



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118441** (13) **C2**  
(51) МПК (2018.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

A61P 25/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2015 04527</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>08.10.2013</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.01.2019</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/719,281, 61/840,432, 61/872,366, 61/711,204</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>26.10.2012, 27.06.2013, 30.08.2013, 08.10.2012</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US, US, US, US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>10.08.2015, Бюл.№ 15</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.01.2019, Бюл.№ 2</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2013/063945, 08.10.2013</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Барбоур Робін (US), Геймс Тіел Кейт Дора (US), Ніджар Тарлохан С. (US)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ПРОТЕНА БІОСАЄНСІЗ ЛІМІТЕД,</b> 25-28 North Wall Quay, Dublin, 1, Ireland (IE)</p> <p>(74) Представник: <b>Федорова Ірина Олександрівна, реєстр. №11</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2008103472 A2, 28.08.2008 US 2009208487 A1, 20.08.2009 WO 2005047860 A2, 26.05.2005 US 2009209432 A1, 13.08.2009 US 2012204275 A1, 09.08.2012 THOMAS NÄSSTRÖM et al. Antibodies against alpha-synuclein reduce oligomerization in living cells. Plos one, 2011, Vol. 6, no. 10, P. e27230 MIHARA M. et al. CTLA41g inhibits t cell - dependent b- cell maturation in murine systemic lupus erythematosus. J. clin. invest., 2000, Vol. 106, no. 1, P. 91-101 HACKETT J. et al. Recombinant mouse-human chimeric antibodies as calibrators in immunoassays that measure antibodies to toxoplasma gondii. J. clin microbiol., 1998, Vol. 36, no. 5, P. 1277-1284 YANG H. et al. Structural basis of immunosuppression by the therapeutic antibody daclizumab. Cell res., 2010, Vol. 20, no. 12, P. 1361-1371 CHOI J. Y. et al. Fine epitope mapping of monoclonal antibodies specific to human alpha-synuclein. Neuroscience letters, Limerick, IE, 2006, vol. 397, no. 1-2, P. 53-58</p>
---	--

**(54) АНТИТІЛО, ЩО РОЗПІЗНАЄ АЛЬФА-СИНУКЛЕЇН**

**(57) Реферат:**

Винахід належить до антитіла, що специфічно зв'язується з епітопом в інтервалі залишків 118-126  $\alpha$ -синуклеїну, фармацевтичної композиції, що містить зазначене антитіло, нуклеїнової

UA 118441 C2

кислоти, що кодує вказане антитіло, та застосування такого антитіла для приготування медикаменту для лікування або профілактики хвороби пов'язаної з тільцями Леві.

# ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка претендує, відповідно до 35 U.S.C. § 119(e), на пріоритет заявок США № 61/711,204 від 8 жовтня 2012 р, № 61/719,281 від 26 жовтня 2012 р, № 61/840,432 від 27 червня 2013 р. і № 61/872,366 від 30 серпня 2013 р, кожна з яких в усій повноті та для всіх цілей включена в цю заявку шляхом посилання.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

До даної заявки доданий Перелік послідовностей SEQ ID NOs: 1-40, включений до заявки в усій його повноті шляхом посилання. Даний перелік був складений у форматі ASCII дата \_\_\_\_\_, назва \_\_\_\_\_.txt та розмір \_\_\_\_\_ байтів.

## РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Синуклеїнопатії, відомі також як хвороби з тільцями Леві (LBD), характеризуються дегенерацією дофамінергічної системи, моторними альтераціями, погіршенням когнітивної функції та утворенням тілець Леві (LB) і/або нейритів Леві. (McKeith et al., *Neurology* (1996) 47:1113-24). До числа синуклеїнопатій входять хвороба Паркінсона (в тому числі ідіопатична хвороба Паркінсона), хвороба дифузних тілець Леві (DLBD: хвороба дифузних тілець Леві), відома також під назвою деменції з тільцями Леві (DLB), варіант хвороби Альцгеймера з тільцями Леві (LBV: Lewy body варіант), комбінована хвороба Альцгеймера-Паркінсона, чиста автоімунна недостатність і множинна системна атрофія (MSA; наприклад, олівопонтocereбелярна атрофія, стріатонігральна дегенерація та синдром Шая-Дрейджера). Декілька немоторних ознак і симптомів вважаються передвісниками синуклеїнопатії у продромальній фазі хвороб (тобто, у пресимптоматичний, субклінічний, преклінічний або премоторний період). Такими ранніми ознаками можуть бути, наприклад, порушення поведінки під час сну зі швидким рухом очей (REM sleep behavior disorder (RBD), втрата нюху і констипація (Mahowald et al., *Neurology* (2010) 75:488-489). Хвороби з тільцями Леві й надалі залишаються загальною причиною розладів руху та порушень когнітивних функцій у людей похилого віку (Galasko et al., *Arch. Neurol.* (1994) 51:888-95).

$\alpha$ -Синуклеїн є частиною великого сімейства білків, включаючи  $\beta$ - і  $\gamma$ - синуклеїн і синоретин.  $\alpha$ -Синуклеїн експресується в нормальному стані, зв'язаний з синапсами, і, як вважається, відіграє певну роль у невральній пластичності, навчанні та пам'яті. У деяких дослідженнях  $\alpha$ -синуклеїн асоціювався з центральною роллю у патогенезі хвороби Паркінсона (PD: Parkinson's disease). Цей білок може агрегуватися, утворюючи нерозчинні фібрили у патологічних умовах. Так, наприклад, синуклеїн акумулюється в тільцях Леві (Spillantini et al., *Nature* (1997) 388:839-40; Takeda et al., *J. Pathol.* (1998) 152:367-72; Wakabayashi et al., *Neurosci. Lett.* (1997) 239:45-8). Мутації в гені  $\alpha$ -синуклеїну сегрегуються разом з рідкими родинними формами паркінсонізму (Kruger et al., *Nature Gen.* (1998) 18:106-8; Polymeropoulos, et al., *Science* (1997) 276:2045-7). Надмірний синтез  $\alpha$ -синуклеїну у трансгенних мишей (Masliah et al., *Science* (2000) 287:1265-9) і дрозофіл (Feany et al., *Nature* (2000) 404:394-8) імітує кілька патологічних аспектів хвороби з тільцями Леві. Крім того, було припущено, що розчинні олігомери синуклеїну можуть бути нейротоксичними (Conway et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97:571-576; Volles et al., *J. Biochem.* (2003) 42:7871-7878). Акумулювання  $\alpha$ -синуклеїну з подібними йому морфологічними та нейрологічними альтераціями у таких різних видів і піддослідних тварин, як люди, миші і мухи, вказує на те, що ця молекула робить внесок у розвиток хвороб з тільцями Леві.

## СУТЬ ВІНАХОДУ

Даний винахід пропонує моноклональне антитіло, яке має три ділянки визначення комплементарності (CDR) легкого ланцюга відповідно до нумерації за Kabat і три ділянки визначення комплементарності (CDR) важкого ланцюга відповідно до нумерації за Kabat моноклонального антитіла 5C1, за умови, що кожна CDR-ділянка, відмінна від CDRH2, може мати до чотирьох делецій, інсерцій або замін, а CDRH2 може мати до шести делецій, інсерцій або замін. 5C1 є мишачим антитілом, яке характеризується варіабельною ділянкою важкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, що містить SEQ ID NO: 9, варіабельною ділянкою легкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, що містить SEQ ID NO: 24. Необов'язково, дане антитіло має три CDR-ділянки легкого ланцюга відповідно до нумерації за Kabat і три CDR-ділянки важкого ланцюга відповідно до нумерації за Kabat моноклонального антитіла 5C1. Необов'язково, дане моноклональне антитіло є гуманізованою, химерною або вініруваною формою моноклонального антитіла 5C1. Необов'язково, даним антитілом є Fab фрагмент або однокланцюгове Fv антитіло. Дане антитіло, необов'язково, має ізотип людського IgG1. Дане антитіло має, необов'язково, ізотип людського IgG2 або ізотип IgG4.

Даний винахід пропонує антитіло, яке містить зрілу варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, принаймні на 90 % ідентичну H4 (SEQ ID NO: 17), і зрілу варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, принаймні на 90 %

ідентичну L3 (SEQ ID NO: 31), де зазначене антитіло специфічно зв'язується з людським альфа-синуклеїном. Деякі з таких антитіл містять три CDR-ділянки за нумерацією Kabat послідовності SEQ ID NO: 9 і три CDR-ділянки за нумерацією Kabat послідовності SEQ ID NO: 24. У деяких антитілах принаймні одне з положень H11, H27, H30, H48, H73 займає, відповідно, L, Y, T, I, K, а принаймні одне з положень L12, L14 займає S. У деяких антитілах положення H11, H27, H30, H48 і H73 займають, відповідно, L, Y, T, I і K, а положення L12 і L14 займає S. У деяких антитілах, положення H67, H69, H91, H94 займає, відповідно, A, L, F і S. У деяких антитілах, положення H67, H69 і H94 займають, відповідно, A, L і S. У деяких антитілах положення H94 займає S. У деяких антитілах принаймні одне із положень L2, L45, L49, L87 займає, відповідно, V, K, N, F. У деяких антитілах, положення L2, L49 і L87 займають, відповідно, V, N і F. Деякі антитіла містять зрілу варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, принаймні на 95 % ідентичну H4 (SEQ ID NO: 17), і зрілу варіабельну ділянку легкого ланцюга, принаймні на 95 % ідентичну L3 (SEQ ID NO: 31). У деяких антитілах будь-які відмінності у CDR-ділянках варіабельної ділянки зрілого важкого ланцюга та варіабельної ділянки зрілого легкого ланцюга від H4 і L3 (SEQ ID NOS: 17 і 31, відповідно) лежать в інтервалі положень H60-H65.

Деякі антитіла містять зрілу варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, позначену H4 (SEQ ID NO: 17), і зрілу варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, позначену L3 (SEQ ID NO: 31). Деякі антитіла містять зрілу варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, позначену H5 (SEQ ID NO: 18), і зрілу варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, позначену L3 (SEQ ID NO: 31).

Будь-яке із описаних вище антитіл може мати принаймні одну мутацію у константній ділянці. Необов'язково, ця мутація зменшує фіксацію або активацію комплемента цією константною ділянкою. Необов'язково, зазначене антитіло має мутацію принаймні в одному із положень: 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 і 331 згідно з Європейською нумерацією. Антитіло, необов'язково, містить аланін у положеннях 318, 320 і 322.

У будь-якому із описаних вище антитіл варіабельна ділянка зрілого важкого ланцюга може бути злиною з константною ділянкою важкого ланцюга, а константна ділянка зрілого легкого ланцюга може бути злиною з константною ділянкою легкого ланцюга.

У будь-якому із описаних вище антитіл константна ділянка важкого ланцюга може бути мутованою формою природної людської константної ділянки, яка зменшила зв'язування з Fc $\gamma$  рецептором порівняно з природною людською константною ділянкою.

У будь-якому із описаних вище антитіл константна ділянка важкого ланцюга може бути ізотипом людського IgG1. У деяких антитілах алотипом є G1m3. У деяких антитілах алотипом є G1m1.

Даний винахід пропонує також спосіб гуманізації антитіла, який включає визначення послідовностей варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів мишачого антитіла 5C1, синтез нуклеїнової кислоти, що кодує гуманізований важкий ланцюг, який містить CDR-ділянки важкого ланцюга мишачого антитіла, та нуклеїнової кислоти, що кодує гуманізований легкий ланцюг, який містить CDR-ділянки легкого ланцюга мишачого антитіла, що експресує нуклеїнові кислоти у клітині-хазяїні для одержання гуманізованого антитіла.

Даний винахід пропонує також спосіб продукування гуманізованої, химерної або вініруваної форми антитіла 5C1, який включає культивування клітин, трансформованих нуклеїновими кислотами, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіла, в результаті чого клітина виділяє дане антитіло; та очистку зазначеного антитіла від середовища для культивування клітин.

