітинами, що експресують сортилін;

(iv) здатність знижувати і/або пригнічувати ендоцитоз PGRN клітинами, що експресують сортилін;

(v) здатність підвищувати кількість і/або концентрацію PGRN в плазмі крові у мишей з нокіном, за рахунок якого у них експресується сортилін людини.

8. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 7, де здатність антитіла або його фрагмента знижувати зв'язування PGRN з сортиліном передбачає зниження зв'язування PGRN з сортиліном на 10 % або більше; наприклад, на 20 % або більше або на 30 % або більше.

9. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 7 або 8, де здатність вказаних антитіла або його фрагмента антитіла або його фрагмента знижувати і/або пригнічувати зв'язування PGRN з сортиліном передбачає зниження і/або пригнічення зв'язування PGRN з сортиліном при IC₅₀, що становить 22 нМ або менше, як, наприклад, від 22 нМ до 1 нМ, або від 10 нМ до 1 нМ, або від 5 нМ до 1 нМ.

10. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент є людськими або гуманізованими.

11. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, що містить одну або декілька CDR 1-3 легкого ланцюга, які перелічені для кожного з антитіл, визначених в таблиці 5, або амінокислотну послідовність, що має не більше 4 відмінностей в амінокислотах, або не більше 3 відмінностей в амінокислотах, або не більше 2 відмінностей в амінокислотах, або не більше 1 відмінності в амінокислотах.

12. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 11, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, що містить CDR 1-3 легкого ланцюга, які перелічені для кожного з антитіл, визначених в таблиці 5.

13. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 11 або 12, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність VL, вказану для кожного з антитіл, визначених в таблиці 5, або що складається з неї.

14. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 11-13, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність VL, вказану для кожного з антитіл, визначених в таблиці 5, або що складається з неї.

15. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх

варіантів здійснення, що містять варіабельний домен важкого ланцюга, що містить одну або декілька CDR 1-3 важкого ланцюга, які перелічені для кожного з антитіл, визначених в таблиці 5, або амінокислотну послідовність, що має не більше 4 відмінностей в амінокислотах, або не більше 3 відмінностей в амінокислотах, або не більше 2 відмінностей в амінокислотах, або не більше 1 відмінності в амінокислотах.

16. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 15, що містять варіабельний домен важкого ланцюга, що містить CDR 1-3 важкого ланцюга, які перелічені для кожного з антитіл, визначених в таблиці 5.

17. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 15 або 16, що містять варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність VH, вказану для кожного з антитіл, визначених в таблиці 5, або що складається з неї.

18. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 15-17, що містять важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність VL, вказану для кожного з антитіл, визначених в таблиці 5, або що складається з неї.

19. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність VL, вказану для кожного з антитіл, визначених в таблиці 5, або що складається з неї, і варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність VH, вказану для кожного з антитіл, визначених в таблиці 5, або що складається з неї.

20. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність VL, вказану для кожного з антитіл, визначених в таблиці 5, або що складається з неї, і важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність VH, вказану для кожного з антитіл, визначених в таблиці 5, або що складається з неї.

21. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де вказані антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент конкурують з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, визначеними у варіанті здійснення 20, за зв'язування з сортиліном.

22. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де антитіло або антигензв'язувальний фрагмент містять Fc-ділянку.

23. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де антитіло або антигензв'язувальний фрагмент додатково містять компонент для збільшення періоду напівжиття *in vivo*.

24. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 22, де компонент для збільшення періоду напівжиття *in vivo* вибраний з групи, що складається з поліетиленгліколю (PEG), сироваткового альбуміну людини, глікозилуючих груп, жирних кислот і декстрану.

25. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де антитіло або антигензв'язувальний фрагмент додатково містять детектовний компонент.

26. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 25, де детектовний компонент, вибраний з групи, що складається з флуоресцентної мітки; хемілюмінесцентної мітки; парамагнітної мітки; радіоізотопної мітки або ферментної мітки.

27. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 25 або 26, де детектовний компонент містить радіоактивний ізотоп або складається з нього.

28. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 26 або 27, де радіоактивний ізотоп вибраний з групи, що складається з ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr , ^{123}I і ^{201}Tl .

29. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 25, де детектовний компонент містить парамагнітний ізотоп або складається з нього.

30. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 29, де парамагнітний ізотоп вибраний з групи, що складається з ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Cr і ^{56}Fe .

31. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 25-30, де детектовний компонент виявляється за допомогою методики візуалізації, такої як SPECT, PET, MRI, оптична або ультразвукова візуалізація.

32. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 25-31, де детектовний компонент опосередковано з'єднаний з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом за допомогою лінкерного компоненту.

33. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 32, де лінкерний компонент вибраний з групи, що складається з похідних 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраоцтової кислоти (DOTA); дефероксаміну (DFO); похідних діетилентріамінпентаоцтової кислоти (DTPA); похідних S-2-(4-ізотіоціанатобензил)-1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триоцтової кислоти (NOTA) і похідних 1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетраоцтової кислоти (TETA).

34. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, визначені в будь-якому з варіантів здійснення 1-33.

35. Молекула нуклеїнової кислоти відповідно до варіанта здійснення 34, де молекула є молекулою кДНК.

36. Вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, визначену у варіантах здійснення 34 або 35.

37. Рекомбінантна клітка-хазяїн, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, визначену в будь-якому з варіантів здійснення 34-36.

38. Спосіб отримання антитіла або антигензв'язувального фрагмента, визначених в будь-якому з варіантів здійснення 1-33, при цьому спосіб включає культивування клітини-хазяїна, визначеної у варіанті здійснення 37, в умовах, що забезпечують можливість експресії закодованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента.

39. Препарат, що містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де вказаний препарат практично не містить антитіл, що утворюються в природних умовах, які або не здатні зв'язуватися з сортиліном, або істотним чином не змінюють антисортилінові функціональні характеристики препарату, при цьому вказані функціональні характеристики вибрані з групи, що складається з

(i) афінності зв'язування (K_D) з сортиліном;

(ii) здатності знижувати і/або пригнічувати зв'язування PGRN з сортиліном;

(iii) здатності знижувати і/або пригнічувати виведення PGRN клітинами, що експресують сортилін;

(iv) здатності знижувати і/або пригнічувати ендоцитоз PGRN клітинами, що експресують сортилін;

(v) здатності підвищувати кількість і/або концентрацію PGRN в плазмі крові у мишей з нокіном, за рахунок якого у них експресується сортилін людини; і/або

(vi) здатності забезпечувати лікування лобно-скроневої деменції (FTD) і/або бічного аміотрофічного склерозу (ALS) при його тривалому введенні.

40. Препарат, що містить моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де вказане моноклональне антитіло має структурну зміну в своїй амінокислотній послідовності в порівнянні із структурою антитіла до сортиліну, що зустрічається в природі, де вказана структурна зміна обумовлює прояв вказаним моноклональним антитілом змінених функціональних характеристик в порівнянні з функціональними характеристиками, що проявляються вказаним антитілом до сортиліну, що зустрічається в природі, де вказані функціональні характеристики являють собою

(i) афінність зв'язування (K_D) з сортиліном;

(ii) здатність знижувати і/або пригнічувати зв'язування PGRN з сортиліном;

(iii) здатність знижувати і/або пригнічувати виведення PGRN клітинами, що експресують сортилін;

(iv) здатність знижувати і/або пригнічувати ендоцитоз PGRN клітинами, що експресують сортилін;

(v) здатність підвищувати кількість і/або концентрацію PGRN в плазмі крові у мишей з нокіном, за рахунок якого у них експресується сортилін людини; і/або

(vi) здатність забезпечувати лікування лобно-скроневої деменції (FTD) і/або бічного аміотрофічного склерозу (ALS) при його тривалому введенні.

41. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, визначені в будь-якому з варіантів здійснення 1-33, або препарат відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 39-40 і фармацевтично прийнятний носій.

42. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, визначені в будь-якому з варіантів здійснення 1-33, або препарат відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 39-40 для застосування в медицині.

43. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, визначені в будь-якому з варіантів здійснення 1-33, або препарат відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 39-40 для застосування при попередженні і/або лікуванні захворювання, що асоціюється із зниженими рівнями PGRN в головному мозку пацієнта.

44. Застосування антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, визначених в будь-якому з варіантів здійснення 1-33, або препарату відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 39-40 при виготовленні лікарського препарату для попередження і/або лікування захворювання, що асоціюється із зниженими рівнями PGRN в головному мозку пацієнта.

45. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент для застосування відповідно до варіанта здійснення 43 або застосування відповідно до варіанта здійснення 44, де захворювання вибране з групи, що складається з FTD; ALS; протеїнопатій TDP43, як, наприклад, AD.

46. Спосіб попередження або лікування захворювання, що асоціюється із зниженими рівнями PGRN в головному мозку пацієнта, який включає введення ефективної дози антитіла або його фрагмента, визначених в будь-якому з варіантів здійснення 1-33, препарату відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 39-40 або фармацевтичної композиції відповідно до варіанта здійснення 41.

47. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент для застосування відповідно до варіанта здійснення 43, або застосування відповідно до варіанта здійснення 44, або спосіб відповідно до варіанта здійснення 46, де захворювання вибране з групи, що складається з FTD; ALS або протеїнопатій TDP43, як, наприклад, AD.

48. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент для застосування; або застосування; або спосіб відповідно до варіанта здійснення 46 або 47, де лікування є тривалим.

49. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент для застосування; або застосування; або спосіб відповідно до варіанта здійснення 48, де тривале лікування продовжується протягом щонайменше 2 тижнів, як, наприклад, протягом щонайменше 1 місяця, 6 місяців, 1 року або довше.

50. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, визначені в будь-якому з варіантів здійснення 1-33, препарат відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 39-40 або фармацевтична композиція відповідно до варіанта здійснення 41, які здатні специфічно зв'язуватися з сортиліном і пригнічувати зв'язування PGRN з сортиліном, але при цьому їх зв'язування не пригнічує або по суті не пригнічує зв'язування нейротензину або AF38469 з сортиліном.

51. Набір, який містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, визначені в будь-якому з варіантів здійснення 1-33, препарат, визначений в будь-якому з варіантів здійснення 39-40, або фармацевтичну композицію, визначену у варіанті здійснення 41.

Переважні необмежувальні приклади, які утілюють певні аспекти цього винаходу, далі будуть описані з посиланням на фігури, що додаються.

ПРИКЛАДИ

У прикладах 1-3 описано отримання конструктів сортиліну.

У прикладі 1 розкриті конструкти, отримані перетасовуванням. У прикладі 2 розкрита експресія конструктів сортиліну. У прикладі 3 розкрито очищення конструктів сортиліну.

У прикладах 4-7 описано отримання антитіл до сортиліну.

У прикладі 4 розкриті імунізація і гібридоми. У прикладі 5 розкритий аналіз послідовностей. У прикладі 6 розкрито очищення антитіл. У прикладі 7 розкрито отримання антитіл миші.

У прикладах 8-17 описана характеристика антитіл до сортиліну

У прикладі 8 розкрито зв'язування сортиліну. У прикладі 9 розкрита здатність антитіл до сортиліну до перехресного блокування. У прикладі 10 розкритий HTRF, що проводиться відносно зв'язування PGRN-сортилін. У прикладі 11 розкрито зв'язування NTS. У прикладі 12 розкриті зв'язування PGRN клітинами і ендоцитоз. У прикладі 13 розкриті рівні позаклітинного PGRN. У прикладі 14 розкриті рівні PGRN в iPSC. У прикладі 15 розкриті рівні PGRN в плазмі крові. У прикладі 16 розкрито картування епітопів за допомогою HDX. У прикладі 17 розкритий мікродіаліз PGRN в головному мозку.

Приклад 1

Для застосування як в способі скринінгу гібридом, так і в розширенні панелі антитіл розробляли, конструювали і отримували так звані "конструкти, отримані перетасовуванням" з утворенням набору химерних молекул сортиліну, що містять амінокислотні послідовності, що походять як від сортиліну людини, так і сортиліну далекородинних видів (голкочеревні) із значно зниженим ступенем гомології послідовностей. Логічним обґрунтуванням для цього є те, що загальна структура сортиліну і функціональні характеристики цих химерних конструктів зберігатимуться, але при цьому втрата антитілами здатності зв'язуватися з певними химерними конструктами указуватиме на залучення до зв'язування конкретних ділянок, підданих заміні. Конструкти розчинної позаклітинної ділянки (ECD, aa 1-755) мітили або BAP-міткою (біотин-акцепторний пептид), що забезпечує можливість біотинілування білків "in vitro" за допомогою

сумісної експресії з біотин-лігазою, або His-міткою, що забезпечує можливість простого очищення. Отримували вектори експресії, що кодують наступні білки: SORT-ECDBAP, SORT-ECDBAP-hB01-05, SORT-ECDBAP-hB06-10, SORT-ECDBAP-hB12390, SORT-ECDBAP-hB45678, SORT-ECDBAP-tetra, SORT, SORT-tetra.

- 5 Послідовності сортиліну можна знайти в SEQ ID NO:169-180 і на фігурі 2, що показує схематичне представлення віднесення антитіл до ділянок на підставі зв'язування з конструкторами сортиліну, отриманими перетасовуванням.

Приклад 2

- 10 У разі експресії антитіла вектори, що кодують відповідний важкий ланцюг і легкий ланцюг, описані в прикладах 4, 5 і 6, спільно експресували в клітинах HEK-293F.

Приклад 3. Очищення сортиліну, міченого His

- 15 SORTECDHis експресували в клітинах HEK-293F. His-мітка в білках забезпечувала можливість очищення за допомогою афінної хроматографії на іммобілізованому металі. У цьому способі картридж NiNTA Superflow (Qiagen) врівноважували за допомогою 50 mM NaN_2PO_4 , 300 mM NaCl і 10 mM імідазолу, pH 8,0. У колонку завантажували білок, мічений His, при цьому час витримання складав 1 хвилину. Колонку промивали за допомогою 50 mM NaN_2PO_4 , 300 mM NaCl і 20 mM імідазолу, pH 8,0. Білок елюювали за допомогою 50 mM NaN_2PO_4 , 300 mM NaCl і 250 mM імідазолу, pH 8,0. Потім білок піддавали діалізу в PBS із застосуванням Slide-A-Lyzer з відсіканням за молекулярною масою 10000 Да (Thermo Scientific). Після виконання діалізу білок 20 піддавали стерилізуючій фільтрації із застосуванням фільтру SFCA з розміром пор 0,2 мікрона (Thermo Scientific).

- Лінію клітин S18-HEK отримували шляхом трансфекції клітин HEK293 вектором експресії сортиліну людини дикого типу (WT). Стабільно трансфектовані клітини отримували після здійснення пасажу у присутності засобу селекції. Окремі клони відбирали за допомогою клонування методом розведень. Клоні характеризували стосовно експресії мРНК сортиліну із застосуванням QPCR. Клоні з найбільш високими рівнями експресії потім аналізували за допомогою FACS (Guava, Millipore) із застосуванням поліклонального антитіла до сортиліну (поліклонального козячого біотинізованого Ab до сортиліну № за кат.: BAF2934 (R&D Systems)) для визначення рівнів поверхневої експресії сортиліну.