Даний винахід пропонує також спосіб одержання клітинної лінії, що продукує гуманізовану, химерну або вінірувану форму антитіла 5C1, який включає введення вектора, що кодує важкий і легкий ланцюги даного антитіла і маркер селекції, у клітини; культивування клітин в умовах, що дозволяють здійснювати відбір клітин, які мають збільшену кількість копій вектора; виділення окремих клітин з відібраних клітин; і створення банку клітин, клонованих з окремої клітини, відібраної на основі її здатності забезпечувати вихід антитіла. Деякі з таких способів додатково включають культивування клітин в умовах селекції і відбір клітинних ліній, які за своєю природою експресують і секретують принаймні 100 мг/л/10<sup>6</sup> клітин/24 год.

Крім того, даний винахід пропонує фармацевтичну композицію, що містить будь-яке із вищезгаданих антитіл.

Даний винахід також пропонує спосіб лікування або профілактики хвороби з тільцями Леві, який включає призначення пацієнтові ефективної схеми застосування будь-якого із вищезгаданих антитіл і здійснення цим самим лікування або профілактики хвороби.

Даний винахід, крім того, пропонує спосіб зменшення утворення тілець Леві у пацієнта, що є

або може бути ураженим хворобою з тільцями Леві, який включає введення даному пацієнтові ефективної кількості будь-якого із вищезгаданих антитіл.

Даний винахід також пропонує спосіб лікування пацієнта, що є або може бути ураженим хворобою з тільцями Леві, що включає призначення пацієнтові ефективної схеми застосування будь-якого із вищезгаданих антитіл. У деяких способах зазначеною хворобою є хвороба Паркінсона. У деяких способах зазначеною хворобою є порушення поведінки під час сну зі швидким рухом очей (RBD). У деяких способах зазначеною хворобою є деменція з тільцями Леві (DLB) або множинна системна атрофія (MSA). У деяких способах здійснюється інгібування погіршення когнітивної функції пацієнта. У деяких способах здійснюється зменшення нейритних і/або аксональних агрегатів альфа-синуклеїну. У деяких способах здійснюється зменшення нейритної дистрофії пацієнта. У деяких способах зберігається синаптична і/або дендритна густина. У деяких способах у пацієнта зберігається синаптофізін і/або MAP2.

Даний винахід також пропонує спосіб інгібування агрегації синуклеїну або зменшення тілець Леві або агрегатів синуклеїну у пацієнта, що є або може бути ураженим хворобою з тільцями Леві, який включає введення пацієнтові ефективної кількості даного антитіла відповідно до визначеного для будь-якого із вищезгаданих антитіл. У деяких із таких способів зазначеною хворобою є хвороба Паркінсона. У деяких способах здійснюється інгібування погіршення когнітивної функції пацієнта. У деяких способах здійснюється зменшення нейритних і/або аксональних агрегатів альфа-синуклеїну. У деяких способах здійснюється зменшення нейритної дистрофії пацієнта. У деяких способах зберігається синаптична і/або дендритна густина. У деяких способах у пацієнта зберігається синаптофізін і/або MAP2.

Даний винахід також пропонує спосіб детектування тілець Леві у пацієнта, що є або може бути ураженим хворобою з тільцями Леві, який включає введення даному пацієнту ефективної кількості будь-якого із вищезгаданих антитіл, де це антитіло зв'язується з тільцями Леві, і детектування у пацієнта зв'язаного антитіла. Зазначене антитіло, необов'язково, є міченим.

[0001] Даний винахід також пропонує виділену нуклеїнову кислоту, вектор або вектори і клітини-хазяїни, придатні для кодування будь-якого із вищезгаданих антитіл.

#### КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

На Фіг. 1 показана амінокислотна послідовність варіабельної ділянки зрілого важкого ланцюга мишачого 5C1. CDR ділянки згідно визначення за Kabat, підкреслені та виділені жирним шрифтом.

На Фіг. 2 показана амінокислотна послідовність зрілої варіабельної ділянки легкого ланцюга мишачого 5C1. CDR ділянки згідно визначення за Kabat, підкреслені та виділені жирним шрифтом.

На Фіг. 3 показані результати пасивної імунотерапії антитілом 5C1 на функціонуванні пам'яті в зондовій частині тесту "Водний лабіринт Морріса".

На Фіг. 4 показані результати пасивної імунотерапії з використанням 5C1 на "швидкість" та "похибки" при тестуванні за допомогою круглої перекладини.

На Фіг. 5 показані результати ELISA аналізу в тестуванні щодо афінності різних гуманізованих антитіл 5C1.

На Фіг. 6 показані результати експерименту з аланін-сканувального мутагенезу, що використовувався для визначення епітопу  $\alpha$ -синуклеїну, зв'язаного антитілом 9E4. У верхній частині Фіг. 6 показані вестерн-блоти  $\alpha$ -синуклеїну повної довжини (дикого типу та індивідуальних точкових мутацій залишків 118-126), забарвлених антитілом 9E4 (ліва панель) та контрольним антитілом 1H7 (права панель). У нижній частині Фіг. 6 показаний епітоп  $\alpha$ -синуклеїну, зв'язаний антитілом 9E4.

На Фіг. 7 показані результати експерименту з аланін-сканувального мутагенезу, що використовувався для визначення епітопу  $\alpha$ -синуклеїну, зв'язаного антитілом 5C1. У верхній частині Фіг. 7 показані вестерн-блоти  $\alpha$ -синуклеїну повної довжини (дикого типу та індивідуальних точкових мутацій залишків 118-126), забарвлених антитілом 5C1 (ліва панель) та контрольним антитілом 1H7 (права панель). У нижній частині Фіг. 6 показаний епітоп  $\alpha$ -синуклеїну, зв'язаний антитілом 5C1.

На Фіг. 8 показані результати експерименту з аланін-сканувального мутагенезу, що використовувався для визначення епітопу  $\alpha$ -синуклеїну, зв'язаного антитілом 5D12. У верхній частині Фіг. 8 показані вестерн-блоти  $\alpha$ -синуклеїну повної довжини (дикого типу та індивідуальних точкових мутацій залишків 118-126), забарвлених антитілом 5D12 (ліва панель) та контрольним антитілом 1H7 (права панель). У нижній частині Фіг. 8 показаний епітоп  $\alpha$ -синуклеїну, зв'язаний антитілом 5D12.

На Фіг. 9 показана модель "із кульок на гілках" амінокислот  $\alpha$ -синуклеїну, наближених до сайтів зв'язування з 9E4, 5C1 і 5D12 антитілами.

## КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 є людський  $\alpha$ -синуклеїн дикого типу.

SEQ ID NO: 2 є домен неамілоїдного компоненту (NAC)  $\alpha$ -синуклеїну, взятий із роботи [Jensen et al. (1995)].

5 SEQ ID NO: 3 є домен неамілоїдного компоненту (NAC)  $\alpha$ -синуклеїну, взятий із роботи [Uéda et al. (1993)].

SEQ ID NO: 4 є амінокислотні залишки 118-129 людського  $\alpha$ -синуклеїну 5C1 пептидного імунотена.

VDPDNEAYEGGC

10 SEQ ID NO: 5 є нуклеотидною послідовністю, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга мишачого антитіла 5C1, з послідовністю, що кодує сигнальний пептид (підкреслений).

ATGGAAAGGCACTGGATCTTTCTCTTCTGTTATCAGTAACCTGGAGGTGTCCACTCCCAGGTC  
CAGCTGCAGCAGCTGCGGCTGAACCTGGCAAAACCTGGGACCTCAGTGCAGATGTCCTGCAAG  
GCTTCTGGCTACACCTTTACTAATTACTGGATGAACCTGGATAAAAGCGAGGCCTGGACAGGGTCT  
15 GGAATGGATTGGGGCTACTAATCCTAACAATGGTTATACTGACTACAATCAGAGGTTCAAGGACA  
AGGCCATATTAACCTGCAGACAAATCCTCCAATACAGCCTACATGCACCTGAGCAGCCTGACATCT  
GAAGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGTGGGGGGCACTTGGCTTACTGGGGCCAGGGGACTG  
TGGTCACTGTCTCTGCA

20 SEQ ID NO: 6 є варіабельна ділянка важкого ланцюга мишачого антитіла 5C1 з сигнальним пептидом (підкреслений).

MERHWIFLFLSVTGGVHSQVQLQQSGAELAKPGTSVQMSCKASGYTFTNYWMNWIKARPGQG  
LEWIGATNPNGYTDYNQRFKDKAILTADKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYFCASGGHLAYWGQGT  
VTVSA

25 SEQ ID NO: 7 є нуклеотидна послідовність, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга мишачого антитіла 5C1, з послідовністю, що кодує сигнальний пептид (підкреслено).

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTCCTGCTTCCAGCAGTGATGTT  
GTGATGACCCAAATCCACTCTACCTGTCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCA  
ATCTAGTCAGAGCCTTTTCCATAGTAAAGGAAACACCTATTTACATTGGTATCTGCAGAAAGCCAG  
GCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCAACAGGGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT  
30 CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCGGAGTGGAGGCTGAAGATCTG  
GGAGTTTATTTCTGTTCTCAAAGTGCACATGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGG  
AAATCAGA

SEQ ID NO: 8 є послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга мишачого антитіла 5C1 з сигнальним пептидом (підкреслений)

35 MKLPRVRLVLMFWIPASSSDVVMQTQIPLYLSVSPGDQASISCRSSQSLFHSKGNLYLHWYQLKPG  
QSPKLLINRVSNRFSVGPDRFSGSGSDFTLTKISGVEAEDLGVFCSQSAHVPWTFGGGKLEIR

SEQ ID NO: 9 є варіабельна ділянка зрілого важкого ланцюга мишачого антитіла 5C1 з CDR-ділянками (підкреслені). Підкреслені CDR-ділянки відповідають нумерації за Kabat, за винятком підкресленої ділянки CDRH1, яка відповідає змішаній нумерації за Kabat - Chothia.

40 QVQLQQSGAELAKPGTSVQMSCKASGYTFTNYWMNWIKARPGQGLEWIGATNPNGYTDYNQ  
RFKDKAILTADKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYFCASGGHLAYWGQGTVTVSA

SEQ ID NO: 10 є послідовність CDR1-ділянки важкого ланцюга антитіла 5C1.

NYWMN

SEQ ID NO: 11 є послідовність CDR2-ділянки важкого ланцюга антитіла 5C1.

45 ATNPNGYTDYNQRFKD

SEQ ID NO: 12 є послідовність CDR3-ділянки важкого ланцюга антитіла 5C1.

GGHLY

SEQ ID NO: 13 є людський каркас акцептора варіабельної ділянки важкого ланцюга (Acc#AAY42876.1).

50 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNNYAINWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTTTYAQKF  
QGRVTITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGNLNLWLPWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 14 є послідовність гуманізованого 5C1H1.

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPGQGLEWIGATNPNGYTDYNQ  
RFKDRATLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGHLYWGQGTLLTVSS

55 SEQ ID NO: 15 є послідовність гуманізованого 5C1H2.

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPGQGLEWIGATNPNGYTDYNQ  
RFKDRVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGHLYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 16 є послідовність гуманізованого 5C1H3.

60 QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPGQGLEWIGATNPNGYTDYNQ  
RFKDRATLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYFCASGGHLYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 17 є послідовність гуманізованого 5C1H4.

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYFTFTNYWMNWVRQAPGGGLEWIGATNPNNGYTDYNQ  
RFKDRATLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCASGGHLAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 18 є послідовність гуманізованого 5C1H5.

5 QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYFTFTNYWMNWVRQAPGGGLEWIGATNPNNGYTDYNQ  
RFKDRVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCASGGHLAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 19 є нуклеїновокислотна послідовність, що кодує гуманізоване 5C1H1 з послідовністю, що кодує сигнальний пептид (підкреслено).