- 30 Приклад 4

А. Процедура імунізації трансгенних мишей

- Антитіла HuMAb до сортиліну отримували шляхом імунізації мишей ліній HCo12, HCo17, HCo20, HCo12-BALB/c, HCo17-BALB/c і HCo20-BALB/c за допомогою HuMAb (моноклонального антитіла людини; Medarex Inc., Сан-Хосе, Каліфорнія, США). Ці миші характеризуються 35 подвійним нокаутом по генам важкого ланцюга і легкого каппа-ланцюга мишачого імуноглобуліну (Ig), що в значній мірі інактивує експресію антитіл, що є повністю мишачими. Різні лінії мишей робили трансгенними шляхом вставки локусів, що кодують важкий ланцюг Ig людини, і локусів, що кодують легкий каппа-ланцюг Ig людини, і вони відрізнялися за кількістю людських генів VH (варіабельного домену важкого ланцюга) і VL (варіабельного домену легкого ланцюга). Мишей HCo12-BALB/c отримували шляхом перехресного схрещування з мишами 40 KCo5-BALB/c (з трансгеном, що кодує легкий каппа-ланцюг).

48 мишей імунізували по черзі інтраперитонеально (IP) за допомогою 20 мкг SORTECDHis (SEQ ID NO: 179) і підшкірно (SC, в основу хвоста) тим же білком з інтервалом в 14 днів. Здійснювали максимум вісім імунізацій: 4 IP і 4 SC.

- 45 Згідно з одним протоколом першу імунізацію проводили за допомогою SORTECDHis в повному ад'юванті Фрейнда (CFA, Difco Laboratories, Детройт, Мічиган, США), наступні імунізації - в неповному ад'юванті Фрейнда (IFA). Згідно з другим протоколом застосовували SAS як ад'ювант на всіх стадіях імунізації. Після виявлення, що сироваткові титри є достатніми (розведення сироватки крові 1/50 або нижче давало позитивний результат в скринінговому аналізі, специфічному стосовно антигену, щонайменше в двох послідовних подіях скринінгу, що 50 проводяться двічі на тиждень), мишей додатково двічі стимулювали внутрішньо (IV) за допомогою 10 мкг білка SORTECDHis в 100 мкл PBS, за чотири і три дні до злиття.

В. Отримання HuMAb-гібридами

- 55 Мишей HuMAb з виробленням достатнього антигенспецифічного титру, як визначено вище, убивали і брали селезінку і лімфатичні вузли, прилеглі до черевної аорти і порожнистої вени. Злиття спленоцитів і клітин лімфатичних вузлів з клітинною лінією мишачої мієломи проводили шляхом електрозлиття із застосуванням системи для електрозлиття CEEF 50 (Cyto Pulse Sciences, Глен Берні, Меріленд, США), по суті, відповідно до інструкцій виробника. Злиті клітини висівали в середовище для культивування злитих клітин, що містить 10 % бичачої сироватки 60 FetalClone I (Perbio), 1 mM пірувату натрію (Cambrex), 0,5 од./мл пеніциліну, 0,5 од./мл

стрептомицину (Cambrex), 50 мкМ 2-меркаптоетанолу (Invitrogen), 600 нг/мл інтерлейкіну 6 (IL-6) (Strathmann), 1 x HAT (Sigma) і 0,5 мг/мл канаміцину (Invitrogen) в HyQ mADCF-Mab (Perbio). Через десять днів збирали супернатант і клітини оновлювали середовищем для збору, що містить 10 % бичачої сироватки FetalClone I, 0,5 од./мл пеніциліну, 0,5 од./мл стрептомицину, 600 нг/мл IL-6 і 1 x proHT (Cambrex) в HyQ mADCF-Mab. Супернатанти культур гібридами піддавали скринінгу за допомогою первинних скринінгових аналізів і гранул стрептавідину, зв'язаного з SORTECDBAP (SEQ ID NO: 171), SORTECDBAPhB06-10 (SEQ ID NO: 176), SORTECDBAPhB12390 (SEQ ID NO: 177), для виявлення гібридом, що продукують людські (або химерні) антитіла до сортиліну. Клітини гібридами з визначених в ході первинного скринінгу лунок з найкращим результатом висівали в напівтверде середовище, виготовлене з 40 % CloneMedia (Genetix, Гемпшир, Великобританія) і 60 % повного середовища HyQ 2x (Hyclone, Волтем, США). У разі кожної лунки з первинного скринінгу її вміст висівали в лунку 6-лункового чорного планшета Genetix. З кожної лунки відбирали 25 субклонів за допомогою системи ClonePix (Genetix). Субклони відбирали в середовище для збору. Через сім днів супернатанти субклонів знову піддавали скринінгу відносно специфічного до сортиліну зв'язування IgG людини і вимірювали концентрацію IgG людини із застосуванням платформи Octet 384red (Fortebio, Менло-Парк, США). З кожної лунки первинного скринінгу вибирали найкращий субклон і розмножували його в середовищі для розмноження, що містить тільки 600 нг/мл IL-6, 0,5 од./мл пеніциліну, 0,5 од./мл стрептомицину і 1 x proHT. Субклони розмножували в наступному порядку: одна лунка 96-лункового планшета - одна лунка 24-лункового планшета - чотири лунки 24-лункового планшета - шість лунок 6-лункового планшета. Клони, отримані в результаті цього процесу, були позначені як первинні клони (PC).

Антитіла HuMab до сортиліну за цим винаходом ідентифікували і піддавали аналізу послідовностей.

Приклад 5. Аналіз послідовностей специфічних стосовно сортиліну варіабельних доменів HuMab і клонування у вектори експресії

З 0,2-5 × 10⁶ клітин гібридами отримували загальну РНК і з 100 нг загальної РНК отримували 5'-RACE-комплементарну ДНК (кДНК) за допомогою набору для ампліфікації кДНК SMART RACE (Clontech) відповідно до інструкцій виробника. Ділянки, що кодують VH і VL, ампліфікували за допомогою ПЛР і безпосередньо клонували, в рамці зчитування, у вектори експресії p33G1f і p33Карра (що містять послідовності, що кодують константні домени IgG1 людини/каппа) шляхом незалежного від лігування клонування (Aslanidis, C. and PJ de Jong, Nucleic Acids Res 1990; 18 (20): 6069-74). Для кожного антитіла секвенували 16 клонів VL і 16 клонів VH. Для додаткового вивчення і експресії відбирали клони з коректною відкритою рамкою зчитування (ORF). Здійснювали сумісну транзйентну експресію векторів всіх комбінацій важких ланцюгів і легких ланцюгів в клітинах FreestyleTM 293-F з використанням 293fectin.

Отримані в результаті послідовності показані в даному описі в переліку послідовностей (SEQ ID NO:1-168). Послідовності CDR визначали відповідно до виданого керівництва.

Приклад 6. Очищення антитіл

Супернатант культури фільтрували через тупикові фільтри з розміром пор 0,2 мкм, завантажували у 5 мл колонки з білком А (rProtein A FF, Amersham Bioscience) і елюювали за допомогою 0,1 М лимонної кислоти-NaOH, pH 3. Елюат негайно нейтралізували за допомогою 2 М Tris-HCl, pH 9, і піддавали діалізу в 12,6 мМ NaH₂PO₄, 140 мМ NaCl, pH 7,4 (B.Braun), О/Н (протягом ночі). Після діалізу зразки піддавали стерилізуючій фільтрації через тупикові фільтри з розміром пор 0,2 мкм. Чистоту визначали за допомогою SDS-PAGE, а концентрацію вимірювали за допомогою нефелометрії і поглинання при 280 нм. Очищені антитіла розділяли на аліквоти і зберігали при -80 °С. Після розморожування аліквоти очищених антитіл витримували при 4 °С. Мас-спектрометрію проводили для ідентифікації молекулярної маси важкого і легкого ланцюгів антитіла, що експресувалися гібридомами.

Приклад 7. Отримання антитіл миші (1F2 і 5E1)

Імуноген

Синтетичний ген, що кодує химерний імуноген hSortilin-FC, (AA сортиліну людини (78-756) з SEQ ID NO:169 і AA IgG1-FC людини (104-330) з SEQ ID NO:169), клонували в pcDNA3.1 і використовували для експресії із застосуванням системи freestyle від Invitrogen. Антиген очищали з супернатантів культури клітин за допомогою афінної хроматографії на білку А із застосуванням стандартних процедур очищення антитіл, описаних вище для антитіл людини.

Отримання гібридами

hSortilin-FC застосовували як імуноген і ним імунізували 5 мишей BALB/c. Мишей із задовільною імунною відповіддю вибирали для злиття клітин і отримання гібридами. Супернатанти гібридом піддавали скринінгу за допомогою ELISA із застосуванням hSortilin-ECD

як покриваючого антигену. В цілому отримували вісімнадцять ліній клітин-гібридом, що походять з дев'яти початкових клонів.

Експресія

Гібридами спочатку вирощували в повному середовищі для вирощування, DMEM з 10 % FBS+антибіотики, і потім забезпечували адаптацію до середовища CDhybridoma (Invitrogen) для проведення експериментів з експресії.

Очищення

Моноклональні антитіла миші очищали з супернатантів культури клітин гібридами на сефарозі з білком G відповідно до стандартних процедур, рекомендованих постачальником (GE healthcare).

Приклад 8. Афінність специфічних стосовно сортиліну HuMab і антитіл миші до рекомбінантної позаклітинної ділянки сортиліну

Кінетику зв'язування антитіл HuMab до сортиліну з сортиліном визначали із застосуванням Octet 384RED (ForteBio, Менло-Парк, США). Розчини HuMab з концентрацією 2 мкг/мл отримували шляхом розведення в розріджувачі зразків (ForteBio, арт. № 18-5028). Чутливі до білка A сенсори (ForteBio, арт. № 18-0004) заздалегідь змочували буфером для дослідження кінетики (1:10 розріджувача зразків в PBS) протягом щонайменше 600 секунд. Потім на сенсори іммобілізували розчин HuMab протягом 600 секунд. Відповідь на початковому рівні отримували шляхом занурення в буфер для дослідження кінетики на 120 секунд. Асоціацію з конструктами SORTECD забезпечували шляхом інкубації протягом 1000 секунд. Після цього забезпечували дисоціацію в буфері для дослідження кінетики протягом 100 секунд. Після дисоціації сенсори відновлювали (10 мМ гліцину, pH 1,0) і нейтралізували (буфер для дослідження кінетики) 3 рази протягом 5 секунд. Всі HuMab аналізували з використанням чотирьох концентрацій конструктів SORTECD (10, 5, 2,5 і 1,25 мкг/мл). Молекулярну масу, що становить 76,8 кДа, використовували для SORTECDHis. Дані апроксимували за допомогою програмного забезпечення ForteBio Analysis 6.4, використовуючи глобальну загальну апроксимацію. Результати показані на фігурі 3 і фігурі 4.

Приклад 9. Перехресне блокування HuMab до сортиліну антитілами

Дослідження з перехресного блокування антитілами проводили із застосуванням Octet 384RED (ForteBio, Менло-Парк, США). Розчини антитіл HuMab з концентрацією 2 мкг/мл отримували шляхом розведення в розріджувачі зразків (ForteBio, арт. № 18-5028). Чутливі до аміногруп сенсори (ForteBio, арт. № 18-0008) використовували для іммобілізації HuMab. Перед зв'язуванням з чутливими до аміногруп сенсорами HuMab розводили в буфері MES, pH 6,0 (18-5027). Зв'язування здійснювали при 30 °C і 1000 об./хв. таким чином. Чутливі до аміногруп сенсори заздалегідь змочували в PBS і потім активували за допомогою розчину для активації EDC/NHS (ForteBio, арт. № 18-1033/18-1034) (відповідно до інструкції виробника) протягом 300 секунд. На активовані сенсори іммобілізували HuMab протягом 600 секунд. Іммобілізовані сенсори блокували етаноламіном (ForteBio № за кат. 18-1039) для усунення залишкової реактивності стосовно аміногруп. Після блокування сенсори поміщали в PBS до застосування. Аналіз перехресного блокування починали з встановлення відповіді на початковому рівні при 30 °C і 1000 об./хв. Відповідь на початковому рівні отримували шляхом занурення в розріджувач зразка на 120 секунд. Асоціацію з SORTECDHis забезпечували протягом 300 секунд, безпосередньо після чого забезпечували асоціацію з HuMab протягом 300 секунд. Після асоціації з HuMab сенсори відновлювали (10 мМ гліцину, pH 1,0) і нейтралізували (розріджувач зразків) 3 рази протягом 5 секунд. Дані обробляли із застосуванням програмного забезпечення ForteBio Analysis 6.4.

Антитіла групували на підставі їх профілів зв'язування з різними конструктами сортиліну, отриманими перетасовуванням (фігура 2, фігура 3 і фігура 4). Для підтвердження того, що всі антитіла, відповідні ділянці D (і ділянці F), зв'язуються з однією й тією ж ділянкою в ECD сортиліну людини дикого типу, їх здатність блокувати зв'язування один одного з ECD сортиліну людини дикого типу характеризували в дослідженні перехресного блокування із застосуванням Octet384 red. Наприклад, при тестуванні антитіл, відповідних одній і тій же ділянці, первинне антитіло блокуватиме зв'язування вторинного антитіла і навпаки. Тоді як при тестуванні антитіл, відповідних різним ділянкам, перехресне блокування не відбуватиметься, оскільки тільки одна ділянка блокується первинним антитілом, а решта ділянок доступна для зв'язування з вторинним антитілом. На фігурі 7 показано, що всі антитіла до ділянки D і D+ перехресно блокували один одного, що підтверджує визначення антитіл в клас відповідності ділянки D і D+ на підставі конструктів, отриманих перетасовуванням. Крім того, ці дані також підтверджують, що у химерних конструктів сортиліну зберігається схожість з ECD нативного сортиліну людини дикого типу.

Приклад 10. Характеристика зв'язування сортиліну з лігандом PGRN у присутності антитіл до сортиліну

Значення IC₅₀ для антитіл визначали шляхом вимірювання зсуву зв'язування PGRN з сортиліном за допомогою флуоресцентного аналізу з розрізненням за часом (HTRF, CisBio), див. фігуру 5 і фігуру 6.

Експерименти проводили в буфері для аналізу (50 мМ фосфату, pH 7,0, 0,1 % BSA) в загальному об'ємі 20 мкл в 384-лунковому білому малооб'ємному титраційному мікропланшеті від Greiner (784075, Greiner).

Антитіла заздалегідь інкубували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі з 50 нМ HIS-міченого ECD сортиліну і 4 нМ PGRN (SULU20110924) перед додаванням 7 нМ антитіла до 6HIS-d2 і 0,7 нМ антитіла до PGRN-криплат Eu (Cisbio), розведеного в буфері для кон'югату (50 мМ фосфату, pH 7,0, 0,8 мМ KF, 0,1 % BSA). 20 мкМ нейротензину використовували як позитивний контроль, а DMSO в буфері використовували як негативний контроль.

Аналітичний планшет інкубували протягом 60 хвилин при кімнатній температурі і протягом ночі при 4 °C перед зчитуванням планшета на зчитувачі EnVision (Perkin Elmer).

Проби неміченого нейротензину і DMSO використовували відповідно як позитивний і негативний контроль для постановки аналізу. Оцінку залежності доза-відповідь для антитіл проводили з використанням десяти концентрацій в діапазоні від 1 мкМ до 50 пМ за кривою 3-кратного розведення.

Значення концентрації напівмаксимального пригнічення (IC₅₀) розраховували за допомогою нелінійної регресії з використанням сигмоїдальної кривої концентрація-відповідь (із змінною крутизною) в XLfit 4 (IDBS, Великобританія) (фігури 5 і 6).

Приклад 11. Характеристика зв'язування сортилін – нейротензин у присутності антитіл до сортиліну

Значення IC₅₀ для специфічної стосовно сортиліну сполуки AF38469 (Schröder et al, Bioorg Med Chem Lett. 2014 Jan 1;24(1):177-80, 2014) визначали шляхом вимірювання зсуву зв'язування ³H-нейротензину з сортиліном із застосуванням сцинтиляційного аналізу зближення (SPA).

Експерименти проводили в буфері для аналізу (50 мМ HEPES, pH 7,4, 100 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween-20) в загальному об'ємі 40 мкл в 384-лунковому білому непрозорому планшеті Optiplat (6007299, Perkin Elmer).

150 нМ HIS-міченого сортиліну заздалегідь інкубували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі з 1 мкМ специфічного стосовно сортиліну антитіла (IgG1-6003-045 або IgG1-6003-068) або без нього або з ізотипічним контролем, що представляє собою IgG1 людини, перед додаванням розчинів білка в лунки, що містять AF38469 в серії концентрацій від 50 мкМ до 2,5 нМ. Суміш інкубували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі на шейкері перед додаванням 5 нМ ³H-нейротензину і гранул, покритих хелатом Ni, для візуалізації (RPNQ0266, Perkin Elmer). Аналізовану суміш додатково інкубували протягом 60 хвилин за тих же умов.

Через 6 годин планшет зчитували на ViewLux (час експозиції 360 с). Проби неміченого нейротензину і DMSO використовували, відповідно, як позитивний і негативний контроль.

Оцінку залежності доза-відповідь для AF38469 проводили з використанням десяти концентрацій в діапазоні від 50 мкМ до 2,5 нМ за кривою 3-кратного розведення. Значення концентрації напівмаксимального пригнічення (IC₅₀) розраховували за допомогою нелінійної регресії з використанням сигмоїдальної кривої концентрація-відповідь (із змінною крутизною) в XLfit 4 (IDBS, Великобританія). Результати можна побачити на фігурі 8.

Приклад 12. Характеристика зв'язування сортиліну з лігандом PGRN на поверхні клітин у присутності антитіл до сортиліну

У цьому аналізі використовували як клітини, транз'єнтно трансфектовані сортиліном, так і стабільну лінію клітин S18-HEK (клітини HEK, що надмірно експресують сортилін людини). Клітини трипсинізували і висівали при щільності 42000 клітин на лунку в 96-лунковий планшет. У разі транз'єнтно трансфектованих клітин клітини висівали в 96-лункові планшети через 24 години після трансфекції. Наступного дня середовище повністю замінювали і до клітин додавали розведені в середовищі випробовувані сполуки на 30 хвилин з подальшим додаванням PGRN на 4 години. В кінці дослідження (через 4,5 години) клітини фіксували і забарвлювали для виявлення PGRN. Всі планшети, піддані забарвлюванню, аналізували за допомогою Cellomics Array Scan (Thermo Fischer) і середню інтенсивність забарвлення за PGRN/клітина/лунка використовували для аналізу.

Використовуваний в аналізі PGRN збирали з середовища після транз'єнтної трансфекції клітин HEK 293 плазмідами, що експресують PGRN. Рівні PGRN вимірювали із застосуванням набору ELISA для PGRN (R&D).

Доданий до клітин PGRN легко зв'язувався і піддавався ендоцитозу, що приводило до підвищеного сигналу флуоресценції в лунках з клітинами, трансфектованими сортиліном. Додаванню нейротензину запобігало зв'язування сортиліну з PGRN і інтенсивність флуоресценції PGRN була аналогічною контрольним рівням, указуючи на те, що PGRN не зв'язувався і не піддавався ендоцитозу у присутності нейротензину.

Обидва HumAb до сортиліну (45 і 68) перешкоджали поглинанню PGRN з аналогічною нейротензину ефективністю. Ізотипічне контрольне антитіло B12 не надавало ніякого ефекту стосовно ендоцитозу або зв'язування PGRN. Результати можна побачити на фігурі 9.

Приклад 13. Вплив антитіл на рівні позаклітинного PGRN

Було виявлено, що як клітини HEK293, так і клітини S18-HEK безперервно секретують PGRN в середовище без будь-якої стимуляції.

Антитіла і контрольні засоби додавали до клітин S18-HEK для оцінки впливу на рівень PGRN. Додавання нейротензину, відомого пептидного ліганду сортиліну, або антитіл 45, 68 і 811 людини до клітин S18-HEK приводило до підвищення рівня PGRN в середовищі культури клітин. Два антитіла людини до сортиліну (45 і 68) мали подібний до нейротензину ефект з підвищенням рівнів PGRN до 202 % і 201 %, відповідно. Антитіло 811 підвищувало рівень PGRN в середовищі до 146 % в порівнянні з контролем B12, при цьому ізотипічне контрольне антитіло використовували як негативний контроль у всіх дослідженнях, і воно не показало ніякого ефекту стосовно рівнів PGRN. Ці спостереження указують, що випробовувані антитіла до сортиліну пригнічували опосередковану сортиліном інтерналізацію PGRN, підвищуючи за рахунок цього рівень позаклітинного PGRN.

У 1-й день клітини S18-HEK висівали в 96-лунковий планшет. Через 24 години середовище повністю замінювали або тільки середовищем (контроль), або середовищем, доповненим випробовуваною сполукою. Всі сполуки тестували при концентрації 10 мкМ, а антитіла при концентрації 100 нМ, якщо не вказане інше. Середовище збирали на 3-й день і аналізували за допомогою ELISA для PGRN (R&D). Життєздатність клітин оцінювали за допомогою Cell TiterGlo (Pro Mega) для оцінки цитотоксичного ефекту сполук. Рівні PGRN в середовищі аналізували за допомогою ELISA і значення нормалізували відносно контрольних лунок. Результати можна побачити на фігурі 10.

Приклад 14. Аналіз ELISA стосовно позаклітинного PGRN в iPSC

Індуковані плюрипотентні ствові клітини (iPSC) отримували за допомогою неінтеграційного перепрограмування фібробластів людини (нормальних фібробластів шкіри людини від 18-річного чоловіка; Lonza), як описано в іншому документі (Rasmussen et al., Stem Cell Reports. 2014 Sep 9;3(3):404-13.). Для цих досліджень використовували лінію NHDF K1_shp53. iPSC спочатку отримували в середовищі mTESR і потім культивували у вигляді моношару в Pluripro (Cell Guidance System). Диференціювання в нейрони ініціювали в день 0 шляхом пересівання клітин на покриті полі-L-орнітином/ламніном чашки і культивування їх в середовищі N3 (50 % DMEM/F12+50 % нейробазального середовища, доповненого 0,5 % N2, 1 % B27 з RA, 0,5 mM GlutaMAX, 0,5 % NEA, 50 мкМ 2-меркаптоетанолу і 2,5 мг/мл інсуліну) з 500 нг/мл noggin і 10 мкМ SB431542. Середовище оновлювали щодня. Через 11 днів індукції за допомогою noggin/SB431542 клітини піддавали відокремлюванню за допомогою диспази і пересівали в покриті полі-L-орнітином/ламніном чашки в середовище N3. З цієї миті середовище N3 оновлювали кожні 2-3 дні і клітини піддавали відокремлюванню приблизно кожні 10-14 днів з використанням акутази.

Диференційовані з клітин iPSC нейрони висівали в 96-лунковий планшет. Через один тиждень до клітин додавали антитіла. Середовище від клітин збирали через 48 годин або 96 годин і аналізували за допомогою ELISA для PGRN людини (Enzo Life sciences), і при цьому зразки аналізували згідно з інструкціями виробника.

Випробовувані антитіла людини до сортиліну (45 і 68) підвищували рівні PGRN в середовищі на різних рівнях через 48 годин і 96 годин. Антитіло B12 і антитіло до Hel являли собою контрольні ізотипічні антитіла (негативний контроль). Дані представлені у вигляді середнього значення $\pm$ SD. Дані аналізували за допомогою однофакторного Anova з подальшим аналізом з використанням критерію Даннета * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Результати можна побачити на фігурі 12.

Приклад 15

Для аналізу ефекту антитіл відносно рівнів PGRN в плазмі крові гуманізовані миші з KI по сортиліну отримували одноразову або багаторазові ін'єкції (10 мг/кг) антитіл до сортиліну або ізотипічного контролю за допомогою підшкірних ін'єкцій. Тварин анестезували і убивали в різні моменти часу після введення доз, і рівні PGRN в плазмі крові визначали за допомогою ELISA.

А. Дослідження в динаміці. Мишей обробляли антитілами (humab до сортиліну або контрольним ab) і убивали в різні моменти часу. У мишей, оброблених контрольними

антитілами (антитілами до Hel), не спостерігали зміни рівнів PGRN в плазмі крові, тоді як у мишей, оброблених humab 45 до сортиліну, спостерігали підвищення рівнів PGRN, які, судячи з усього, досягали свого піку в проміжку від 24 до 48 годин, а потім поступово знижувалися, починаючи приблизно з 4-го дня. Рівні PGRN все ще були підвищеними на 7-й день.

В. Дослідження середньої тривалості. На підставі даних з дослідження в динаміці мишам з KI по сортиліну двічі в тиждень вводили дози, що становлять 10 мг/кг, s.c, або антитіла 45 людини до сортиліну, або ізотипічного контрольного антитіла з метою підтримки постійного рівня антитіл для дослідження середньої тривалості (4 тижні). Зразки крові збирали на початку дослідження і кожного тижня для відстеження змін рівня PGRN в плазмі крові. Рівні PGRN в плазмі крові на початку дослідження були аналогічними в обох групах тварин. Вищі рівні PGRN в плазмі крові спостерігали у мишей, оброблених антитілом 45 до сортиліну, починаючи з тижня 1, і вони залишалися підвищеними впродовж всього дослідження. У мишей, оброблених контрольним аб, не спостерігали будь-якого підвищення рівня PGRN в плазмі крові, і він залишався на початкових рівнях (тиждень 0).

С. Дослідження залежності доза-відповідь. Різні дози (4 дози: 10, 2, 0,4 і 0,1 мг/кг) антитіла до сортиліну (45) і контрольного антитіла (антитіла до Hel) вводили за допомогою ін'єкції і мишей убивали на 2-й день. Рівень PGRN в плазмі крові підвищувався у мишей, оброблених humab до сортиліну в дозі 10 мг/кг і 2 мг/кг, а нижчі дози не надавали ефекту стосовно рівня PGRN в плазмі крові, що чітко указує на дозозалежний ефект антитіла до сортиліну стосовно рівнів PGRN в плазмі крові. У мишей, оброблених контрольним антитілом, не спостерігали ніякої зміни стосовно рівнів PGRN.

Мишей анестезували за допомогою IP введення 0,4 мл авертину і кров з серця збирали і переносили у флакон з 500 мкл kEDTA. Зразки витримували на льоду до проведення центрифугування при 3600 G протягом 15 хвилин при 4 °C. Плазму крові переносили піпеткою у флакон мікропіс і заморожували при -20 °C. Рівень PGRN в зразках вимірювали із застосуванням набору ELISA для PGRN (Adipogen) згідно з інструкціями виробника. Результати можна побачити на фігурі 13.

Приклад 16. Картування епітопів антитіл, спрямованих на взаємодію програнулін-сортилін, за допомогою водень-дейтерієвого обміну з подальшою мас-спектрометрією

При проведенні водень-дейтерієвого обміну з подальшою мас-спектрометрією (HDX-MS) вимірювали швидкість обміну атомів водню амідної групи остову білка. Таким чином можна вивчати конформаційну динаміку всього остову білка, за винятком залишків проліну. Швидкість реакції обміну визначали за станом амідної групи остову утворювати водневі зв'язки і у меншій мірі за доступністю для розчинника. Незначні зміни цих двох параметрів, наприклад, обумовлені присутністю ліганду, можуть спостерігатися у вигляді зміни рівня включення дейтерію.

Для визначення сублокалізації змін включення дейтерію білок обробляли кислототривкою протеазою (наприклад, пепсином), яка забезпечує утворення локальних ділянок звичайно з десяти - п'ятнадцяти амінокислот. Ділянки, в яких спостерігається зсув у присутності ліганду, або безпосередньо залучені в зв'язування граничної поверхні, або алостерично впливають на процес зв'язування.

Картування епітопів антитіл

Включення дейтерію в позаклітинну ділянку сортиліну (SEQ ID NO:188) вимірювали у відсутності і присутності mAb45, mAb68, mAb811 і антитіла, названого mAb30, яке не зв'язується з ділянкою D. Для гарантії того, що вимірювання будуть проводитися в незмінних умовах, забезпечували урівноваження комплексів протягом 15 хвилин при 25 °C перед ініціацією реакції обміну. Реакцію обміну ініціювали шляхом розведення зразків білка 1:9 (об./об.) в дейтерованому буфері (99 % D₂O, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, рDзчит. = 7,6). Через різні моменти часу (15 с, 1 хв., 10 хв., 1 год. і 8 год.) реакцію обміну гасили шляхом розведення 1:1 (об./об.) крижаним буфером для гасіння (2 M гліцину, 0,8 M Tris-(2-карбоксіетил)фосфіну (TCPEP), рН=2,3), із зниженням за рахунок цього рН до 2,46. Піддані гасінню зразки негайно поміщали в морозильну установку, що підтримує -80°, і зберігали в ній до проведення аналізу. Повністю дейтеровані контрольні зразки отримували шляхом розведення зразків сортиліну в співвідношенні 1:9 (об./об.) в дейтерованому денатуруючому буфері (6 M гуанідинію хлориду, 99 % D₂O, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, рDзчит. = 7,6) з подальшою інкубацією при 25 °C протягом 16 годин перед їх гасінням і проведенням маніпуляцій, як описано вище.

Піддані гасінню зразки розморожували і вводили в охолоджену (0 °C) систему на основі обернено-фазової UPLC-HDX (Waters Inc., США), обладнану заздалегідь заповненою пепсином колонкою (внутрішній об'єм 60 мкл, гранули пепсину отримували у Thermo Scientific Inc.). У даному випадку дейтеровані зразки білка піддавали розщеплюванню пепсином при 20 °C, що відстежували в режимі реального часу, і отримані в результаті дії пепсину пептиди розділяли за

допомогою обернено-фазової UPLC. Пептиди іонізували за допомогою електророзпилювальної іонізації в мас-спектрометрі (мас-спектрометр Synapt G2, Waters Inc, Великобританія), при цьому пептиди додатково розділяли за рухливістю іонів перед остаточним визначенням їх маси.