10 ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAAGTGCCAGG  
TGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCA  
AGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGG  
GCCTGGAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGACTACAACCAGCGCTTCA  
AGGACCGCGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCCACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCC  
TGCCTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGCGCGGCCACCTGGCCTACTGGGGC  
15 CAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCC

SEQ ID NO: 20 є нуклеїновокислотна послідовність, що кодує гуманізоване 5C1H2 з послідовністю, що кодує сигнальний пептид (підкреслено).

20 ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAAGTGCCAGG  
TGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCA  
AGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGG  
GCCTGGAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGACTACAACCAGCGCTTCA  
AGGACCGCGTGACCATCACCGCCGACAAGTCCACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCT  
GCGCTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGCGCGGCCACCTGGCCTACTGGGGCC  
AGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCC

25 SEQ ID NO: 21 є нуклеїновокислотна послідовність, що кодує гуманізоване 5C1H3 з послідовністю, що кодує сигнальний пептид (підкреслено).

30 ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAAGTGCCAGG  
TGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCA  
AGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGG  
GCCTGGAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGACTACAACCAGCGCTTCA  
AGGACCGCGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCCACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCC  
TGCCTCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGCCTCCGGCGGCCACCTGGCCTACTGGGGCC  
AGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCC

35 SEQ ID NO: 22 є нуклеїновокислотна послідовність, що кодує гуманізоване 5C1H4 з послідовністю, що кодує сигнальний пептид (підкреслено).

40 ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAAGTGCCAGG  
TGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCA  
AGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGG  
GCCTGGAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGACTACAACCAGCGCTTCA  
AGGACCGCGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCCACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCC  
TGCCTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCTCCGGCGGCCACCTGGCCTACTGGGGCC  
AGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCC

SEQ ID NO: 23 є нуклеїновокислотна послідовність, що кодує гуманізоване 5C1H5 з послідовністю, що кодує сигнальний пептид (підкреслено).

45 ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAAGTGCCAGG  
TGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCA  
AGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGG  
GCCTGGAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGACTACAACCAGCGCTTCA  
AGGACCGCGTGACCATCACCGCCGACAAGTCCACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCT  
50 GCGCTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGCGCGGCCACCTGGCCTACTGGGGCC  
AGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCC

SEQ ID NO: 24 є послідовність варіабельної ділянки зрілого легкого ланцюга мишачого антитіла 5C1 з CDR-ділянками підкреслено. Підкреслені CDR-ділянки відповідають нумерації за Kabat.

55 DVVMTQIPLYLSVSPGDQASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWY LQKPGQSPKLLINRVSNRFS GVPD  
RFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLG VYFCSQSAHVPWTFGGG TKLEIR

SEQ ID NO: 25 є послідовність CDR1-ділянки легкого ланцюга антитіла 5C1.

RSSQSLFHSKGNTYLH

SEQ ID NO: 26 є послідовність CDR2-ділянки легкого ланцюга антитіла 5C1.

60 RVS NRFS

SEQ ID NO: 27 є послідовність CDR3-ділянки легкого ланцюга антитіла 5C1.

SQSAHVPWT

SEQ ID NO: 28 є людський акцепторний каркас варіабельної ділянки легкого ланцюга (Acc#CAB51293.1).

5 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDP  
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQALQTPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 29 є послідовність гуманізованого 5C1L1.

DVVMTQSPLSLSVSPGEPASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSPKLLINRVSNRFSGVDP  
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKVEIK

10 SEQ ID NO: 30 є послідовність гуманізованого 5C1L2.

DIVMTQSPLSLSVSPGEPASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVDP  
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 31 є послідовність гуманізованого 5C1L3.

15 DVVMTQSPLSLSVSPGEPASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSPQLLINRVSNRFSGVDP  
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 32 є послідовність гуманізованого 5C1L4.

DIVMTQSPLSLSVSPGEPASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVDP  
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKVEIK

20 SEQ ID NO: 33 є нуклеїновокислотна послідовність, що кодує гуманізований 5C1L1, з послідовністю, що кодує сигнальний пептид (підкреслено).

ATGGACATGCGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCGGCTCCT  
CCGGCGACGTGGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGTCCGTGTCCCCCGGCGAGCCCGCCT  
CCATCTCCTGCCGCTCCTCCAGTCCCTGTTCCACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTA  
CCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAAGCTGCTGATCAACCGCGTGTCCAACCGCTTCTCCGG  
25 CGTGCCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGCGT  
GGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTAATTCTGCTCCCAGTCCGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGG  
CGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 34 є нуклеїновокислотна послідовність, що кодує гуманізований 5C1L2, з послідовністю, що кодує сигнальний пептид (підкреслено).

30 ATGGACATGCGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCGGCTCCT  
CCGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGTCCGTGTCCCCCGGCGAGCCCGCCT  
CCATCTCCTGCCGCTCCTCCAGTCCCTGTTCCACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTA  
CCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAAGCTGCTGATCTACCGCGTGTCCAACCGCTTCTCCGG  
CGTGCCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGCGT  
35 GGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTAATTCTGCTCCCAGTCCGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGG  
CGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 35 є нуклеїновокислотна послідовність, що кодує гуманізований 5C1L3, з послідовністю, що кодує сигнальний пептид (підкреслено).

40 ATGGACATGCGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCGGCTCCT  
CCGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGTCCGTGTCCCCCGGCGAGCCCGCCT  
CCATCTCCTGCCGCTCCTCCAGTCCCTGTTCCACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTA  
CCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAAGCTGCTGATCAACCGCGTGTCCAACCGCTTCTCCGG  
CGTGCCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGCGT  
45 GGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTAATTCTGCTCCCAGTCCGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGG  
CGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 36 є нуклеїновокислотна послідовність, що кодує гуманізований 5C1L4, з послідовністю, що кодує сигнальний пептид (підкреслено).

50 ATGGACATGCGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCGGCTCCT  
CCGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGTCCGTGTCCCCCGGCGAGCCCGCCT  
CCATCTCCTGCCGCTCCTCCAGTCCCTGTTCCACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTA  
CCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAAGCTGCTGATCAACCGCGTGTCCAACCGCTTCTCCGG  
CGTGCCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGCGT  
GGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTAATTCTGCTCCCAGTCCGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGG  
55 CGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 37 є нуклеїновокислотна послідовність, що кодує типову константну ділянку людського IgG1.

60 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG  
GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGA  
ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA  
CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCACATCTGCAAC



GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA  
 CTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC  
 CCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC  
 GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT  
 5 GTCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC  
 GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC  
 CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC  
 GCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG  
 CTTCTATCCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAG  
 10 ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACA  
 AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA  
 CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAATGA

SEQ ID NO: 38 є амінокислотна послідовність типової константної ділянки людського IgG1.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
 15 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT  
 LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNVKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
 GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 39 є нуклеїновокислотна послідовність, що кодує типову константну ділянку  
 20 людського капа-легкого ланцюга.

ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC  
 GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG  
 ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA  
 CCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC  
 25 CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG  
 TTAG

SEQ ID NO: 40 є амінокислотна послідовність типової константної ділянки людського капа-  
 легкого ланцюга.

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST  
 30 YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

#### ВИЗНАЧЕННЯ

Базовим структурним блоком антитіла є тетрамер, що складається із субблоків. Кожний  
 тетрамер включає дві ідентичні пари поліпептидних ланцюгів, а кожна пара має один "легкий"  
 ланцюг (приблизно 25 кДа) та один "важкий" ланцюг (приблизно 50-70 кДа). Аміно-кінцева  
 35 частина кожного ланцюга включає варіабельну ділянку із приблизно 100 - 110 або більше  
 амінокислот, які, головним чином, відповідають за розпізнавання антигенів. Як тільки  
 відбувається їх синтез, ці варіабельні ділянки зазвичай приєднуються до розщеплюваного  
 сигнального пептиду. Варіабельні ділянки без сигнального пептиду іноді звуться зрілими  
 варіабельними ділянками. Таким чином, наприклад, вираз "зріла варіабельна ділянка легкого  
 40 ланцюга" означає варіабельну ділянку легкого ланцюга без сигнального пептиду легкого  
 ланцюга. Карбоксильна кінцева частина кожного ланцюга визначає константну ділянку, яка,  
 головним чином, відповідає за ефекторну функцію. Константна ділянка може містити CH1-  
 ділянку і/або шарнірну ділянку, і/або CH2-ділянку, і/або CH3-ділянку.

Легкі ланцюги поділяються на типи: капа і лямбда. Важкі ланцюги поділяються на типи: гама,  
 45 му, альфа, дельта та епсілон, визначаючи відповідні ізотипи антитіл: IgG, IgM, IgA, IgD і IgE. У  
 легких і важких ланцюгах варіабельні та константні ділянки з'єднуються одна з одною "J"-  
 ділянкою, що складається із 12 або більше амінокислот, а важкі ланцюги містять також "D"  
 ділянку із 10 або більше амінокислот, що більш детально описано в публікації (Fundamental  
 Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7), включений тут в усій її повноті  
 50 і для всіх цілей шляхом посилання.

Зрілі варіабельні ділянки кожної пари із легкого/важкого ланцюгів утворюють сайт  
 зв'язування антитіла. Таким чином, інтактне антитіло має два сайти зв'язування. За винятком  
 біфункціональних або біспецифічних антитіл, ці два сайти зв'язування є однаковими. Усі  
 вищезгадані ланцюги демонструють однакову загальну структуру відносно консервованої  
 55 каркасної ділянки (FR), з'єднаної трьома гіперваріабельними ділянками, які звуться також  
 ділянками визначення комплементарності або CDR-ділянками (CDR: ділянка визначення  
 комплементарності). CDR-ділянки із двох ланцюгів кожної пари вишиковуються каркасними  
 ділянками, дозволяючи здійснювати зв'язування зі специфічним епітопом. Від N-кінця до C-кінця  
 як легкий, так і важкий ланцюги містять ділянки FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4.  
 60 Приписування амінокислот до кожної з ділянок відповідає нумерації Kabat (Sequences of

Proteins of Immunological Interest. National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), або Chothia (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989). У широко використовуваній нумерації Kabat відповідним кислотним залишкам у різних важких ланцюгах або різних легких ланцюгах приписуються однакові номери (наприклад, H83 означає

положення 83 за нумерацією Kabat у зрілій варіабельній ділянці важкого ланцюга; подібним чином, L36 означає положення 36 за нумерацією Kabat у зрілій варіабельній ділянці легкого ланцюга). У даному описі, якщо не зазначено іншого, всюди використовується нумерація Kabat, якою вказуються положення у варіабельній ділянці даного антитіла.

Термін "антитіло" у даному описі стосується інтактних антитіл та їхніх зв'язуючих фрагментів. Зазвичай фрагменти антитіла конкурують з інтактним антитілом, із якого вони були одержані, за специфічне зв'язування з мішенню. Фрагментами можуть бути окремі важкі ланцюги, окремі легкі ланцюги, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fv, одноланцюгові антитіла та однодоменні антитіла. Однодоменними варіабельними антитілами можуть бути варіабельні ділянки важких ланцюгів (VH-ділянки), відокремлені від їхніх VL партнерів, тобто варіабельних ділянок легких ланцюгів, (і навпаки) у звичайних антитілах (Ward et al., 1989, Nature 341: 544-546), а також VH-ділянки (які іноді позначаються скороченням VHH) від таких видів, як Camelidae або білої риби (наприклад, піщаної акули), у якій VH-ділянки не є зв'язаними з VL-ділянками (див., наприклад, WO 9404678). Однодоменні антитіла, у яких один ланцюг є відокремленим від його природних партнерів, іноді зветься dAB-антитілами, а однодоменні антитіла із Camelidae або білої риби іноді зветься "нанотілами". Константні ділянки або частини константних ділянок можуть, але не обов'язково, бути наявними в однодоменних антитілах. Наприклад, природні, з однією варіабельною ділянкою, антитіла із Camelidae включають VHH варіабельну ділянку, та CH2 і CH3 константні ділянки. Однодоменні антитіла, наприклад нанотіла, можуть піддаватися гуманізації аналогічними методами на звичайні антитіла. dAB-антитіла зазвичай отримуються із антитіл людського походження. Фрагменти можна одержувати за допомогою методів рекомбінантних ДНК або методом ферментативного або хімічного розділення інтактних імуноглобулінів.