Ідентифікацію пептидів проводили з використанням повністю відновлених і недейтерованих зразків за допомогою тандемної мас-спектрометрії, в якій використовується комбінація принципів збору даних, не залежних від отриманої раніше інформації (MSe) і залежних від неї.

Аналіз даних

Ідентифікація пептидів

Отримані мас-спектри являли собою фіксовану масу, скоректовану відносно GFP, і були проаналізовані в PLGS 3.0, що здійснює підбір відповідності батьківських і фрагментованих іонів до локальної бази даних білків. Всі ідентифікації пептидів уважно оцінювали уручну.

Визначення рівня включення дейтерію. Отримані мас-спектри являли собою фіксовану масу, скоректовану відносно GFP, і програмне забезпечення DynamX 3.0 (Waters Inc., США) застосовували для визначення рівня включення дейтерію для всіх пептидів сортиліну в присутності або відсутності антитіла.

Вважалося, що пептид є частиною зв'язуючого епітопу, якщо спостерігали захист від обміну більш 0,5D у присутності антитіла.

Таблиця 1

Таблиця з ідентифікованими за допомогою HDX-MS конформаційними епітопами

Антитіло	Картований за допомогою HDX-MS епітоп стосовно SEQ ID NO:169				
45	109-114	126-153		570-572	588-597
68	109-114	126-144	154-159	570-572	593-597
811-02	109-114	126-144			593-597

Приклад 17. Мікродіаліз для оцінки рівнів програнуліну в головному мозку тварин, що не сплять та вільно рухаються

Двотактний спосіб мікродіалізу застосовували для оцінки рівня програнуліну (PRGN) в ISF головного мозку у мишей, що не сплять і вільно рухаються. Мишей містили поодиночці в регульованих умовах температури ($22 \pm 1,5$ °C) і вологості (55-65 %) і підтримували 12:12-годинний цикл світла/темряви (включення світла о 06:00 год.). Їжа і вода були доступні без обмежень. Дане дослідження проводили на гіпокампі мишей з нокіном по людському сортиліну (hSORT1) (віком 22 тижні). Для забезпечення можливості здійснення мікродіалізу в гіпокампі мишей анестезували ізофлураном і в головний мозок стереотаксично імплантували внутрішньоцеребральну направляючу канюлю (CMA), розташовуючи мікродіалізний зонд в гіпокампі (координати наконечника зонда: на 3,1 мм назад і на 2,8 мм латерально від брегми і на 1,3 мм щодо твердої мозкової оболонки) відповідно до атласу Paxinos and Franklin 2001. Акриловий цемент застосовували для фіксації направляючих канюль. Після імплантації канюлі забезпечували відновлення мишей після операції протягом 7 днів перед здійсненням діалізу. Протягом перших 5 днів, включаючи день проведення хірургічного втручання, тварини отримували знеболюючі засоби і антибіотики (римадил і Noromox Prolongatum). За 24 години до початку мікродіалізних експериментів насос також з'єднували з випускною трубкою з метою запобігання втраті перфузійної рідини із зонда при пропусканні рідини через трубку. Як перфузійний буфер 25 % фракцію V бичачого альбуміну (Sigma) розводили до 0,2 % штучною CSF (aCSF; у мМ: 147 NaCl, 2,7 KCl, 1,2 CaCl₂, 0,85 MgCl₂) в день його застосування і фільтрували через мембрану з розміром пор 0,1 мкм. Фактичну витрату потоку насоса визначали без приєднаного зонда. Пробірки для зразків зважували до і після забору зразків протягом заданого періоду часу і розраховували витрату потоку. Потім насос встановлювали на постійний потік у 1 мкл/хв. Впродовж всього періоду експериментів використовували 120-хвилинний режим забору зразків і збирали 12 зразків (12 год. збору) (фігура 17, що стосується процедури). В кінці експериментів у тварин брали кров, тварин піддавали перфузії і збирали зразки головного мозку. Діалізати, плазму крові і зразки головного мозку зберігали при -80 °C до визначення рівня PRGN за допомогою ELISA.

Вимірювання рівнів PRGN кожні 2 години протягом 24 годин зображено на фігурі 17. У кожен період часу, за винятком 24 годин після початку збору діалізатів, рівні PRGN значущо підвищувалися у тварин, оброблених за допомогою mAb №45, підвищувалися в порівнянні з рівнями у тварин, оброблених за допомогою PBS (фігура 18a). Рівні PRGN залишалися постійними за часом від 4 годин до 16 годин після введення зонда в гіпокамп. Рівень PRGN в

першому діалізаті був підвищений, ймовірно, унаслідок введення зонда в гіпокамп. Передбачається, що рівні PRGN знижуються через ≥ 18 годин/20 годин після введення зонда, ймовірно, унаслідок закупорювання мембрани зонда, оскільки це відбувалося в обох групах (і раніше спостерігалось в інших двотактних дослідженнях).

- 5 За початковий рівень приймали середнє значення $\pm$ SEM від 12 зразків діалізу через 24 години після обробки антитілом або середовищем-носієм для кожної тварини і потім дані від всіх тварин об'єднували (фігура 18b). Різницю між даними від тварин, оброблених за допомогою mab №45 і PBS, аналізували за допомогою двовибіркового t-критерію для незалежних вибірок. Початкові рівні PRGN у тварин, оброблених за допомогою mab №45, були значно вищими в порівнянні з початковими рівнями у тварин, оброблених за допомогою PBS ($p < 0,001$, F10,0, DFn, 9 Dfd 7; $3,3 \pm 0,3$ нг/мл, $n=10$ в порівнянні з $1,1 \pm 0,1$ нг/мл, $n=8$) (фігура 18b).

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 15 1. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, здатні специфічно зв'язуватися з сортиліном і пригнічувати або знижувати зв'язування PGRN з сортиліном, вибрані з групи, що складається з антитіл (1)-(21);

антитіло (1) містить:

- 20 а) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR1, що містить SEQ ID NO: 1;
 b) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR2, що містить SEQ ID NO: 2;
 c) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR3, що містить SEQ ID NO: 3;
 d) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR1, що містить SEQ ID NO: 4;
 e) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR2, що містить SEQ ID NO: 5; та
 f) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR3, що містить SEQ ID NO: 6;

25 антитіло (2) містить:

- a) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR1, що містить SEQ ID NO: 9;
 b) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR2, що містить SEQ ID NO: 10;
 c) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR3, що містить SEQ ID NO: 11;
 d) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR1, що містить SEQ ID NO: 12;
 e) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR2, що містить SEQ ID NO: 13; та
 f) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR3, що містить SEQ ID NO: 14;

антитіло (3) містить:

- 35 a) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR1, що містить SEQ ID NO: 17;
 b) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR2, що містить SEQ ID NO: 18;
 c) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR3, що містить SEQ ID NO: 19;
 d) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR1, що містить SEQ ID NO: 20;
 e) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR2, що містить SEQ ID NO: 21; та
 f) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR3, що містить SEQ ID NO: 22;

антитіло (4) містить:

- 40 a) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR1, що містить SEQ ID NO: 25;
 b) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR2, що містить SEQ ID NO: 26;
 c) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR3, що містить SEQ ID NO: 27;
 d) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR1, що містить SEQ ID NO: 28;
 e) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR2, що містить SEQ ID NO: 29; та
 f) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR3, що містить SEQ ID NO: 30;

антитіло (5) містить:

- 45 a) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR1, що містить SEQ ID NO: 33;
 b) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR2, що містить SEQ ID NO: 34;
 c) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR3, що містить SEQ ID NO: 35;
 d) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR1, що містить SEQ ID NO: 36;
 e) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR2, що містить SEQ ID NO: 37; та
 f) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR3, що містить SEQ ID NO: 38;

антитіло (6) містить:

- 50 a) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR1, що містить SEQ ID NO: 41;
 b) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR2, що містить SEQ ID NO: 42;
 c) варіабельний домен легкого ланцюга L-CDR3, що містить SEQ ID NO: 43;
 d) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR1, що містить SEQ ID NO: 44;
 e) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR2, що містить SEQ ID NO: 45; та
 f) варіабельний домен важкого ланцюга H-CDR3, що містить SEQ ID NO: 46;

60 антитіло (7) містить:

- [illegible]

- [illegible]

- антитіло (8) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 64, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 63;
- антитіло (9) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 72, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 71;
- 5 антитіло (10) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 80, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 79;
- антитіло (11) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 88, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 87;
- 10 антитіло (12) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 96, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 95;
- антитіло (13) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 104, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 103;
- антитіло (14) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 112, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 111;
- 15 антитіло (15) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 120, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 119;
- антитіло (16) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 128, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 127;
- 20 антитіло (17) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 136, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 135;
- антитіло (18) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 144, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 143;
- антитіло (19) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 152, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 151;
- 25 антитіло (20) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 160, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 159;
- антитіло (21) додатково містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 168, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 167.
3. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за пп. 1-2, де антигензв'язувальний фрагмент вибраний з групи, що складається з Fv-фрагмента (наприклад одноланцюгового Fv або зв'язаного дисульфідним зв'язком Fv); Fab-подібного фрагмента (наприклад Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента або F(ab)2-фрагмента) і доменного антитіла (наприклад окремого варіабельного домену VH або варіабельного домену VL).
4. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, де антитіло складається з інтактного антитіла.
- 35 5. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з попередніх пунктів, де антитіло вибрано з групи, що складається з антитіла підтипу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.
6. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з попередніх пунктів, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент належить до людського, гуманізованого, рекомбінантного або химерного антитіла.
- 40 7. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-6 і фармацевтично прийнятний носій.
8. Застосування антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-6 або фармацевтичної композиції за п. 7 в медицині.
9. Застосування антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-6 або фармацевтичної композиції за п. 7 при лікуванні захворювання, що асоціюється із зниженими рівнями PGRN в головному мозку пацієнта.
- 45 10. Застосування антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-6 або фармацевтичної композиції за п. 7 при виготовленні лікарського препарату для лікування захворювання, що асоціюється із зниженими рівнями PGRN в головному мозку пацієнта.
- 50 11. Спосіб попередження або лікування захворювання, що асоціюється із зниженими рівнями PGRN в головному мозку пацієнта, який включає введення ефективної дози антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-6 або фармацевтичної композиції за п. 7.
12. Застосування антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за п. 9 або 10 або спосіб за п. 11, де захворювання являє собою лобно-скроневу деменцію (FTD); бічний аміотрофічний склероз (ALS) або протеїнопатії TDP43, як, наприклад, хвороба Альцгеймера (AD).
- 55 13. Застосування антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за пп. 9, 10 або 11, де лікування є тривалим і переважно проводиться протягом щонайменше 2 тижнів, як, наприклад, протягом щонайменше 1 місяця або протягом щонайменше 6 місяців, або протягом щонайменше 1 року.

14. Набір, що містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-6 або фармацевтичну композицію за п. 7.
15. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-6, які були отримані або вироблені в клітинній лінії, такий як клітинна лінія людини, клітинна лінія ссавця, відмінного від людини, клітинна лінія комахи, дріжджів або бактерії.
- 5 16. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 15, отримані в клітинній лінії CHO, клітинній лінії HEK, клітинній лінії BHK-21, клітинній лінії миші (такій як клітинна лінія мієломи), клітинній лінії фібросаркоми, клітинній лінії PER.C6, клітинній лінії НКВ-11, клітинній лінії CAP і клітинній лінії HuH-7 людини.

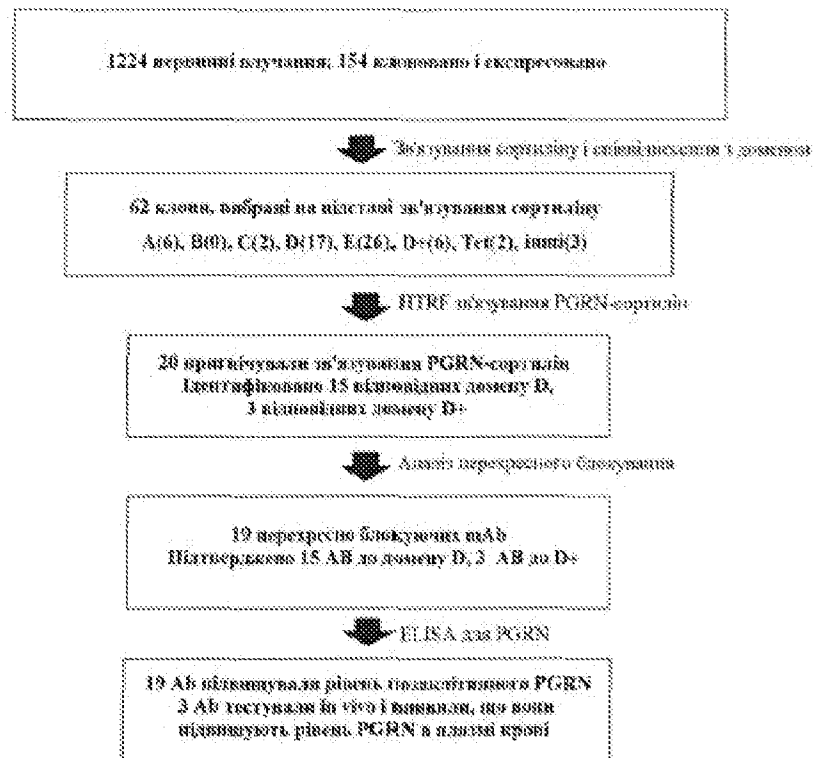
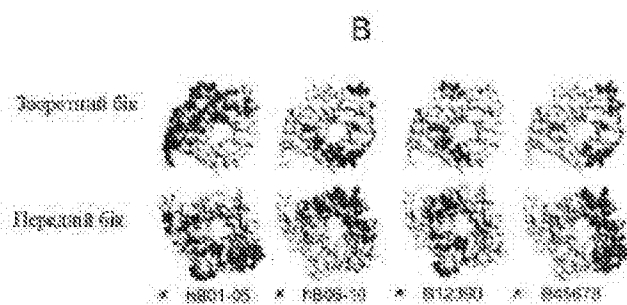
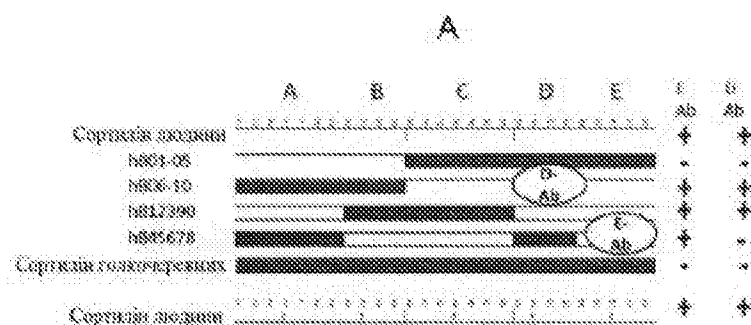