Використовуваний у даному описі термін "антитіло" охоплює своїм значенням також біспецифічні і/або гуманізовані антитіла. Біспецифічним або біфункціональним антитілом зветься штучне гібридне антитіло, яке має дві різні пари із важкого та легкого ланцюгів і два різні сайти зв'язування, що описано, наприклад, у роботах (Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-53 (1992)). У деяких біспецифічних антитілах двома різними парами із важкого та легкого ланцюгів можуть бути пара із важкого ланцюга та легкого ланцюга гуманізованого 5C1-антитіла і пара із важкого ланцюга та легкого ланцюга, специфічна для іншого епітопа на альфа-синуклеїні, відмінного від того, що зв'язується антитілом 5C1.

У деяких біспецифічних антитілах однією парою із важкого ланцюга та легкого ланцюга є гуманізоване 5C1-антитіло, яке більш детально описано нижче, а інша пара із важкого та легкого ланцюгів утворена із антитіла, що зв'язується з експресованим на гематоенцефалічному бар'єрі рецептором, таким як інсуліновий рецептор, рецептор інсуліноподібного фактора росту (IGF), лептиновий рецептор або ліпопротеїновий рецептор, або трансфериновий рецептор (Friden et al., PNAS 88:4771-4775, 1991; Friden et al., Science 259:373-377, 1993). Таке біспецифічне антитіло може переноситися через гематоенцефалічний бар'єр шляхом рецепторно-опосередкованого трансцитозу. Поглинання біспецифічного антитіла мозком може бути підсилено шляхом надання біспецифічному антитілу здатності зменшувати його афінність по відношенню до рецептора гематоенцефалічного бар'єра. Зменшення афінності до рецептора дозволяє досягати більш широкого розподілу антитіл у мозку, див., наприклад, (Atwal. et al. Sci. Trans. Med. 3, 84ra43, 2011; Yu et al. Sci. Trans. Med. 3, 84ra44, 2011).

До числа типових біспецифічних антитіл можна віднести також: (1) антитіло з двома варіабельними доменами (DVD-Ig), у якому кожний легкий ланцюг і важкий ланцюг містить два варіабельні домени у тандемі крізь короткий пептидний зв'язок (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig<sup>TM</sup>) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) антитіло Tandab, в якому асоційовані два одноланцюгові димери антитіл (diabodies) з утворенням тетравалентного біспецифічного антитіла, яке має два сайти зв'язування для кожного із антигенів-мішеней; (3) flexibody, яке є комбінацією scFvs з димером антитіл у мультівалентній молекулі; (4) молекула під назвою "dock and lock" (причалування та замикання), в основі якої лежить "домен, що димеризує та приймає" у протеїнкіназі A, яка при застосуванні до антитіл Fab може давати тривалентний біспецифічний білок зв'язування, що складається із двох ідентичних Fab-фрагментів, зв'язаних з відмінним від них Fab-фрагментом; (5) молекула під назвою "Scorpion", яка містить, наприклад,

два scFv, злиті з обома кінцями людської Fc-ділянки. Підходящими платформами для готування біспецифічних антитіл можуть бути, наприклад, BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab and Mab2 (F-star), IgG1 зі специфічним чином сконструйованою Fc-ділянкою (Xencor) або DuoBody (на основі обміну плечима Fab, Genmab).

5 "Антиген" є субстанцією, з якою специфічно зв'язується антитіло.

"Епітопом" зветься сайт в антигені, через який з цим антигеном зв'язується антитіло. У білкових антигенах епітоп може утворюватися із суміжних амінокислот або несуміжних амінокислот, які стають суміжними внаслідок потрібного складування одного або більше білків. Епітопи, утворені із суміжних амінокислот, зазвичай перебувають в умовах дії на них розчинників, що денатурують, у той час як епітопи, утворені потрібним складанням, зазвичай втрачаються після обробки розчинниками, що денатурують. Епітоп зазвичай містить принаймні 2, 3, а частіше - принаймні 5 або 8-10 амінокислот в унікальній просторовій конформації. Для дослідження просторової конформації епітопів можуть використовуватися, наприклад, методи рентгенівської кристалографії та 2-двовимірного ядерного магнітного резонансу, див., наприклад, (Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)). Епітоп може мати С-кінцевий залишок або N-кінцевий залишок. Крім того, епітоп може також включати у себе, але не обов'язково, вільну аміногрупу поліпептиду або вільну карбоксильну групу поліпептиду. Таким чином, епітоп може включати у себе С-кінцевий або N-кінцевий залишок, але необов'язково містити, відповідно, вільну карбоксильну групу або вільну аміногрупу. Специфічність зв'язування антитіла в деяких випадках визначається інтервалом амінокислот. Так, твердження того, що певне антитіло зв'язується з епітопом в інтервалі амінокислот 118-126 послідовності SEQ ID NO:1, означає, що даний епітоп розташований в указаному інтервалі амінокислот, включно з тими амінокислотами, які визначають зовнішні межі цього інтервалу. Але це не обов'язково означає, що кожна амінокислота в цьому інтервалі є частиною даного епітопа. Таким чином, наприклад, епітоп в інтервалі амінокислот 118-126 послідовності SEQ ID NO:1 може складатися із амінокислот 118-124, 119-125, 120-126, 120-124 або 120-122 серед інших сегментів послідовності SEQ ID NO:1.

Антитіла, які розпізнають однакові епітопи або епітопи, що перекриваються, можуть бути ідентифіковані за допомогою простого імуноаналізу, який показує здатність одного антитіла конкурувати з іншим антитілом за зв'язування з антигеном-мішенню. Епітоп даного антитіла може визначатися також за допомогою рентгенівської кристалографії антитіла, зв'язаного з його антигеном; у такий спосіб ідентифікують контактні залишки (оскільки епітоп визначається залишками, які утворюють контакт). В альтернативному варіанті два антитіла мають однакові епітопи, якщо всі амінокислотні мутації в даному антигені, що зменшують або ліквідують зв'язування одного антитіла, зменшують або ліквідують зв'язування іншого антитіла. Два антитіла мають епітопи, що перекриваються, якщо одні й ті самі амінокислотні мутації, які зменшують або ліквідують зв'язування одного антитіла, зменшують або ліквідують зв'язування іншого антитіла.

Конкуренцію між антитілами досліджують шляхом випробувань, у яких антитіло, яке піддається випробуванню, інгібує специфічне зв'язування еталонного антитіла з загальним антигеном, див., наприклад, (Junghans et al. (1990), Cancer Res. 50:1495). Випробуване антитіло конкурує з еталонним антитілом, якщо надлишок випробуваного антитіла (наприклад, принаймні 2х, 5х, 10х, 20х або 100х) інгібує зв'язування еталонного антитіла принаймні на 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % за результатами аналізу на конкурентне зв'язування. До числа антитіл, ідентифікованих аналізом на конкурентне зв'язування (антитіла, що конкурують) входять антитіла, які зв'язуються з таким самим епітопом, що й еталонне антитіло, та антитіла, які зв'язуються з сусіднім епітопом, достатньо близьким до епітопа, зв'язаного з еталонним антитілом, для того, щоб виникла стерична невідповідність.

Антитіла за даним винаходом зазвичай зв'язуються зі своєю мішенню з константою афінності принаймні  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  або  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>. Специфічність такого зв'язування виражається в тому, що воно є помітно вищим за свою величиною і відмінним від неспецифічного зв'язування, яке відбувається принаймні з однією неспорідненою мішенню. Специфічне зв'язування може бути результатом утворення зв'язків між особливими функціональними групами або в особливій просторовій адаптованості (наприклад, типу "замок-ключ"), у той час як неспецифічне зв'язування є зазвичай результатом дії сил ван дер Ваальса. Проте специфічне зв'язування не обов'язково передбачає, що дане моноклональне антитіло зв'язується лише з однією і тільки з однією мішенню.

При порівняльному аналізі послідовностей антитіл визначають відсоткову ідентичність цих послідовностей з послідовностями антитіл, які вишикувані у максимальній відповідності до нумерації Kabat. Після аналізу, в якому досліджувана ділянка антитіла (наприклад, уся зріла

варіабельна ділянка важкого або легкого ланцюга) порівнюється з такою самою ділянкою еталонного антитіла, відсоткова ідентичність між досліджуваною та еталонною ділянками антитіла визначається кількістю положень, які займає одна і та сама амінокислота як на досліджуваній, так і на еталонній ділянках антитіла, розділеним на загальну кількість порівняних положень цих двох ділянок без урахування пробілів, та помноженим на 100 (для вираження у відсотках).

Для поділу амінокислотних заміни на консервативні та неконсервативні, амінокислоти розподіляють по групах: Група I (гідрофобні бічні ланцюги): met, ala, val, leu, ile; Група II (нейтральні гідрофільні бічні ланцюги): cys, ser, thr; Група III (кислотні бічні ланцюги): asp, glu; Група IV (основні бічні ланцюги): asn, gln, his, lys, arg; Група V (залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга): gly, pro; Група VI (ароматичні бічні ланцюги): trp, tyr, phe. Консервативними є заміни амінокислот, які належать до однієї й тієї ж групи. Неконсервативними є заміни амінокислот, які належать до однієї групи, на амінокислоті, які належать до іншої групи.

Моноклональні антитіла постачаються зазвичай в ізольованій формі. Це означає, що вироблене антитіло принаймні на 50 %(мас.) є очищеним від шкідливих протеїнів та інших забруднень, які виникають у процесі виробництва та очистки. Але не виключено, що корисний продукт може об'єднуватися з надлишками фармацевтично прийнятного носія (носіїв) або інших допоміжних матеріалів, призначених для полегшення використання продукту. У деяких випадках моноклональні антитіла принаймні на 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %(мас.) є очищеними від агрегатів і фрагментів таких моноклональних антитіл або інших білків і забруднень. Деякі із таких моноклональних антитіл можуть містити агрегати або фрагменти, але принаймні на 99 %(мас.) є чистими від інших білків і забруднень.

Композиції або способи, "які містять" або "які включають" один або більше зазначених елементів, можуть містити або включати у себе інші елементи, які не були спеціально зазначені. Наприклад, композиція, яка містить антитіло, може містити одне лише антитіло або антитіло в комбінації з іншими інгредієнтами.

Зазначення інтервалу величин включає всі цілі числа усередині або на кінцях інтервалу та всі субінтервали, визначені цілими числами усередині інтервалу.

Якщо із контексту з очевидністю не випливає іншого, то термін "приблизно" передбачає включення величин у межах стандартної похибки вимірювань (SEM) указаної величини.

Статистична значущість означає  $p \leq 0,05$ .

Термін "пацієнт" охоплює цим значенням будь-яку людину або іншого ссавця, що отримує профілактичне або терапевтичне лікування.

Людина або тварина має підвищений ризик захворювання на ту або іншу хворобу, якщо вона має принаймні один відомий фактор ризику (наприклад, генетичний, біохімічний, сімейний, ситуаційна небезпека), який ставить особин з цим фактором ризику під статистично значущий ризик розвитку хвороби, що є більшим, ніж у особин, які не мають такого фактора ризику.

Термін "суб'єктивний симптом" означає суб'єктивну ознаку хвороби, наприклад, зміну ходи, помічену пацієнтом. Термін "об'єктивний симптом" означає об'єктивну ознаку хвороби, що спостерігається лікарем.

Термін "когнітивна функція" означає відокремлені або всі разом ментальні процеси, такі як увага, пам'ять, відтворення та розуміння мови, вирішування задач і прояви інтересу до навколишнього оточення і самопомоги.

Вираз "посилена когнітивна функція" або "поліпшена когнітивна функція" означає поліпшення відносно базового рівня, наприклад, діагнозу або стимулювання лікування. Вираз "погіршення когнітивної функції" означає погіршення функції відносно базового рівня.

На тваринних моделях, наприклад, щурів або мишей когнітивна функція може вимірятися за допомогою різноманітних методів, включаючи методи лабіринту, в яких піддослідний об'єкт використовує просторову інформацію (наприклад, водного лабіринту Морріса, круглого лабіринту Барнеса, припіднятого радіального лабіринту, Т-подібного лабіринту та інші), створення умов страху, методу активного уникнення, методу освітленого відкритого поля, вимірювача активності в темряві, припіднятого хрестоподібного лабіринту, двокамерного тесту на досліджувану поведінку або тесту на примусове плавання.

У людей когнітивна функція може вимірятися за допомогою будь-якого стандартного тесту. З підходящими тестами або випробуваннями когнітивної функції можна ознайомитися в роботі (Ruorpila and Suutama, Scand. J. Soc. Med. Suppl. 53,44-65, 1997), де докладно описані, зокрема, стандартизовані психометричні тести (наприклад, шкала пам'яті Векслера, шкала Векслера вимірювання інтелекту дорослих, стандартні прогресивні матриці Равена, тест Шай-Терстоуна (Schae-Thurstone) на ментальну здатність дорослих), нейрофізіологічні тести (наприклад, Luria-Nebraska), метакогнітивні самооцінки (наприклад, опитування для

метапам'яті), візуально-просторові скринінг-тести (наприклад, фігури Проппелрейтера, розпізнавання часу, малювання і ліквідація стільників), когнітивні скринінг-тести (наприклад, мінімальна шкала Фольштейна (Folstein) оцінки ментального стану) і тести на час реакції. Серед інших стандартних тестів на когнітивну функцію можна назвати когнітивну субшкалу оцінки хвороби Альцгеймера (ADAS-cog); шкала загального клінічного враження від змін (CIBIC-plus scale); шкала для оцінки повсякденної активності при хворобі Альцгеймера під час кооперативного дослідження (ADCS-ADL); мінімальний екзамен ментального стану (MMSE); нейропсихіатрія (NPI); шкала клінічної оцінки недоумства (CDR); Кембриджський програмний пакет нейрофізіологічного тестування (Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB)) або шкала клінічної оцінки для людей похилого віку (Sandoz Клінічн Assessment-Geriatric (SCAG)), тест Струпа (Stroop Test), тест на промальовування шляху (Trail Making), тест Векслера на запам'ятовування груп цифр (Wechsler Digit Span) і комп'ютеризований когнітивний тест CogState. Крім того, когнітивна функція може бути виміряна за допомогою методів зображень, таких як позитрон-емісійна томографія (PET), функціональна магніто-резонансна томографія (fMRI), однофотонна емісійна комп'ютерна томографія (Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT)) та будь-які інші методи томографії, які дозволяти вимірювати роботу мозку.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

##### I. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Даний винахід пропонує моноклональне антитіло 5C1 та споріднені з ним антитіла, зокрема, антитіла що зв'язуються з однаковим епітопом в  $\alpha$ -синуклеїні (а саме з епітопом 118-126  $\alpha$ -синуклеїну). Антитіла за винаходом є корисними, наприклад, у лікуванні розладів, зв'язаних з накопиченням  $\alpha$ -синуклеїну, особливо з накопиченням його в тільцях Леві. До числа таких розладів, зокрема, належать хвороби з тільцями Леві, такі як хвороба Паркінсона, хвороба дифузних тілець Леві (DLBD), варіант хвороби Альцгеймера з тільцями Леві (LBV), комбінована хвороба Альцгеймера-Паркінсона, чистий автоімунний розлад і множинна системна атрофія (MSA). Антитіла згідно з винаходом можуть використовуватися також у діагностиці хвороб з тільцями Леві.

##### II. МОЛЕКУЛИ-МІШЕНІ

Природним людським  $\alpha$ -синуклеїном дикого типу є пептид, що складається із 140 амінокислот вишикуваних у такій послідовності:

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQV  
TNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPS  
EEGYQDYEP EA (SEQ ID NO:1)

(Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11282-6, 1993; Ідентифікаційний номер доступу в Генбанку: P37840). Цей білок має три розпізнаних домени: повторюваний домен KTKE в інтервалі амінокислот 1-61, домен NAC (неамілоїдного компонента), який займає інтервал амінокислот 60-95, і С-кінцевий кислотний домен, який займає інтервал від 98 до 140 амінокислоти. Йенсен та ін. (1995) повідомляли, що NAC має таку амінокислотну послідовність:

EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFV (SEQ ID NO: 2)

(Jensen et al., Biochem. J. 310.1: 91-94; Ідентифікаційний номер доступу в Генбанку S56746).

Але Уеда та ін. (1993) повідомляли, що NAC має таку амінокислотну послідовність:

KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGS (SEQ ID NO: 3)

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

Якщо із контексту даного опису з очевидністю не випливає іншого, то під визначенням " $\alpha$ -синуклеїн або його фрагменти" маються на увазі також вищезгадані природні людські амінокислотні послідовності дикого типу та їхні людські алельні варіанти, зокрема ті, що асоціюються з хворобою з тільцями Леві (наприклад, E46K, A30P і A53T, у яких перша літера вказує амінокислоту в SEQ ID NO:1, цифри вказують номер положення кодону в SEQ ID NO:1, а друга літера вказує амінокислоту в алельному варіанті). Такі варіанти можуть бути наявними в індивідуальній формі або в будь-якій комбінації. Індуковані мутації E83Q, A90V, A76T, які підсилюють агрегацію альфа-синуклеїну, також можуть бути наявними в індивідуальній формі або в комбінації одна з одною і/або з людськими алельними варіантами E46K, A30P і A53T.

##### III. ХВОРОБИ З ТІЛЬЦЯМИ ЛЕВІ

Хвороби з тільцями Леві (LBD) характеризуються дегенерацією дофамінергічної системи, моторними альтераціями, когнітивними погіршеннями та утворенням тілець Леві (LB) (McKeith et al., Neurology (1996) 47:1113-24). Тільця Леві являють собою сферичні білкові відкладення, які виявляються в білкових клітинах. Наявність їх у мозку порушує нормальну роботу мозку, перериваючи дію хімічних месенджерів включно з ацетилхоліном і дофаміном. До числа хвороб з тільцями Леві входять хвороба Паркінсона (включаючи ідіопатичну хворобу Паркінсона),

хвороба дифузних тілець Леві (DLBD), відома також як деменція з тільцями Леві (DLB), варіант хвороби Альцгеймера з тільцями Леві (LBV), комбінована хвороба Альцгеймера-Паркінсона та множинна системна атрофія (MSA; наприклад, олівопontoцеребелярна атрофія, стріатонігральна дегенерація та синдром Шая-Дрейджера). DLBD також супроводжується симптомами хвороб Альцгеймера і Паркінсона. Від хвороби Паркінсона хвороба DLBD відрізняється, головним чином, локацією тілець Леві. При DLBD тільця Леві формуються, головним чином, у корі головного мозку, у той час як при хворобі Паркінсона вони утворюються, головним чином, у чорній субстанції. Серед інших хвороб з тільцями Леві можна назвати чисту автоімунну недостатність, дисфагію з тільцями Леві, побічну LBD-хворобу, успадковану LBD-хворобу (наприклад, мутації  $\alpha$ -синуклеїнового гена, хвороби Паркінсона PARK3 і PARK4).

#### IV. АНТИТІЛА

##### A. Специфічність зв'язування і функціональні властивості

5C1 є типовим антитілом за винаходом, зрілі варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів якого позначаються номерами послідовностей SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 24, відповідно. Даний винахід пропонує також антитіла, які конкурують з антитілом 5C1 за зв'язування з  $\alpha$ -синуклеїном або які зв'язуються з таким самим або з таким, що з ним перекривається, епітопом, що і 5C1, і мають аналогічні функціональні властивості, такі як зменшення нейронних агрегатів  $\alpha$ -синуклеїну, поліпшення когнітивної функції і/або збереження синаптичної густини і/або дендритної густини.

Інші антитіла з такою самою специфічністю зв'язування можна одержувати шляхом імунізації мишей  $\alpha$ -синуклеїном або його фрагментом (наприклад, фрагментом, який містить амінокислотні залишки 118-126 або їх частину), та добору отриманих антитіл за зв'язуванням з  $\alpha$ -синуклеїном, можливо в конкуренції з антитілом 5C1. Використовувати при цьому фрагмент є більш підходящим для продукування антитіла з таким самим епітопом, що антитіло 5C1. Антитіла можуть добиратися також за їхнім ефектом: (1) в  $\alpha$ -синуклеїн-трансгенних моделях на гризунах, які піддаються поведінковим випробуванням, таким як тест на водний лабіринт Морріса (MWM: Morris Water Maze) або тест на проходження по горизонтальній балці, і/або імунологічний аналіз на виявлення  $\alpha$ -синуклеїну,  $\alpha$ -агрегацій синуклеїну, синаптофізину, MAP2 і/або PSD95 у тканинах мозку; (2) у піддослідних моделях на гризунах або інших тваринах, окрім людей, на захворювання, яке характеризується накопиченням  $\alpha$ -синуклеїну, шляхом поведінкового аналізу за допомогою тесту на водний лабіринт Морріса (MWM) або тесту на проходження по горизонтальній балці і/або імунологічного аналізу на виявлення  $\alpha$ -синуклеїну,  $\alpha$ -агрегацій синуклеїну, синаптофізину, MAP2 і/або PSD95 у тканинах мозку; і/або (3) у людей, які мають стан, асоційований з накопиченням  $\alpha$ -синуклеїну, шляхом відповідного поведінкового аналізу. В альтернативному варіанті або в додаток до будь-якого із вищеперелічених методів може проводитися скринінг антитіл проти мутагенізованих форм  $\alpha$ -синуклеїну та ідентифікація таких із них, які демонструють такий самий або подібний профіль зв'язування, що й у антитіла 5C1, для збирання мутаційних змін. Цими мутаціями може бути систематична заміна на аланін (або серин, якщо аланін вже є наявним) одного залишку кожного разу або більш широких просторових інтервалів крізь весь  $\alpha$ -синуклеїн або крізь його відтинки, на якому розміщений епітоп (наприклад, в інтервалі залишків 118-126).

На Фіг. 6-8 та у Прикладі 6 подана характеристика епітопу антитіла 5C1 у порівнянні з двома іншими антитілами, що зв'язуються в інтервалі залишків 118-126, а саме 9E4 і 5D12. Мутагенез аланіном дозволяє проаналізувати вплив мутації індивідуальних амінокислот, по одній за один раз, в інтервалі 118-126 альфа-синуклеїну. Профіль відносних змін афінності зв'язування (інакше кажучи, внесок у зв'язування), викликаний мутацією різних амінокислот в інтервалі залишків 118-126, характеризує цей епітоп. Для антитіла 5C1 мутагенез будь-якого із залишків 120-122 дає найбільше зниження зв'язування. Мутагенез залишків 123 або 124 призводить до значного зниження зв'язування, але не настільки великого, як будь-якого із положень 120-122. Мутагенез залишків 118, 119, 125 або залишку 126 викликає ще меншу втрату афінності зв'язування, практично її не змінюючи. Просто кажучи, дію мутагенезу можна грубо поділити на три категорії: практично повне зменшення зв'язування при заміні залишків 120-122 (не відрізняється від негативного контролю), практично без зменшення зв'язування при заміні залишків 118, 119, 125 і 126 (не відрізняється від позитивного контролю) і проміжне зменшення афінності зв'язування при заміні залишків 123 і 124. Таким чином, епітоп антитіла 5C1 можна приблизно охарактеризувати як такий, що є лінійним епітопом, який повністю або по суті складається із залишків 120-124 послідовності SEQ ID NO:1, де залишки 120-122 роблять найбільший внесок у зв'язування. Даний винахід пропонує також інші антитіла, які мають епітоп антитіла 5C1 і характеризуються всіма властивостями, описаними в цьому абзаці. Деякі антитіла характеризуються наявністю в них епітопа, що складається по суті із залишків 120-122,

виключаючи залишки 119-120; це означає, що кожний із залишків 120-122 робить більший внесок у зв'язування, ніж будь-який інший залишок, а внески від залишків 119 і 120 у зв'язування є такими, що не піддаються детектуванню (принаймні описаним у приладі способом сканування аланіном). Що стосується залишків 123 і 124, то їхній внесок у зв'язування в таких антитілах, якщо він і є, то майже не детектується.