Fig.1



C

№	Линия	Сорт	h801-05	h806-10	h812390	h845678	Тот
8	A	+	+	-	+	-	-
9	B	+	+	-	+	+	-
10	C	+	-	+	-	+	-
11	D	+	-	+	+	-	-
12	E	+	-	+	+	+	-
13	D+	+	-	-	+	-	-
14	Тот	+	+	+	+	+	+
15	Тот	+	+/+	+/+	+/+	+	-

Фиг.2

mAb	Домен	hSort	hB01-05	hB06-10	B12390	B45678	Tot
002	D	2,40	NB	43,30	2,44	NB	NB
044	D	1,38	NB	21,20	1,03	NB	NB
045	D	1,56	NB	9,60	1,10	NB	NB
68	D+	1,80	NB	NB	1,87	NB	NB
088	D	2,49	NB	9,55	1,57	NB	NB
093-01	D	3,47	NB	44,53	2,13	NB	NB
093-05	D	2,88	NB	43,24	1,78	NB	NB
193	D	2,07	NB	5,57	0,83	NB	NB
531	D+	5,50	NB	NB	2,29	NB	NB
548	D+	4,49	NB	NB	3,36	NB	NB
562	D	2,23	NB	24,58	1,34	NB	NB
568	D	2,93	NB	42,65	2,12	NB	NB
811	D	1,81	NB	8,00	1,08	NB	NB
849	D	1,01	NB	17,08	0,78	NB	NB
924	D	0,76	NB	20,01	3,83	NB	NB
1276	D	2,24	NB	8,78	0,93	NB	NB
1289	D	1,82	NB	15,23	0,96	NB	NB
1320	D	19,14	NB	55,43	12,32	NB	NB

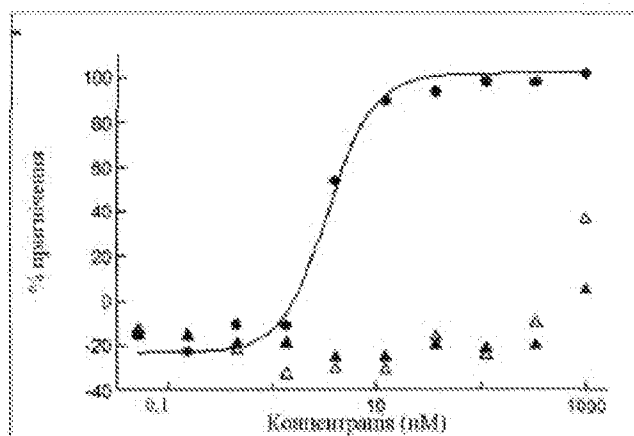
+	EC50 0,1-10 мкг/мл
+	EC50 >10 мкг/мл
NB	відсутність зв'язування

Φir.3

mAb	Домен	hSort	hB01-05	hB06-10	B12390	B45678	Tot
1F2F4	D	1,56	NB	9,60	1,10	NB	NB
6E1P6	D	1,14	NB	0,72	0,59	NB	NB

+	зв'язування
NB	відсутність зв'язування

Φir.4



Антитіло	IC50 (нМ)
IgG1-6003-045	3,5 ± 0,6
Ab до Е-домени	>1000 *
IgG1-B12 (контр.)	>1000 **

* ефект антитіла був дуже слабким для підбирання кривої залежності доза-відповідь.

6% пригнічення при 1мкМ

** ефект контрольного антитіла був дуже слабким для підбирання кривої залежності доза-відповідь. 37% пригнічення при 1мкМ

Фір.5

Ab	Найвища конц.	% пригніч. найвища конц.	IC50 (нМ)	Домен
IgG1-6003-002	500	91	4,3	D
IgG1-6003-044	1000	101	3,4	D
IgG1-6003-045	1000	102	3,9	D
IgG1-6003-088	1000	92	22	D+
IgG1-6003-088	1000	96	2,5	D
IgG1-6003-093-L01	1000	82	13	D
IgG1-6003-093-L05	1000	95	35	D
IgG1-6003-193	1000	93	1,8	D
IgG1-6003-531	1000	102	2,5	D+
IgG1-6003-549	600	87	11	D+
IgG1-6003-582	1000	100	5,8	D
IgG1-6003-586	1000	100	2,8	D
IgG1-6003-811	1000	102	4,4	D
IgG1-6003-849	1000	101	3,8	D
IgG1-6003-924	1000	100	3,3	D
IgG1-6003-1276	1000	108	2,5	D
IgG1-6003-1289	800	98	3,0	D
IgG1-6003-1320	900	75	32	D
IgG1-B12	1000	37	-	-

Фір.6

Домен	антібіот	D+	D+	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
D+	548	0.04	0.01	0.00	0.04	0.00	0.01	0.00	0.02	0.00	0.02	0.00	0.01	0.03
D+	531	0.02	0.00	-0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
D	002	0.00	-0.02	-0.02	0.00	0.02	-0.02	-0.02	0.03	-0.02	-0.01	-0.02	-0.01	0.00
D	044	0.02	0.00	-0.01	0.00	0.02	-0.01	-0.01	0.00	0.00	0.00	-0.01	0.01	0.00
D	045	0.02	0.00	0.00	0.01	0.03	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
D	088	0.02	-0.01	-0.01	0.00	0.02	-0.01	-0.01	0.01	0.00	0.00	-0.01	0.00	0.00
D	193	0.03	0.02	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.03	0.00	0.03	0.02
D	562	0.01	0.00	-0.01	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00
D	566	0.00	-0.02	-0.04	-0.01	-0.01	-0.03	-0.04	-0.02	-0.03	-0.02	-0.03	-0.02	-0.03
D	811	-0.01	-0.02	-0.01	0.00	0.01	-0.02	-0.02	0.00	-0.02	-0.01	-0.02	-0.01	0.00
D	878	0.00	-0.01	-0.02	-0.01	0.00	-0.02	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	0.00	-0.01
D	1289	-0.01	-0.02	-0.01	-0.01	0.00	-0.03	-0.03	-0.02	-0.03	-0.03	-0.03	-0.02	-0.02
D	848	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.02	-0.01	-0.02	0.00	-0.01	0.00	-0.02	0.01	-0.01
D	1276	0.01	0.01	-0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
D	854	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
D	093-L01	0.01	0.00	-0.01	0.00	0.03	0.00	-0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
D	093-L05	0.01	0.00	-0.01	0.00	0.01	-0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01
D	5E1F6	0.02	0.01	0.00	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02
D	1F2F4	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	-0.01	0.00	-0.01	0.01	0.00	0.01	0.00
D+	988	-0.01	0.00	-0.01	-0.02	-0.01	0.00	-0.02	0.00	-0.01	0.02	-0.02	0.00	-0.01
D	1320	-0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	-0.01	0.00	-0.01	-0.01	-0.01	0.00	-0.01

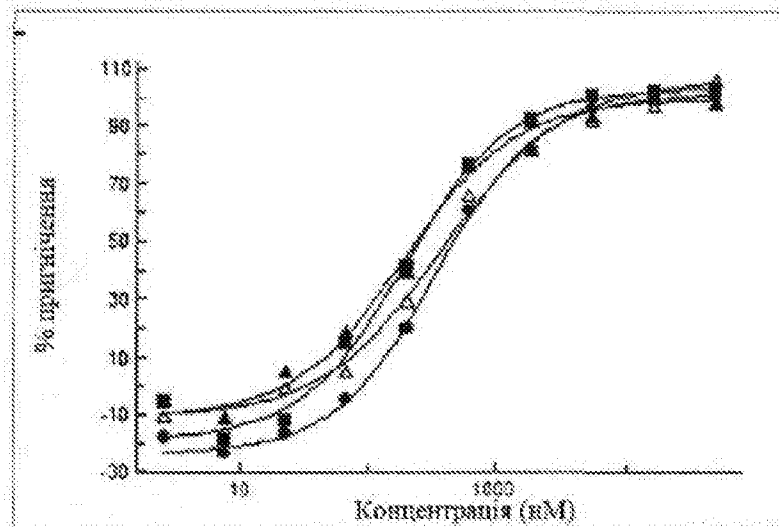
Фіг.7

		1276	924	093-L01	093-L05	5E1F6	1F2F4	068	1320	A1
Домен	антібіот	D	D	D	D	D	D	D+	D	A
D+	548	0.02	0.02	0.04	0.01	0.02	x	0.00	0.04	0.07
D+	531	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	x	0.00	0.04	0.59
D	002	0.02	0.03	0.00	0.01	0.07	x	-0.02	0.02	0.57
D	044	0.01	0.01	0.00	0.03	0.02	x	-0.01	0.01	0.48
D	045	0.01	0.01	0.01	0.03	0.01	x	0.00	0.01	0.52
D	088	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	x	-0.02	0.03	0.77
D	193	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	x	0.01	0.04	0.42
D	562	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	x	-0.01	0.01	0.23
D	566	-0.03	-0.01	0.01	0.00	-0.02	-0.01	-0.04	0.01	0.58
D	811	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	x	-0.02	0.01	0.77
D	1289	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	x	-0.02	0.00	0.45
D	848	-0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	X	-0.01	0.01	0.73
D	1276	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01	X	0.00	0.01	0.70
D	924	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	X	0.00	0.02	0.52
D	093-L01	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	X	-0.01	0.01	0.66
D	093-L05	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	X	-0.01	0.03	0.62
D	5E1F6	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.00	0.03	0.39
D	1F2F4	0.00	0.04	-0.01	0.01	0.01	0.01	-0.01	0.01	0.41
D+	988	-0.01	0.01	0.02	0.00	0.01	X	-0.01	0.01	0.52
D	1320	-0.01	0.00	0.04	0.00	-0.01	0.00	-0.01	0.00	0.19

Фіг.7 (продовж.)

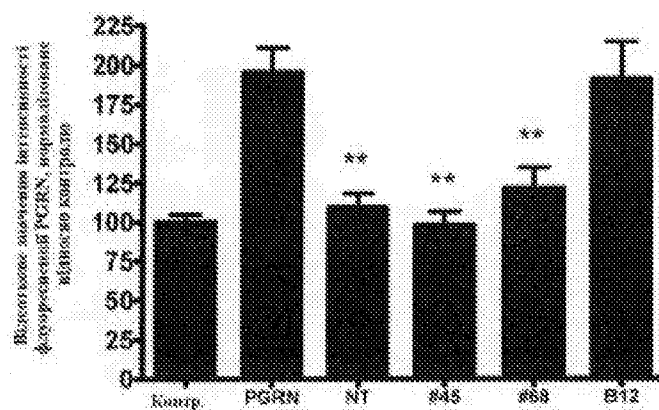
		530	784	810	471	532	910	550	828	942
		E	E	E	E	E	E	Tetra	E	A
Домени	антитіло	AbE1	AbE2	AbE3	AbE4	AbE5	AbE6	Abtet	AbE7	AbA2
D+	548	0.01	0.03	0.22	0.26	0.27	0.22	0.06	0.01	0.05
D+	531	0.26	0.60	0.83	0.92	0.93	0.87	0.69	0.51	0.22
D	802	0.25	0.52	0.74	0.70	0.78	0.78	0.67	0.42	0.19
D	844	0.18	0.42	0.64	0.73	0.68	0.68	0.56	0.32	0.20
D	845	0.23	0.47	0.67	0.72	0.72	0.70	0.60	0.36	0.19
D	888	0.42	0.79	1.00	1.18	1.13	1.09	0.99	0.64	0.24
D	183	0.19	0.38	0.54	0.57	0.52	0.53	0.43	0.27	0.19
D	562	b	0.23	0.39	0.36	0.33	0.33	0.24	0.13	0.13
D	668	0.25	0.55	0.77	0.88	0.87	0.79	0.60	0.35	0.24
D	811	0.42	0.79	1.02	1.17	1.13	1.09	0.97	0.65	0.24
D	1289	0.18	0.43	0.56	0.67	0.83	0.84	0.47	0.29	0.18
D	848	0.37	0.74	0.96	1.11	1.08	1.04	0.80	0.58	0.25
D	1276	0.39	0.74	0.93	1.03	1.03	0.97	0.83	0.57	0.28
D	924	0.29	0.50	0.68	0.67	0.69	0.65	0.52	0.33	0.22
D	083-L01	0.31	0.64	0.82	0.93	0.92	0.87	0.78	0.49	0.23
D	083-L05	0.28	0.58	0.80	0.89	0.88	0.84	0.69	0.45	0.22
D	5E1F6	0.19	0.39	0.62	0.57	0.59	0.54	0.40	0.27	0.18
D	1F2F4	0.16	0.38	0.60	0.63	0.62	0.58	0.44	0.26	0.18
D+	088	0.26	0.58	0.80	0.94	0.94	0.89	0.80	0.43	0.12
D	1320	b	b	0.22	0.28	0.28	0.29	0.17	b	b

Фіг.7 (продовж.)

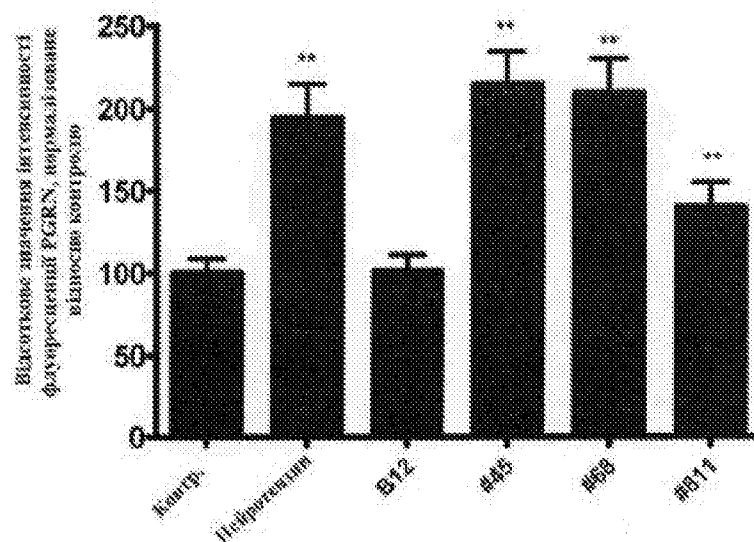


Сортисил + антитіло	IC ₅₀ AF38469 (нМ)
	371 ± 79
Сортисил + IgG1-6003-045	198 ± 32
Сортисил + IgG1-6003-068	199 ± 11
Сортисил + ізонічний контроль hIgG1	385 ± 113

Фіг.8



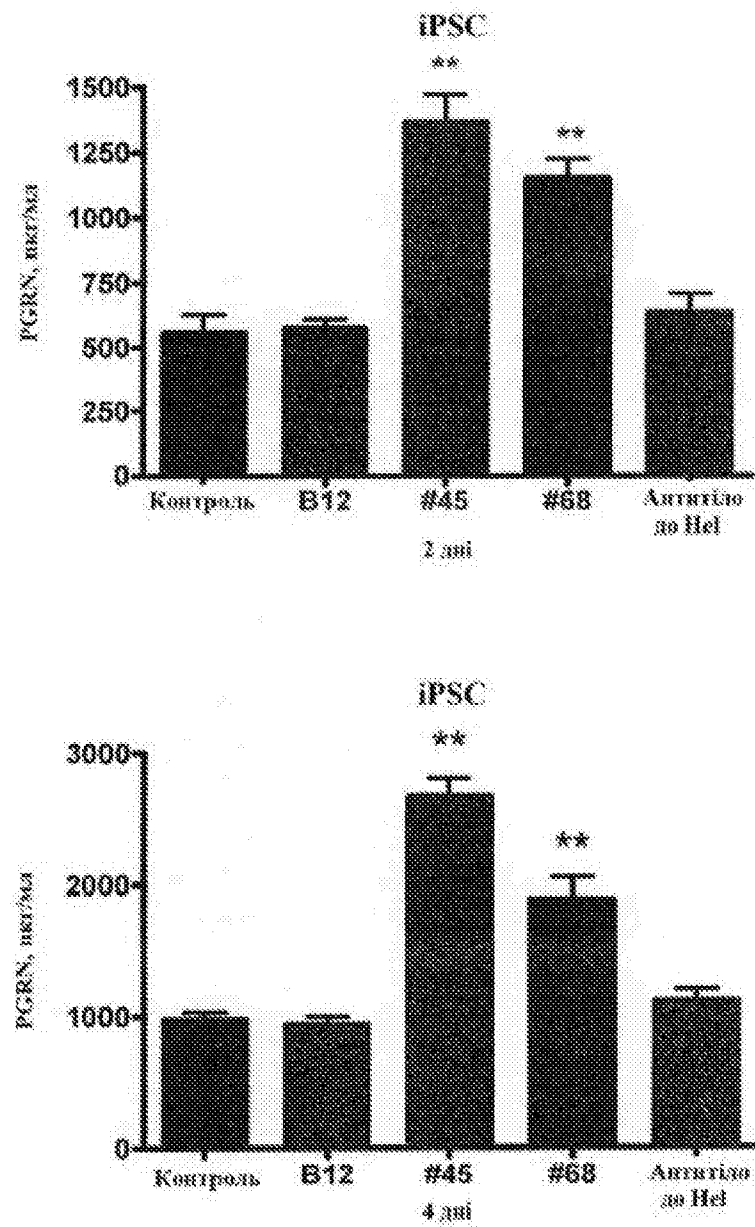
Φir.9



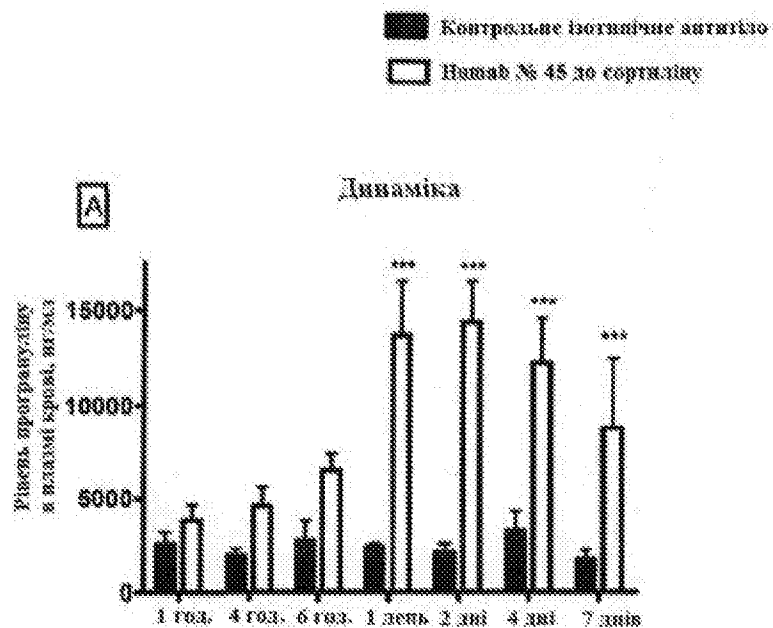
Φir.10

№ Ab	% PGRN	№ Ab	% PGRN
002	142	849	149
044	166	1276	163
045	202	924	125
088	121	093-L01	116
193	207	093-L05	140
562	139	1320	114
566	139	1F2F4	282
811	146	SE1F6	177
1289	117		
548	139	68	201
531	140		

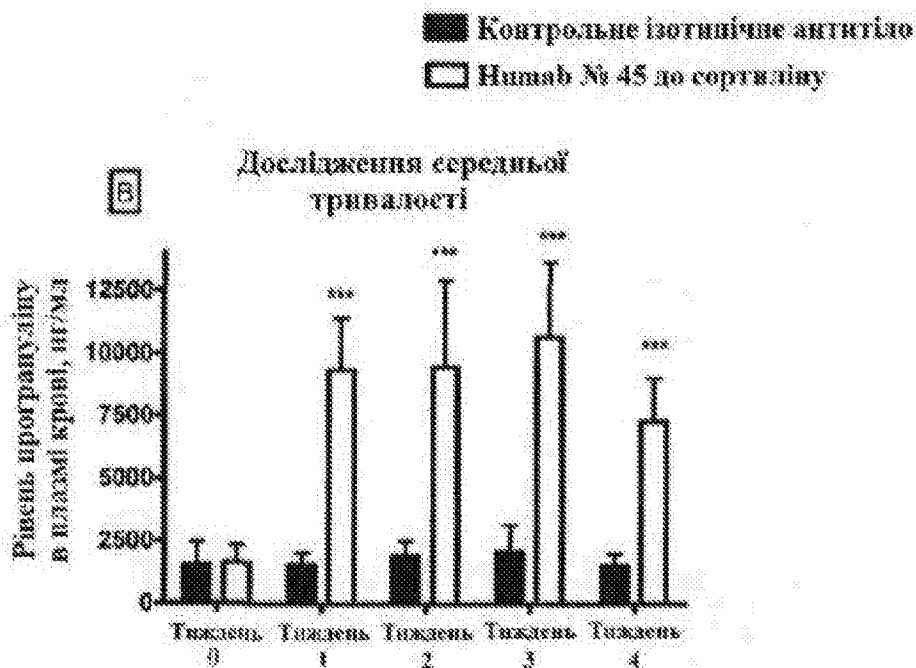
Φir.11



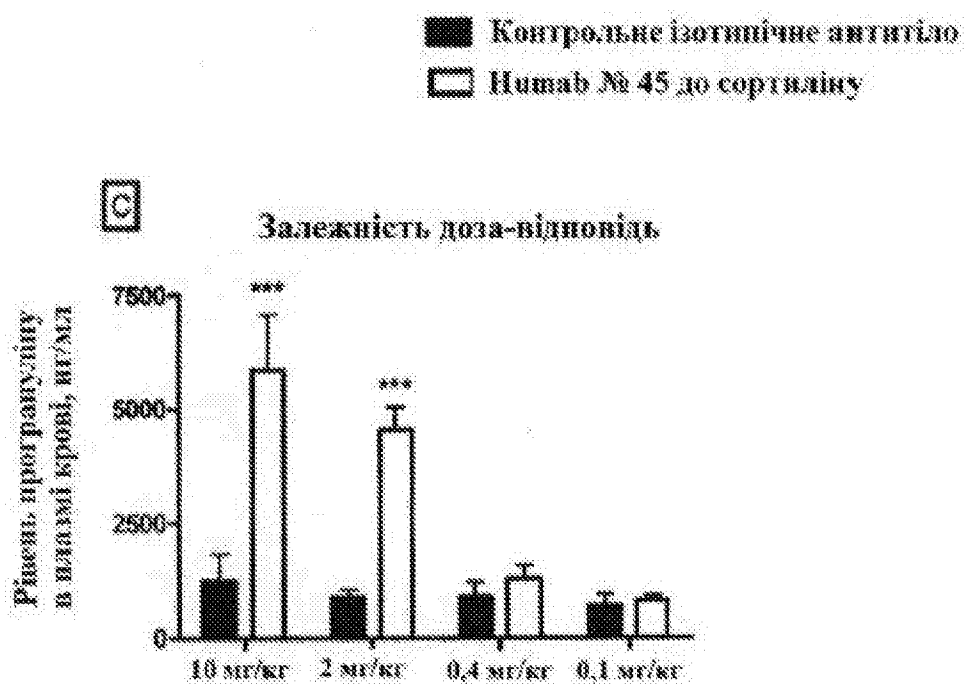
Фіг.12



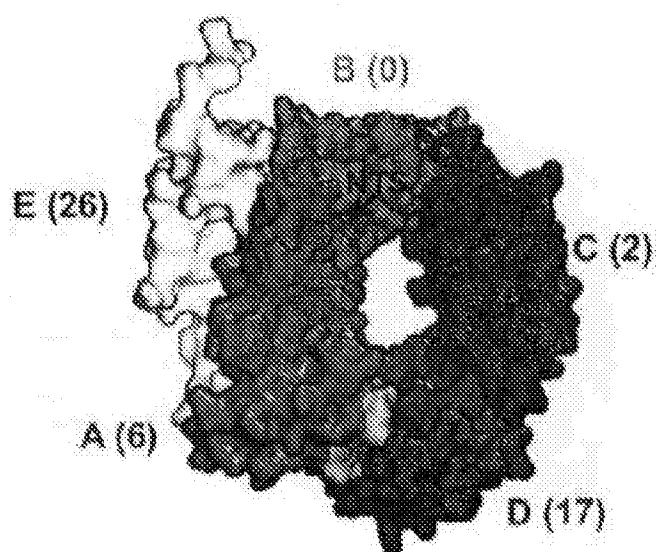
Фиг.13а



Фиг.13б



Фіг.13с



Фіг.14

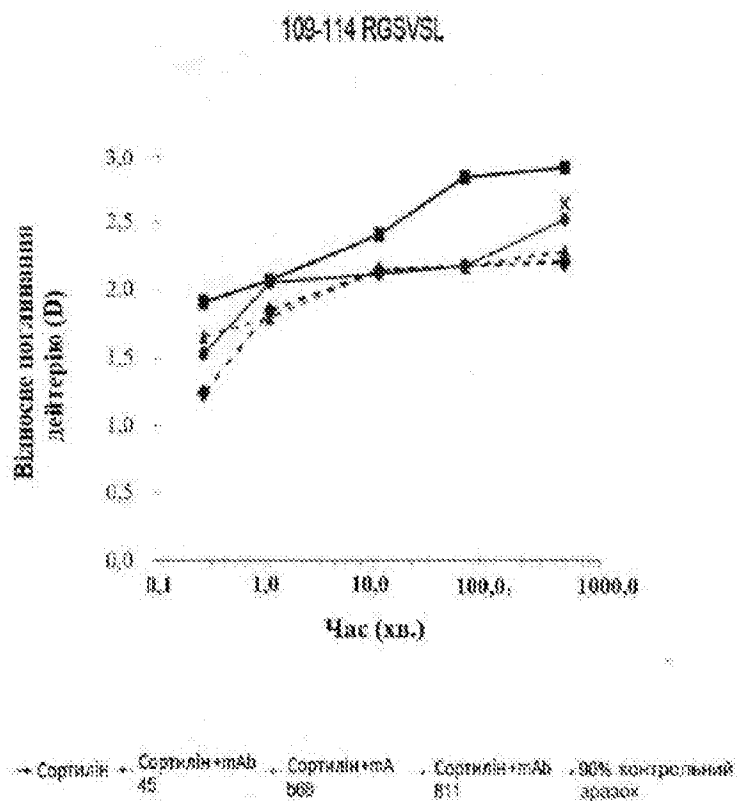


Fig.15a(1)

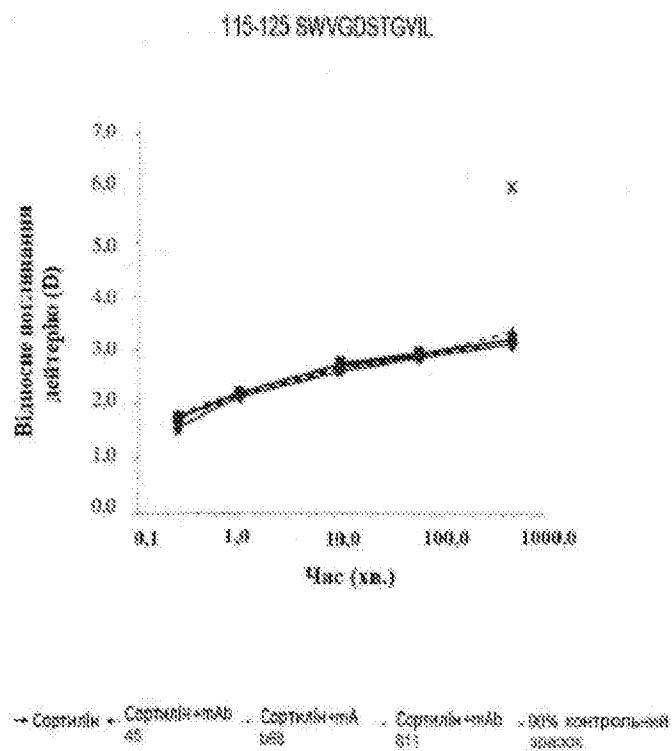
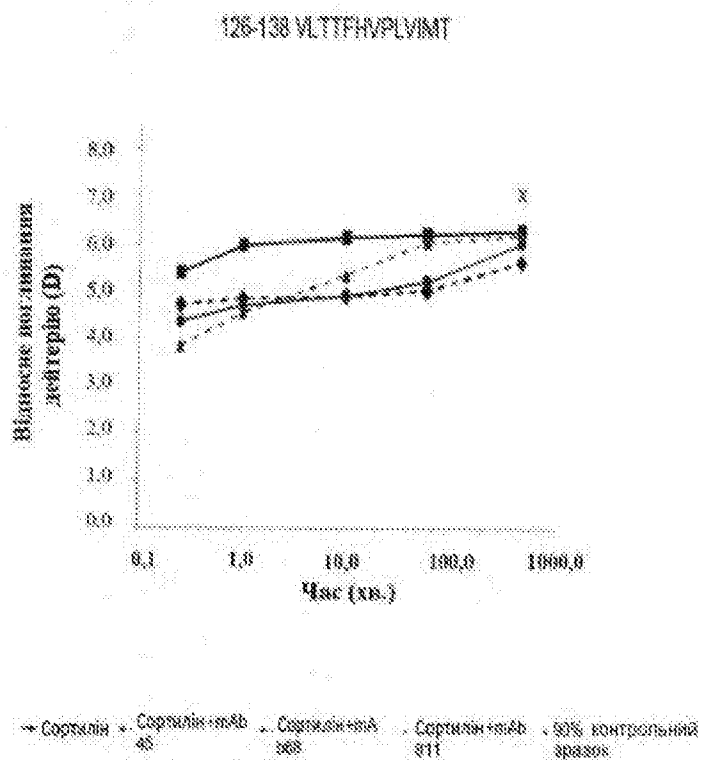
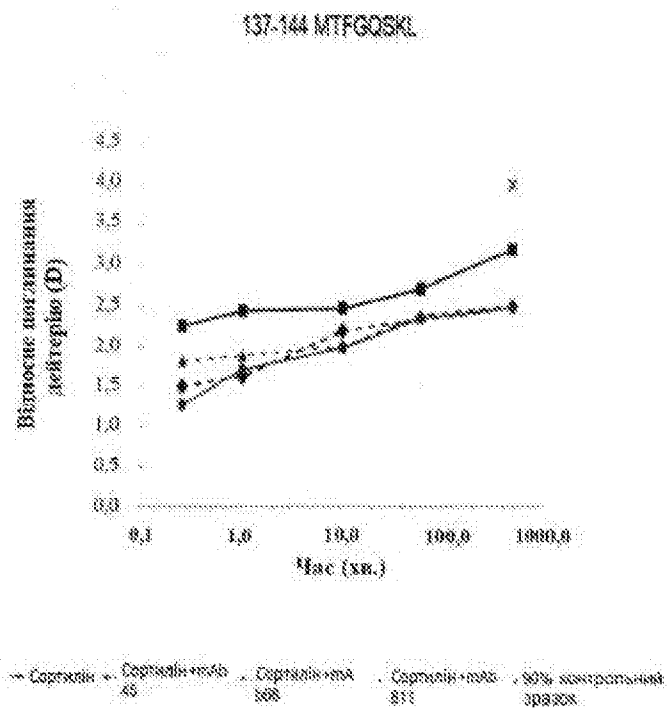