Епітоп антитіла 5D12 був досліджений та характеризований за допомогою аланінового мутагенезу таким чином. Мутагенез будь-якого із залишків 120-122 дає максимальне зменшення зв'язування. Мутагенез залишків 118, 199, 123 або 124 призводить до значного зниження зв'язування, але не настільки великого, як будь-якого із положень 120-122. Мутагенез залишків 125 або залишку 126 викликає ще меншу втрату афінності зв'язування, практично її не змінюючи. Просто кажучи, дію мутагенезу можна грубо поділити на три категорії: практично повне зменшення зв'язування при заміні залишків 120-122 (не відрізняється від негативного контролю), практично без зменшення зв'язування при заміні залишків 125 і 126 (не відрізняється від позитивного контролю) і проміжне зменшення афінності зв'язування при заміні залишків 118, 119, 123 і 124. Таким чином, епітоп антитіла 5D12 можна приблизно охарактеризувати як такий, що є лінійним епітопом, який повністю або по суті складається із залишків 118-124 послідовності SEQ ID NO:1, де залишки 120-122 роблять найбільший внесок у зв'язування. Даний винахід пропонує також інші антитіла, які мають епітоп антитіла 5D12 і характеризуються всіма властивостями, описаними в цьому абзаці та у Прикладі 6.

Подібним чином, епітоп антитіла 9E4 може бути охарактеризований за допомогою мутації залишків 122 і 125, кожний з яких демонструє більше зниження зв'язування, ніж будь-який із залишків 118-121, 123, 124 або 126. Просто кажучи, в даному випадку дію мутагенезу можна грубо поділити на дві категорії: практично повне зменшення зв'язування при заміні залишків 122 і 125 практично без зменшення зв'язування при заміні залишків 118-121, 123, 124 і 126. Таким чином, епітоп антитіла 9E4 можна приблизно охарактеризувати як конформаційний епітоп, у якому залишки 122 і 125 дають точки контакту (або найбільший внесок у зв'язування) з 9E4. Даний винахід пропонує також інші антитіла, які мають епітоп антитіла 9E4 і характеризуються всіма властивостями, описаними в цьому абзаці та у Прикладі 6. В альтернативному варіанті антитілом може не бути ні 9E4 або інше антитіло, що має такі самі CDR-ділянки, що й антитіло 9E4, ні антитіло, яке має принаймні п'ять CDR-ділянок з нумерацією за Kabat з принаймні 85 % ідентичністю послідовності по відношенню до відповідних CDR-ділянок антитіла 9E4.

Антитіла, що мають специфічність зв'язування вибраного мишачого антитіла (наприклад, 5C1), можуть бути продуковані за допомогою одного з варіантів методу фагового дисплея (Winter, WO 92/20791). Цей метод є особливо підходящим для одержання людських антитіл. У цьому методі вихідним матеріалом служить варіабельна ділянка важкого або легкого ланцюга вибраного мишачого антитіла. Якщо, наприклад, вихідним матеріалом служить варіабельна ділянка легкого ланцюга, то конструюють фаг-бібліотеку, члени якої демонструють однакову варіабельну ділянку легкого ланцюга (тобто, мишачий вихідний матеріал) і відмінну варіабельну ділянку важкого ланцюга. Варіабельні ділянки важкого ланцюга можуть бути одержані, наприклад, із бібліотеки реаранжованих людських варіабельних ділянок важкого ланцюга. Відбирають фаг, який демонструє сильне специфічне зв'язування з  $\alpha$ -синуклеїном (наприклад, принаймні  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , а ще краще - принаймні  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ). Далі ця варіабельна ділянка важкого ланцюга із цього фагу служить вихідним матеріалом для конструювання наступної фаг-бібліотеки. У цій бібліотеці кожний фаг демонструє однакову для всіх варіабельну ділянку важкого ланцюга (тобто, ділянку, ідентифіковану із першої фаг-бібліотеки) і відмінну варіабельну ділянку легкого ланцюга. Варіабельні ділянки легкого ланцюга можуть бути отримані, наприклад, із бібліотеки реаранжованих людських варіабельних ділянок легкого ланцюга. Далі знову відбирають фаги, що демонструють сильне специфічне зв'язування з  $\alpha$ -синуклеїном. Продуковані в результаті антитіла зазвичай мають специфічність епітопа, таку саму, що і вихідний мишачий матеріал, або подібну до нього.

Інші антитіла можуть бути отримані шляхом мутагенезу сДНК, що кодують важкі та легкі ланцюги типового антитіла, наприклад, 5C1. Таким чином, даним винаходом охоплюються також моноклональні антитіла, які є принаймні на 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичними антитілу 5C1 в амінокислотній послідовності зрілих варіабельних ділянок важкого і/або легкого ланцюга та володіють його функціональними властивостями, і/або які відрізняються від відповідного антитіла малою кількістю функціонально недоречних амінокислотних замін (наприклад, консервативних замін), делецій або інсерцій.

Даним винаходом охоплюються також моноклональні антитіла, які мають декілька або всі (наприклад, 3, 4, 5, а краще - 6) CDR-ділянок, повністю або по суті із 5C1. Такі антитіла можуть містити варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка має принаймні дві, а зазвичай всі три CDR-

ділянки повністю або по суті із варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла 5C1, і/або варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка має принаймні дві, а зазвичай всі три CDR-ділянки повністю або по суті із варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла 5C1. До числа кращих антитіл належать як важкий, так і легкий ланцюги. CDR-ділянка є по суті із відповідної CDR-ділянки антитіла 5C1, коли вона містить не менше ніж 4, 3, 2 або 1 заміну, інсерцію або делецію, за винятком того, що CDRH2 (коли вона визначена відповідно до нумерації Kabat) може мати не більше ніж 6, 5, 4, 3, 2, або 1 заміни, інсерції або делеції. Такі антитіла у кращому варіанті мають принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність з 5C1 в амінокислотній послідовності зрілих варіабельних ділянок важкого і/або легкого ланцюга і володіють його функціональними властивостями, і/або відрізняються від 5C1 малою кількістю функціонально недоречних амінокислотних замін (наприклад, консервативні заміни), делецій або інсерцій.

Кращі антитіла демонструють функціональну активність, подібну функціональній активності антитіла 5C1, наприклад, у зменшенні нейритних і/або аксональних  $\alpha$ -агрегатів синуклеїну, зменшенні нейритної дистрофії, поліпшенні когнітивної функції, поверненні у зворотному напрямку, лікуванні або інгібуванні когнітивного погіршення, і/або збереженні або підвищенні синаптичної густини і/або дендритної густини.

#### В. Химерні та вінірувані антитіла

Даний винахід, крім того, пропонує химерні та вінірувані форми нелюдського антитіла, зокрема, 5C1.

Химерним є антитіло, в якому зрілі варіабельні ділянки легкого і важкого ланцюгів нелюдського антитіла (наприклад, миші) є скомбінованими з людськими константними ділянками легкого і важкого ланцюгів. Зазвичай, константні ділянки легкого і важкого ланцюгів є людського походження. Проте в разі потреби (наприклад, для полегшення тестування нелюдського антитіла у підходящій тваринній моделі) константні ділянки можуть походити із іншого, відмінного від людини виду. Такі антитіла зберігають по суті або повністю специфічність зв'язування мишачого антитіла і можуть приблизно на дві третини мати людську послідовність, принесену людськими константними ділянками.

Вініруване антитіло належить до одного із типів гуманізованих антитіл, які зберігають деякі і, зазвичай, всі CDR-ділянки та деякі із нелюдських каркасних залишків варіабельних ділянок нелюдського антитіла, але в яких замінені інші каркасні залишки варіабельних ділянок, які можуть робити внесок в епітопи В- або Т-клітин, наприклад, залишки, що перебувають під зовнішнім впливом (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991), на залишки із відповідних положень послідовності людського антитіла. У результаті утворюється антитіло, в якому CDR-ділянки повністю або по суті є із нелюдського антитіла, а каркасні варіабельні ділянки нелюдського антитіла зроблені більш людиноподібними шляхом замін.

#### С. Гуманізовані антитіла

Гуманізовані антитіла 5C1 специфічно зв'язуються з людським  $\alpha$ -синуклеїном. Афіність (тобто,  $K_a$ ) деяких гуманізованих антитіл може бути, наприклад, разів у п'ять або два більше афіності мишачого антитіла 5C1. Деякі гуманізовані антитіла мають афіність, яка в межах експериментальної похибки є такою самою, як у мишачого 5C1. Деякі гуманізовані антитіла мають афіність більше ніж мишаче 5C1. Кращі гуманізовані антитіла зв'язуються з таким самим епітопом і/або конкурують з мишачим 5C1 за зв'язування з людським  $\alpha$ -синуклеїном.

Гуманізоване антитіло являє собою генетично модифіковане антитіло, у якому CDR-ділянки від нелюдського антитіла-донора (наприклад, мишачого 5C1) є імплантованими в людські послідовності антитіла-акцептора (Queen, US 5,530,101 і 5,585,089; Winter, US 5,225,539, Carter, US 6,407,213, Adair, US 5,859,205 6,881,557, Foote, US 6,881,557). Послідовностями антитіла-акцептора можуть бути, наприклад, зріла послідовність людського антитіла, суміш таких послідовностей, консенсусна послідовність із людських послідовностей антитіл або послідовність ділянки зародкової лінії. Таким чином, гуманізоване антитіло 5C1 є антитілом, яке має декілька або всі CDR-ділянки, які походять повністю або по суті із мишачого 5C1, і каркасні послідовності варіабельних ділянок та константні ділянки, в разі їх наявності, які повністю або по суті походять із послідовностей людського антитіла. Подібним чином, гуманізований важкий ланцюг має принаймні дві, а зазвичай всі три CDR-ділянки, повністю або по суті із важкого ланцюга антитіла-донора, а каркасну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга та константну ділянку важкого ланцюга, в разі її наявності, по суті із каркасної послідовності варіабельної ділянки та послідовності константної ділянки людського важкого ланцюга. Так само, гуманізований легкий ланцюг має принаймні дві, а зазвичай всі три CDR-ділянки, повністю або по суті із легкого ланцюга антитіла-донора, а каркасну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга і константну ділянку легкого ланцюга, в разі її наявності, по суті із каркасної



послідовності варіабельної ділянки та послідовності константної ділянки людського легкого ланцюга. Окрім нанотіл та dAb, гуманізоване антитіло містить гуманізований важкий ланцюг і гуманізований легкий ланцюг. У кращому варіанті принаймні 85 %, 90 %, 95 % або 100 % залишків (з однаковими номерами згідно з Kabat) є у відповідних CDR-ділянок ідентичними.

5 Каркасні послідовності варіабельних ділянок того або іншого ланцюга антитіла або константна ділянка того або іншого ланцюга антитіла походять по суті із каркасної послідовності людської варіабельної ділянки або із людської константної ділянки, відповідно, якщо ідентичними є принаймні 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % відповідних залишків за нумерацією Kabat.

10 Хоча в гуманізовані антитіла часто вбудовуються всі шість CDR-ділянок (у кращому варіанті відповідно до нумерації за Kabat) із мишачого антитіла, вони можуть бути також виробленими з не всіма (а принаймні з 3, 4 або 5) CDR-ділянками із мишачого антитіла (Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000).

15 У деяких антитілах лише частина CDR-ділянок, а саме підмножина залишків CDR, що є потрібними для зв'язування і звуться залишками визначення специфічності (SDR) (Kashmiri et al., Methods (2005) 36(1):25-34), є необхідними для збереження зв'язування в гуманізованому антитілі. Залишки CDR-ділянок, які не контактують з антигеном і не належать до SDR-залишків, 20 можуть бути ідентифіковані у попередніх дослідженнях (іноді непотрібними виявляються, наприклад, від одного до всіх залишків H60-H65 у CDR H2) із CDR-ділянок за Kabat, що лежать за межами гіперваріабельних петель Chothia (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987), шляхом молекулярного моделювання і/або емпіричним шляхом, або так, як описано в (Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004). У таких гуманізованих антитілах у положеннях, у яких відсутні є 25 один або більше донорних залишків CDR або в яких зовсім немає донорних CDR, амінокислота, що займає таке положення може бути амінокислотою, яка займає відповідне положення (за нумерацією Kabat) у послідовності антитіла-акцептора. Кількість таких заміни акцепторних амінокислот на донорні для включення в CDR-ділянки віддзеркалює баланс аргументів конкурування. Такі заміни у принципі є вигідними для зменшення кількості мишачих амінокислот 30 у гуманізованому антитілі та відповідного зниження потенційної імуногенності. Але заміни можуть також викликати зміни афінності, а значного зниження афінності у кращому варіанті необхідно уникати. Положення для заміщень усередині CDR-ділянок і заміни амінокислот можуть вибиратися також емпіричним шляхом.

35 Послідовності людських антитіл-акцепторів у разі потреби можуть вибиратися серед численних відомих послідовностей людських антитіл для досягнення високого ступеня їхньої ідентичності (наприклад, порядку 65 %-85 %) між каркасами варіабельних ділянок людської акцепторної послідовності і відповідними каркасами варіабельних ділянок ланцюга донорного антитіла.

40 Певні амінокислоти із каркасних залишків людських варіабельних ділянок можуть бути вибрані для їх заміщення за критерієм їхнього імовірного впливу на конформацію CDR і/або на зв'язування з антигеном. Дослідження таких можливих впливів проводять шляхом моделювання, вивчення характеристик амінокислот в особливих положеннях, а також емпіричного спостереження за ефектами заміщення та мутагенезу особливими амінокислотами.

45 Наприклад, коли амінокислота каркасного залишку мишачої варіабельної ділянки відрізняється від амінокислоти каркасного залишку вибраної людської варіабельної ділянки, то людська каркасна амінокислота може бути заміщена на еквівалентну каркасну амінокислоту із мишачого антитіла, якщо очікується, що ця амінокислота:

- (1) нековалентно зв'язується безпосередньо з антигеном,
- (2) є суміжною з CDR-ділянкою,
- 50 (3) іншим чином взаємодіє з CDR-ділянкою (наприклад, перебуває в межах 6 Å від CDR-ділянки), (наприклад, ідентифікована шляхом моделювання легкого або важкого ланцюга на розчиненій структурі відомого гомологічного ланцюга імуноглобуліну);
- (4) є залишком, який бере участь у взаємодії на межі поділу VL-VH.

Каркасні залишки з ознаками (1)-(3) відповідно до визначення Квіна (Queen, US 5,530,101) іноді звуться ще канонічними залишками або "ноніусними" (vernier) залишками. Каркасні залишки, які сприяють визначенню конформації CDR-петлі, іноді звуться канонічними залишками (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987), Thornton & Martin J. Mol. Biol., 263, 800-815, 1996). Каркасні залишки, які підтримують петлеві конформації зв'язування з антигеном і беруть участь у тонкій підгонці даного антитіла до антигена, іноді звуться "ноніусними" 60 залишками (Foote & Winter, 1992, J Mol Bio. 224, 487-499).

Іншими каркасними залишками, що є кандидатами на заміщення, є такі, що створюють сайт потенційного глікозилювання. Кандидатами на заміщення є також людські каркасні амінокислоти акцептора, які є незвичайними для людського імуноглобуліну у цьому положенні. Ці амінокислоти можуть заміщуватися амінокислотами із еквівалентного положення мишачого антитіла-донора або із еквівалентних положень більш типових людських імуноглобулінів.

Даний винахід пропонує гуманізовані форми мишачого антитіла 5C1. Це антитіло містить зрілі варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів, які мають амінокислотні послідовності, що містять, відповідно, SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 24. Даний винахід пропонує п'ять зразкових зрілих гуманізованих варіабельних ділянок важкого ланцюга: H1, SEQ ID NO: 14; H2, SEQ ID NO: 15; H3, SEQ ID NO: 16; H4, SEQ ID NO: 17; і H5, SEQ ID NO: 18. Даний винахід також пропонує чотири зразкові зрілі гуманізовані варіабельні ділянки легкого ланцюга: L1, SEQ ID NO: 29; L2, SEQ ID NO: 30; L3, SEQ ID NO: 31; і L4, SEQ ID NO: 32. Ці антитіла включають будь-які пермутації цих зрілих варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів, тобто: H1L2, H1L3, H1L4, H2L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L1, H3L2, H3L3, H3L4, H4L1, H4L2, H4L3, H4L4, H5L1, H5L2, H5L3 і H5L4. Серед них варіант H4L3, який включає вісім зворотних мутацій важкого ланцюга і п'ять зворотних мутацій легкого ланцюга, має афінність до  $\alpha$ -синуклеїну (виміряну за допомогою приладу Biotore) що у два рази перевищує величини афінності мишачого і химерного антитіла 5C1, Табл. 3 нижче. Як показали результати аналізу ELISA, варіант H4L3 має афінність щодо  $\alpha$ -синуклеїну, яка по суті є такою самою, як і у химерного антитіла 5C1 (в межах експериментальної похибки), і вищою, ніж у мишачого антитіла 5C1, Фіг. 5. Крім того, варіант H5L3, який містить шість зворотних мутацій важкого ланцюга і п'ять зворотних мутацій легкого ланцюга, забезпечує афінність щодо людського  $\alpha$ -синуклеїну (виміряну за допомогою приладу Biotore), яка не менше ніж у чотири рази перевищує величини афінності мишачого і химерного антитіла 5C1, Табл. 3, нижче. Варіант H3L4, який включає дев'ять зворотних мутацій важкого ланцюга і дві зворотні мутації легкого ланцюга, також забезпечує афінність щодо людського  $\alpha$ -синуклеїну (виміряну методом ELISA), яка по суті є такою самою, що й у химерного антитіла 5C1 в межах експериментальної похибки, а варіанти H3L3 і H3L1, кожний з яких включає дев'ять зворотних мутацій важкого ланцюга та п'ять і шість зворотних мутацій легкого ланцюга, відповідно, забезпечує афінність щодо  $\alpha$ -синуклеїну, яка є вищою, ніж у мишачого антитіла 5C1 (виміряну методом ELISA).

Даний винахід пропонує варіанти H4L3 гуманізованого антитіла 5C1, у яких зріла гуманізована варіабельна ділянка важкого ланцюга демонструє принаймні 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність з H4 (SEQ ID NO: 17), і зрілу гуманізовану варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка демонструє принаймні 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з L3 (SEQ ID NO: 31). У деяких з таких антитіл міститься принаймні одна, дві, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять або всі тринадцять зворотних мутацій у H4L3. Даний винахід пропонує також варіанти H5L3 гуманізованого антитіла 5C1, у яких зріла гуманізована варіабельна ділянка важкого ланцюга демонструє принаймні 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність з H5 (SEQ ID NO: 18), і зріла гуманізована варіабельна ділянка легкого ланцюга, яка демонструє принаймні 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з L3 (SEQ ID NO: 31). У деяких таких антитілах утримуються принаймні одна, дві, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, або всі одинадцять зворотних мутацій у H5L3. Даний винахід пропонує також варіанти H3L4 гуманізованого антитіла 5C1, у яких зріла гуманізована варіабельна ділянка важкого ланцюга демонструє принаймні 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність з H3 (SEQ ID NO: 16), зріла гуманізована варіабельна ділянка легкого ланцюга демонструє принаймні 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з L4 (SEQ ID NO: 32). У деяких таких антитілах утримуються принаймні одна, дві, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять або всі одинадцять зворотних мутацій у H3L4. У деяких антитілах принаймні одне із положень H11, H27, H30, H48 і H73 на Vh-ділянці займає, відповідно, L, Y, T, I і K. У деяких антитілах положення H11, H27, H30, H48 і H73 на Vh-ділянці займають, відповідно, L, Y, T, I і K. У деяких антитілах принаймні одне із положень H67, H69, H91 і H94 на Vh-ділянці займають, відповідно, A, L, F і S. У деяких антитілах, положення H67, H69 і H94 на Vh-ділянці займають, відповідно, A, L і S, як у версії H4. У деяких антитілах положення H94 займає S, як у версії H5. У деяких антитілах положення H67, H69, H91 і H94 на Vh-ділянці займають, відповідно, A, L, F і S, як у версії H3. У деяких антитілах принаймні одне із положень L12 і L14 на Vk-ділянці займає S. У деяких антитілах обидва положення L12 і L14 на Vk-ділянці займає S, як у версіях L3 і L4. У деяких антитілах принаймні одне із положень L2, L45, L49 і L87 на Vk-ділянці займають, відповідно, V, K, N і F. У деяких антитілах положення L2, L49 і L87 на Vk-ділянці займають, відповідно, V, N і F, як у версії L3. У деяких антитілах положення L2, L45, L49 і L87 на

Vk-ділянки займають, відповідно, V, K, N і F, як у версії L1. CDR-ділянки таких гуманізованих антитіл можуть бути ідентичними або по суті ідентичними CDR-ділянками варіантів H4L3 або H5L3, які є такими самими, як у мишачого антитіла-донора. CDR-ділянки можуть визначатися за будь-якою узгодженою системою (наприклад, Chothia), але у кращому варіанті для цього використовується нумерація Kabat.

Однією із можливих додаткових варіацій у гуманізованих варіантах антитіла 5C1 є додаткові зворотні мутації у каркасах варіабельних ділянок. Багато каркасних залишків, які не контактують з CDR-ділянками у гуманізованому mAb, можуть розміщати заміни амінокислот із відповідних положень донорного мишачого mAb або інших мишачих або людських антитіл, і навіть багато залишків, які потенційно можуть контактувати з CDR, також можуть брати участь у заміщенні, або навіть амінокислоти усередині CDR-ділянок можуть змінюватися, наприклад, залишками, які перебувають у відповідних положеннях людської акцепторної послідовності, яка використовується для постачання каркасів варіабельних ділянок. Крім того, змінні людські акцепторні послідовності можуть використовуватися, наприклад, для важкого і/або легкого ланцюга. У разі використання різних акцепторних послідовностей одна або більше рекомендованих вище зворотних мутацій не можуть здійснюватися, оскільки відповідні донорні та акцепторні залишки вже є однаковими без зворотної мутації. Наприклад, при використанні акцепторної послідовності важкого ланцюга, у якій положення H11 вже займає L, H48 вже займає I, і/або H73 вже займає K, відповідна зворотна мутація (або мутації) не потребуються. Подібним чином, у випадку використання акцепторної послідовності легкого ланцюга, у якій положення L12 і/або L14 займає S, відповідна зворотна мутація (або мутації) не потребується.

Даним винаходом охоплюються також гуманізовані антитіла, у яких зрілі варіабельні ділянки легкого і важкого ланцюгів демонструють принаймні 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності зі зрілими варіабельними ділянками легкого та важкого ланцюгів гуманізованих 5C1 H1L1, H1L2, H1L3, H1L4, H2L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L1, H3L2, H3L3, H4L1, H4L2, H4L4, H5L1, H5L2 або H5L4. CDR-ділянки таких гуманізованих антитіл можуть бути ідентичними або по суті ідентичними таким у мишачого антитіла-донора. CDR-ділянки можуть визначатися за будь-якою узгодженою системою (наприклад, Chothia), але у кращому варіанті для цього використовується нумерація Kabat.