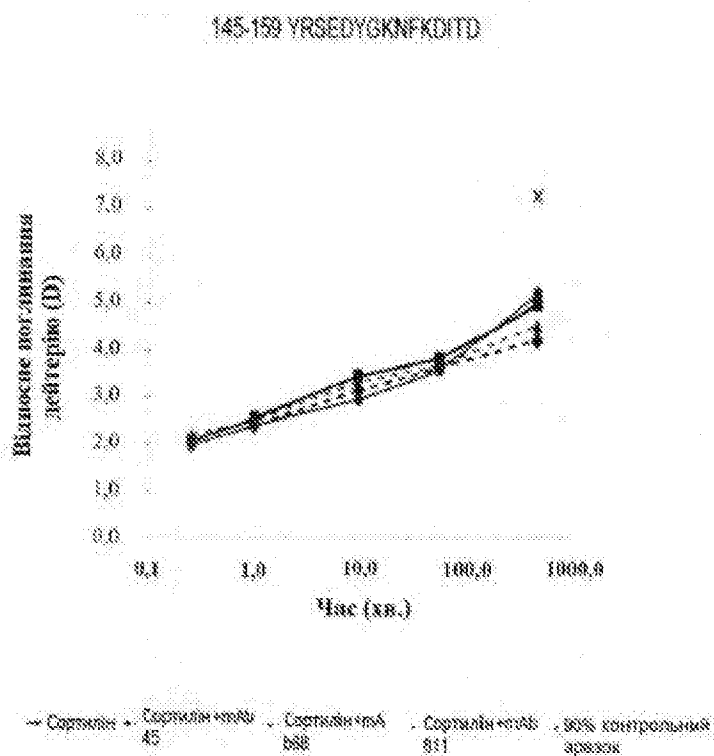
Fig.15a (2)



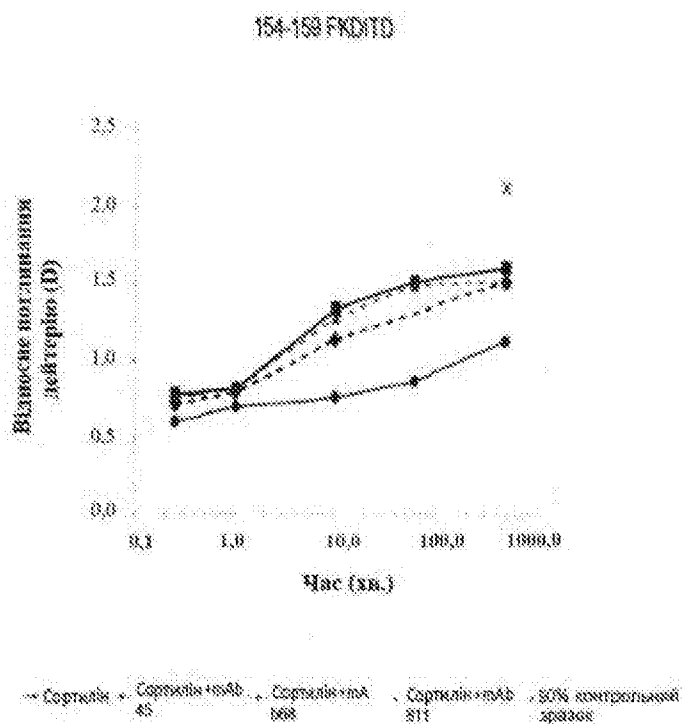
Фіг.15а (3)



Фіг.15а (4)

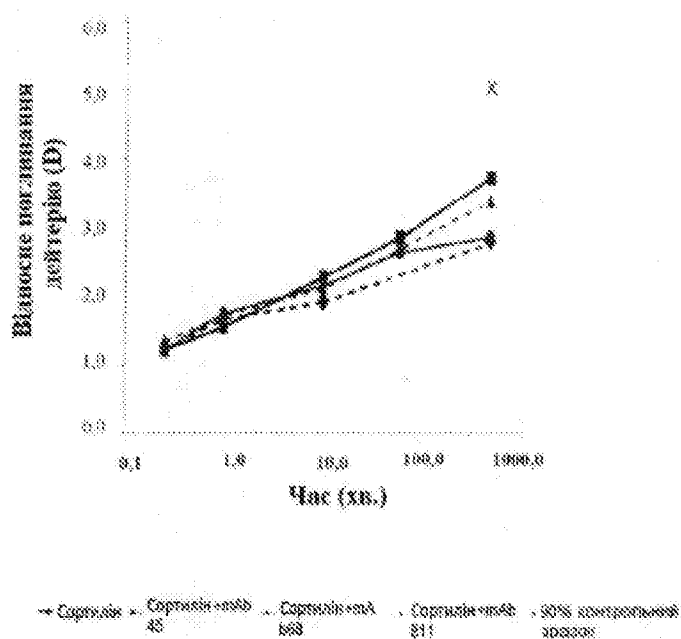


Фіг.15а (5)



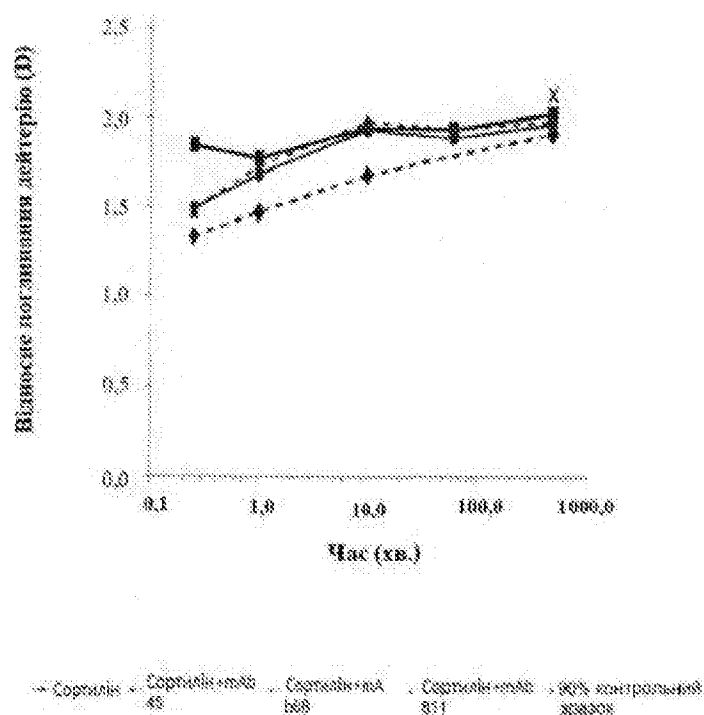
Фіг.15а (6)

562-572 FTRDPIYFTGL

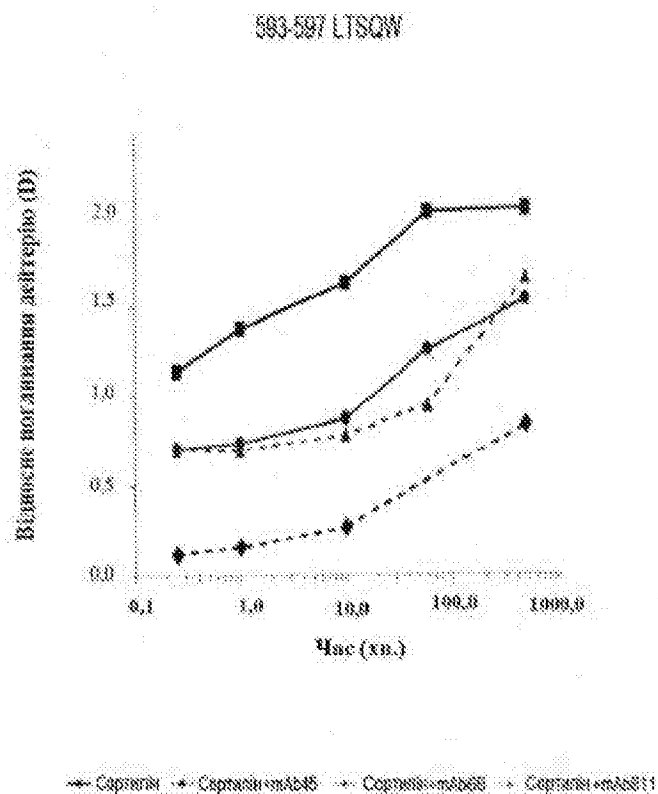


Фиг.15b (1)

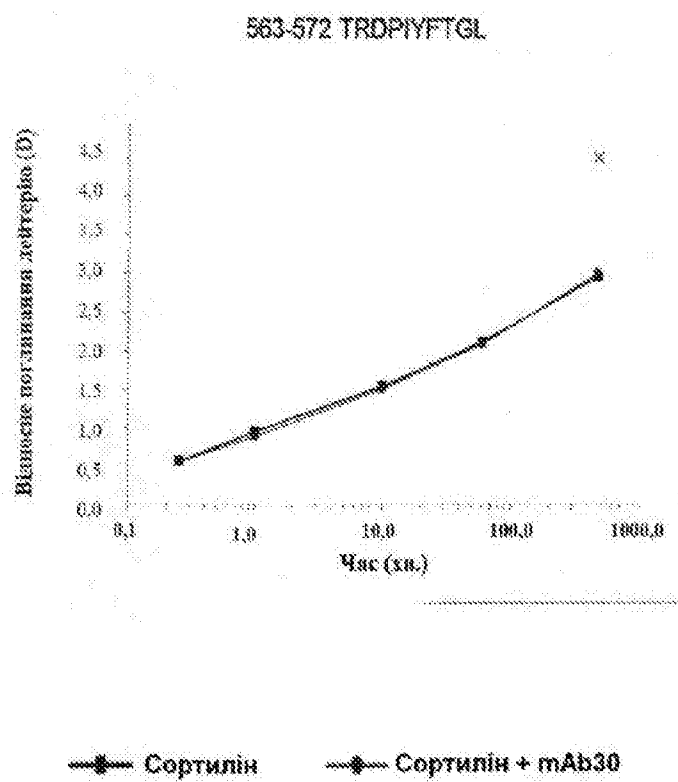
588-592 FTESF



Фиг.15b (2)



Фиг.15b (3)



Фиг.16a (1)

617-629 YTIWLAHSTDPE

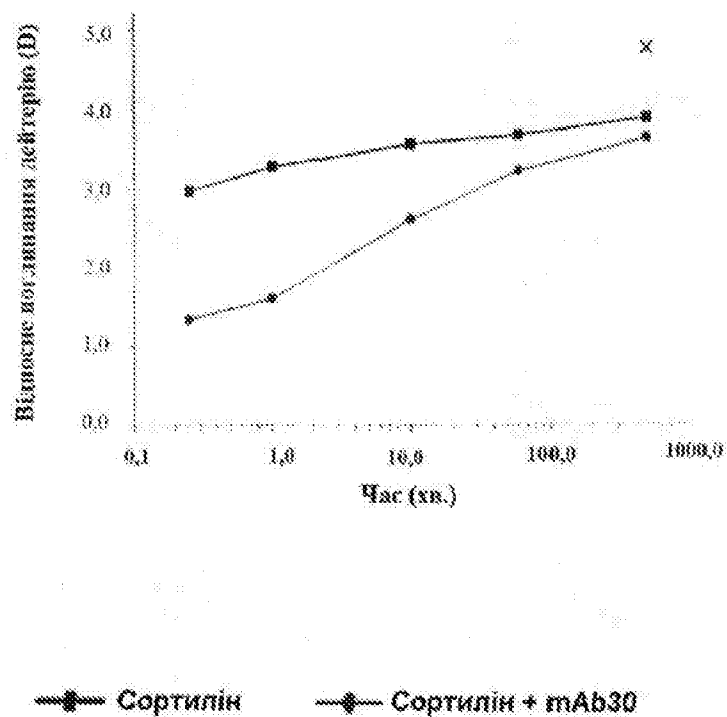
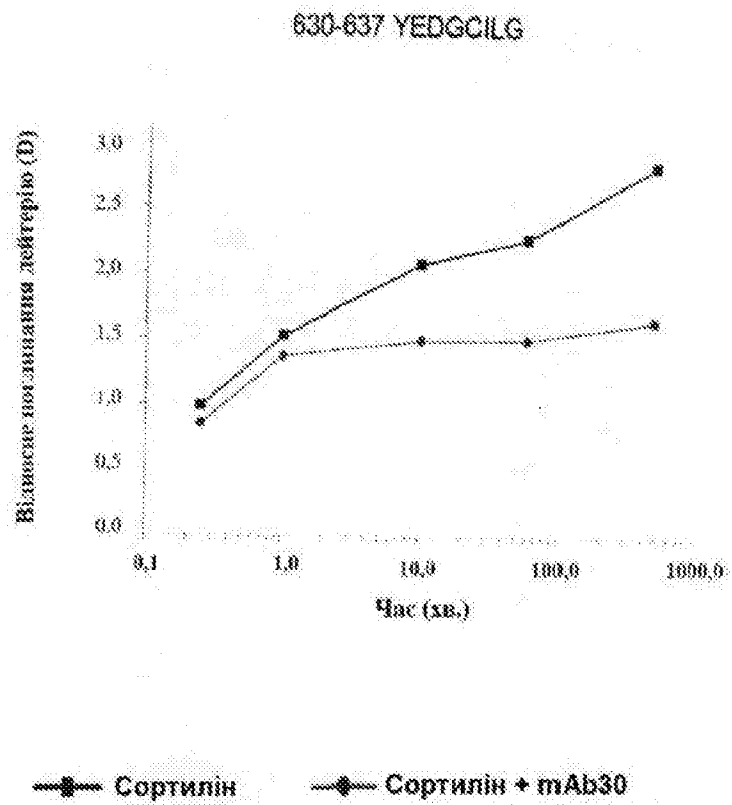


Fig.16a (2)



Фіг.16а (3)

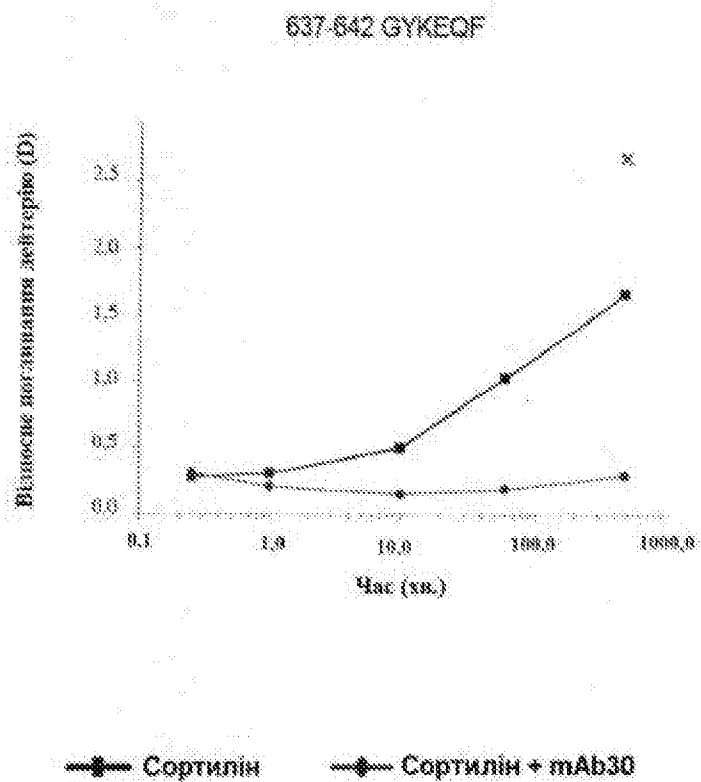


Fig.16a (4)

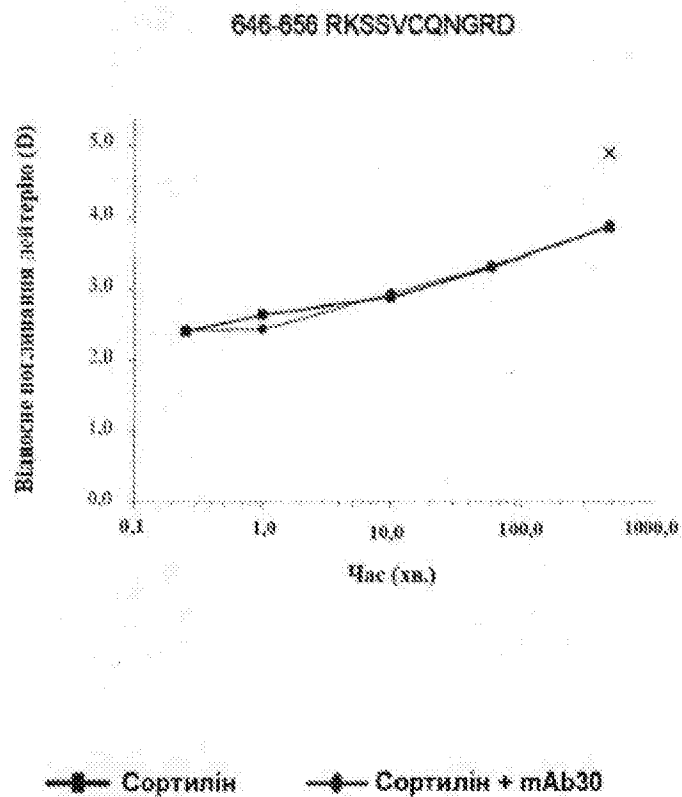


Fig.16a (5)

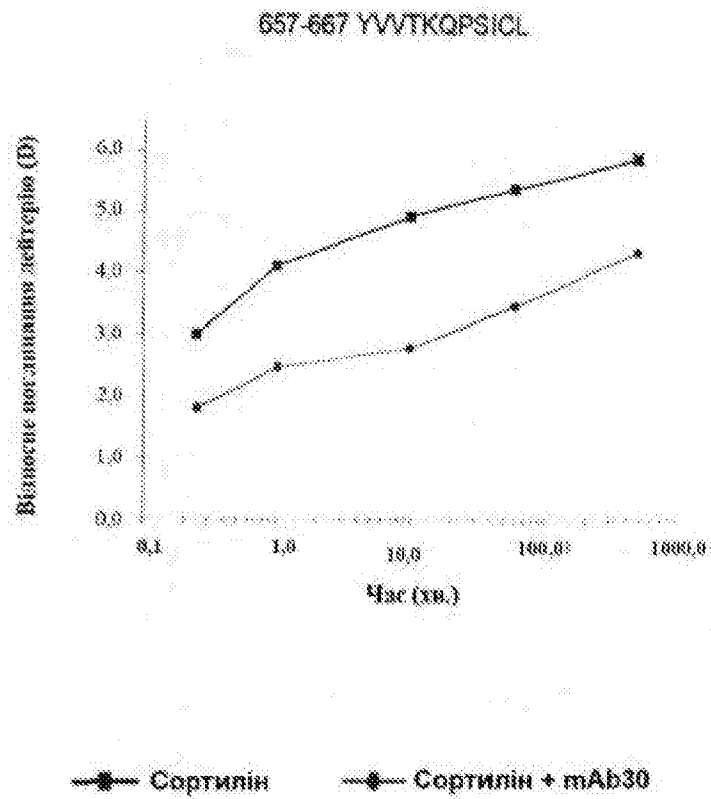


Fig.16a (6)

668-672 CSLED

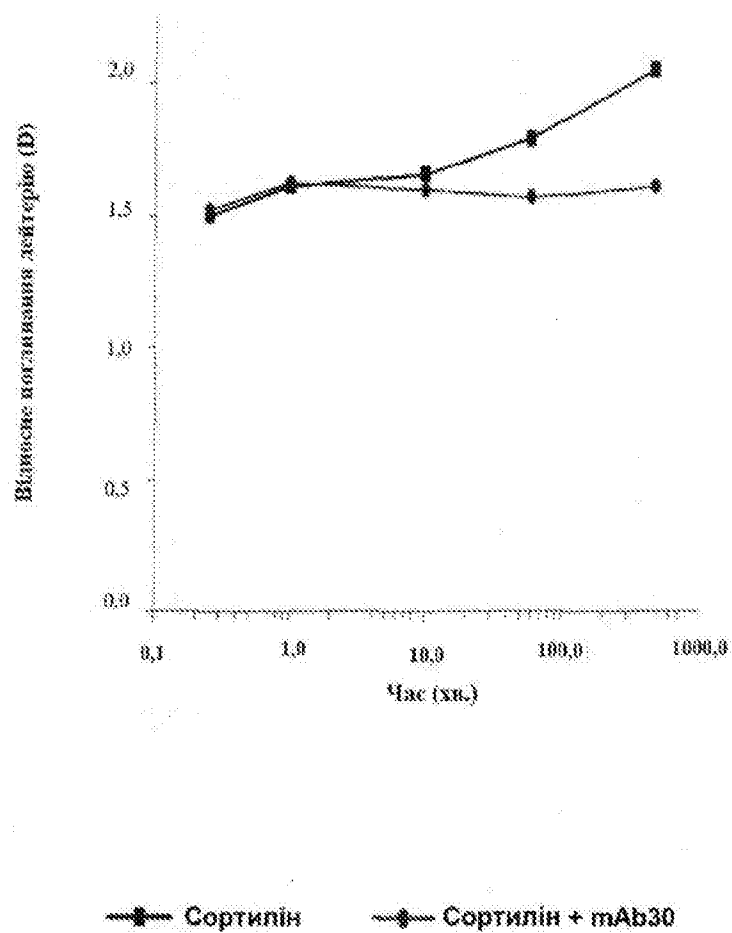
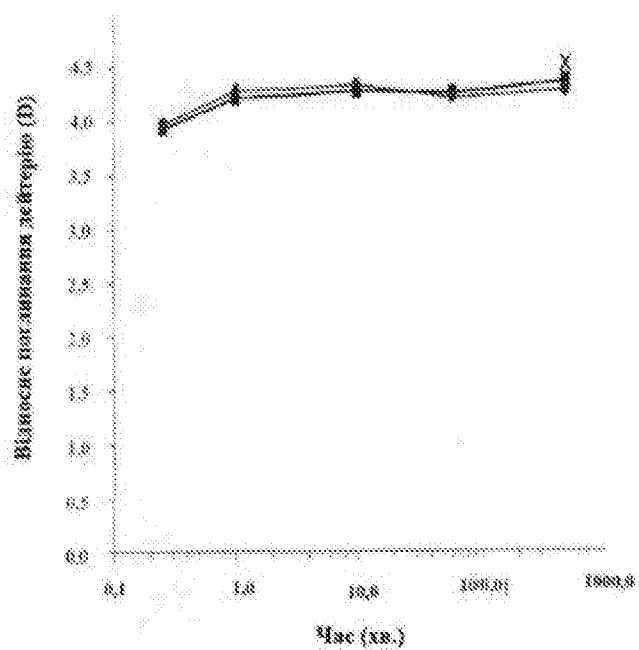


Fig.16b (1)

704-714 YGREENLTING



—●— Cортилін —●— Cортилін + mAb30

Fig.16b (2)

715-728 YRKIPGDKCQGGVN

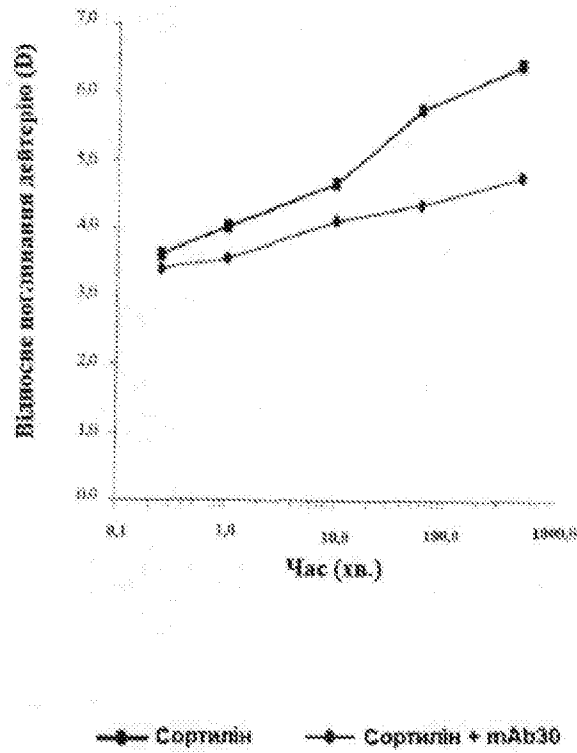


Fig.16b (3)

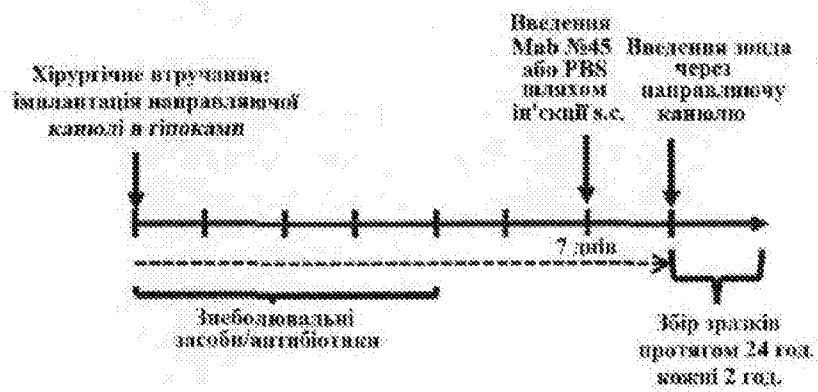
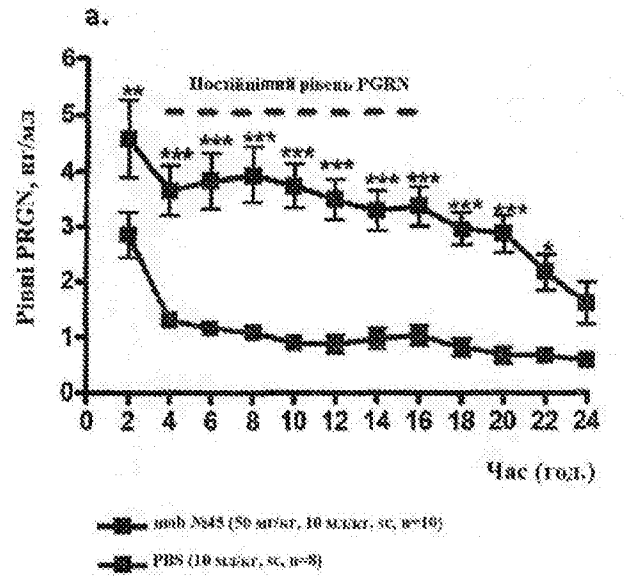
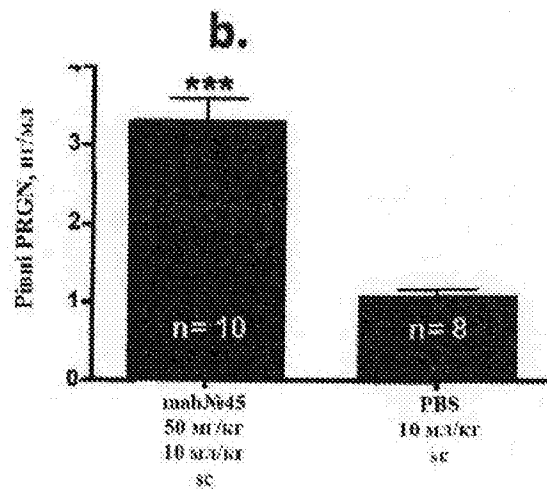


Fig.17



Фіг.18a



Фіг.18b

C.

Час (сек.)	msb-543			PRS		
	Y	SEM	N	Y	SEM	N
2	4.587163	0.663416	10	3.854475	0.411776	8
4	3.634223	0.453969	10	1.302813	0.129773	8
6	3.826151	0.409164	10	1.357348	0.105953	8
8	3.981064	0.405233	10	1.084373	0.102409	8
10	3.744573	0.306728	10	0.885935	0.139006	8
12	3.498750	0.360875	10	0.880561	0.161299	8
14	3.287708	0.362766	10	0.966836	0.190743	8
16	3.372367	0.365127	10	1.031850	0.180413	8
18	2.962828	0.298671	10	0.817949	0.158949	8
BS, 20	2.858518	0.343551	10	0.681344	0.153457	8
22	2.173472	0.322407	10	0.673761	0.122028	8
24	1.694464	0.377046	10	0.583756	0.123556	8

Fig.18c