#### D. Вибір константної ділянки

Варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів химерного, гуманізованого (включаючи вініруване) або людського антитіла можуть бути з'єднані принаймні з частиною константної ділянки, достатньої для взаємодії з Fc рецептором. Константна ділянка зазвичай є людською, але в разі потреби може бути вибрана нелюдська константна ділянка.

Вибір константної ділянки частково залежить від того, або є бажаною цитотоксичність, опосередкована антитіло-залежним комплементом і/або клітинами. Наприклад, людські ізотипи IgG1 і IgG3 мають комплементо-опосередковану цитотоксичність, а людські ізотипи IgG2 і IgG4 мають погану комплементо-опосередковану цитотоксичність або зовсім її не мають. Константна ділянка людського IgG1, яка є підходящою для включення в антитіло за даним винаходом, може мати послідовність SEQ ID NO: 38. Константні ділянки легких ланцюгів можуть бути лямбда- або капа-ділянками. Людська капа-константна ділянка легкого ланцюга, яка є підходящою для включення в антитіло за даним винаходом, може мати послідовність SEQ ID NO: 40. Антитіла можуть експресуватися як тетрамери, що містять два легкі і дві важкі ланцюги, як окремі важкі ланцюги, як окремі легкі ланцюги, як фрагменти Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> або Fv, або як одноланцюгові антитіла, у яких варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів є зв'язаними через спейсер.

Константні ділянки людини демонструють алотипічну варіантність та ізоалотипічну варіантність між різними особинами. Інакше кажучи, константні ділянки у різних особин можуть бути різними в одному або більше поліморфних положеннях. Ізоалотипи відрізняються від алотипів тим, що сироватка, розпізнаючи ізоалотип, зв'язується з неполіморфною ділянкою одного або більше інших ізотипів. Вираз "людська константна ділянка" означає константну ділянку з будь-яким природним алотипом або будь-якою пермутацією залишків, які займають поліморфні положення у природних алотипах або до 3, 5 або 10 заміщень для зниження або підвищення ефекторної функції, як описано нижче.

Одна або декілька амінокислот на амінному або карбоксильному кінці легкого і/або важкого ланцюга, наприклад, С-кінцевий лізин важкого ланцюга може випускатися або дериватизуватися в частині або всіх молекулах. Заміни можуть робитися на константних ділянках для зменшення або збільшення ефекторної функції, такої як комплементо-опосередкована цитотоксичність або ADCC (Winter et al., US Patent No. 5,624,821; Tso et al., US Patent No. 5,834,597; і Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), або для збільшення тривалості напівжиття у людях (Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004).

Типовими замінами є, наприклад, Gln у положенні 250 і/або Leu у положенні 428 (у цьому абзаці використовується Європейська нумерація константної ділянки) з метою збільшення тривалості напівжиття даного антитіла. Заміщення у будь-якому або всіх положеннях 234, 235, 236 і/або 237 зменшує афінність до Fc $\gamma$  рецепторів і особливо до Fc $\gamma$ RI рецептора, як описано, наприклад, у патенті ( US 6,624,821). Заміщення на аланін у положеннях 234, 235 і 237 людського IgG1 може бути корисним для зниження ефекторних функцій. Можливими є також заміщення у положеннях 234, 236 і/або 237 людського IgG2 на аланін і в положенні 235 на глутамін, як описано, наприклад, у патенті ( US 5,624,821). У деяких аспектах даного винаходу використовується мутація принаймні в одному із положень 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 і 331 згідно з Європейською нумерацією людського IgG1. У деяких аспектах даного винаходу використовується мутація в одному або більше положеннях 318, 320 і 322 згідно з Європейською нумерацією людського IgG1. У деяких аспектах даного винаходу ізотипом є людський IgG2 або IgG4.

#### Е. Людські антитіла

Людські антитіла проти  $\alpha$ -синуклеїну виробляються за допомогою різноманітних методів, описаних нижче. Деякі людські антитіла добираються шляхом експериментів щодо конкурентного зв'язування або іншим чином з метою отримання такої самої або такої, що перекривається, специфічності епітопа, як у 5C1. Людські антитіла можуть добиратися також за особливою специфічністю епітопа шляхом використання як імуногена лише фрагмента  $\alpha$ -синуклеїну (наприклад, амінокислотних залишків 118-126), і/або шляхом скринінгу антитіл проти сукупності делеційних мутантів  $\alpha$ -синуклеїну. Одним із способів продукування людських антитіл є тріомна технологія (Oestberg et al., Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, U.S. Pat. No. 4,634,664; і Engleman et al., U.S. Pat. No. 4,634,666). В іншій технології залучається імунізація трансгенних мишей, що експресують людські імуноглобулінові гени, такі як XenoMouse®, AlivaMab Mouse або Velocimmune mouse, як описано, наприклад, у ( Lonberg et al., WO 93/1222, U.S. Pat. No. 5,877,397, U.S. Pat. No. 5,874,299, U.S. Pat. No. 5,814,318, U.S. Pat. No. 5,789,650, U.S. Pat. No. 5,770,429, U.S. Pat. No. 5,661,016, U.S. Pat. No. 5,633,425, U.S. Pat. No. 5,625,126, U.S. Pat. No. 5,569,825, U.S. Pat. No. 5,545,806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati і WO 91/10741). Серед інших підходящих способів слід вказати is фаговий дисплей, описаний, наприклад, у ( Dower et al., WO 91/17271 and McCafferty et al., WO 92/01047, U.S. Pat. No. 5,877,218, U.S. Pat. No. 5,871,907, U.S. Pat. No. 5,858,657, U.S. Pat. No. 5,837,242, U.S. Pat. No. 5,733,743 and U.S. Pat. No. 5,565,332). У цьому способі конструюють фаг-дисплейні бібліотеки, члени яких відображують на їхніх зовнішніх поверхнях різноманітні антитіла. Ці антитіла зазвичай відображуються у формі Fv- або Fab-фрагментів. Відображені фаговим дисплеєм антитіла з потрібною специфічністю відбираються за поліпшенням афінності щодо  $\alpha$ -синуклеїнового пептиду або його фрагмента. Може застосовуватися також метод секвенування ДНК із людських В-клітин відповідно до загальних протоколів, описаних у публікаціях (Reddy et al., Nat Biotechnol. 2010 Sept 28(9):965-9 (Epub 2010 Aug 29) і US 20110053803, 20100099103, 20100291066, 20100035763 і 20100151471). Коротко цей метод полягає в тому, що В-клітини можуть отримуватися у людей, які згідно з діагнозом можуть мати антитіла проти  $\alpha$ -синуклеїну; е можуть бути, наприклад, люди, імунізовані  $\alpha$ -синуклеїном, його фрагментами, більш довгими поліпептидами, що містять  $\alpha$ -синуклеїн або його фрагменти, або анти-ідіотипічні антитіла. Далі, мРНК антитіла із В-клітин піддають зворотній транскрипції в cДНК і секвенують, наприклад, методом 454 секвенування. Після одержання послідовностей ланцюгів від кожного антитіла ці ланцюги складають один з одним по парах (за допомогою, наприклад, біоінформатики), клонують, експресують і піддають скринінгу за бажаними властивостями.

#### Ф. Експресія рекомбінантних антитіл

Є відомими численні способи продукування химерних і гуманізованих антитіл за допомогою клітинних ліній, що експресують антитіла (наприклад, гібридом). Так, імуноглобулінові варіабельні ділянки антитіл можуть бути клоновані і піддані секвенуванню за допомогою добре відомих методів. В одному з них варіабельну VH-ділянку важкого ланцюга клонують методом полімеразно-ланцюгової реакції RT-PCR, використовуючи мРНК, приготованої із гібридомних клітин. До лідерного пептиду VH-ділянки використовуються консенсусні праймери, що охоплюють кодон стимулювання трансляції як 5' праймер і специфічний 3' праймер константних ділянок g2b. Типові праймери описані Шенком в патентній публікації США (Schenk et al. US 2005/0009150, далі "Шенк"). Послідовності від численних, незалежно виведених клонів порівнюють для того, щоб упевнитися у відсутності змін, які могли бути введені під час ампліфікації. Послідовність VH ділянки може бути також визначена або підтверджена шляхом секвенування VH-фрагмента, отриманого за допомогою методу 5' RACE RT-PCR і 3' g2b-

специфічного праймера.

Варіабельна VL-ділянка легкого ланцюга може бути клонована у такий самий спосіб що VH-ділянка. В одному з підходів набір консенсусних праймерів, розроблений для ампліфікації VL-ділянки, проектується для гібридизації з VL-ділянкою; він включає кодон стимулювання трансляції та 3' праймер, специфічний для Cκ-ділянки, розташованої в прямому напрямку за ділянкою V-J з'єднання. У другому підході використовують метод 5'RACE RT-PCR для клонування VL, що кодує сДНК. Типові праймери описані в роботі (Schenk), цитованій вище. Далі, клоновані послідовності об'єднують з послідовностями, що кодують людські (або іншого біологічного виду) константні ділянки. Типовими послідовностями, що кодують людські константні ділянки є, наприклад, SEQ ID NO: 37, яка кодує константну ділянку людського IgG1, і SEQ ID NO: 39, яка кодує людську константну капа-ділянку легкого ланцюга.

В одному з підходів варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів реконструюють для кодування донорної сплайс-послідовності у прямому напрямку від відповідних з'єднань VDJ або VJ і клонують у ссавцевий вектор експресії, такий як pCMV-hy1 для важкого ланцюга і pCMV-McI для легкого ланцюга. Ці вектори кодують людські γ1 and Cκ константні ділянки як екзонні фрагменти у прямому напрямку від вставленої касети варіабельної ділянки. Після перевірки послідовності вектори експресії важкого ланцюга і легкого ланцюга можуть бути співтрансфектовані у клітини CHO для продукування химерних антитіл. Через 48 годин після трансфекції кондиціоноване середовище збирають й піддають аналізу методом вестерн-блотінгу щодо продукування антитіл або імуноферментному аналізу методом ELISA щодо зв'язування з антигеном. Химерні антитіла гуманізують так, як описано вище.

Химерні, вінірувані, гуманізовані та людські антитіла виробляють зазвичай шляхом рекомбінантної експресії. Конструкції із рекомбінантних нуклеїнових кислот зазвичай включають послідовність контролю експресії, оперативно зв'язану з послідовностями кодування ланцюгів антитіл, включаючи асоційований природним чином або гетерологічний елемент (елементи) контролю експресії, такий як промотор. Як тільки відбулось вбудовування вектора у відповідного хазяїна, останній утримується в умовах, підходящих для високоякісної експресії нуклеотидних послідовностей, а також збирання й очистки антитіл, що перехресно реагують.

Ці вектори експресії зазвичай є такими, що реплікуються в організмах хазяїна як епісоми або як інтегральна частина хромосомної ДНК хазяїна. У загальному випадку, вектори експресії містять маркери селекції, наприклад, стійкість до ампіциліну або до гіроміцину, які дозволяють виявляти серед цих клітин ті, що є трансформованими бажаними ДНК послідовностями.

*E. coli* є один із прокаріотичних хазяїнів, підходящих для клонування ДНК-послідовності, що кодує запропоновані тут поліпептиди. Підходящими для експресії є також мікроби, такі як дріжджі. *Saccharomyces* є дріжджами-хазяїном з підходящими векторами, які мають послідовності контролю експресії, ориджин реплікації, послідовності термінації та інші потрібні елементи. До числа типових промоторів входить 3-фосфогліцераткіназа та інші гліколітичні ферменти. До числа таких, що індукуються, підходящих промоторів дріжджів входять промотори із алкогольдегідрогенази, ізоцитохром C і ферменти, відповідальні за використання мальтози і галактози.

Клітина ссавця є хазяїном для експресії нуклеотидних сегментів, що кодують імуноглобуліни або їхні фрагменти (Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). На сьогоднішній день розроблено чимало підходящих клітинних ліній-хазяїнів, здатних секретувати інтактні гетерологічні протеїни; передусім це клітинні лінії CHO, різноманітні клітинні лінії COS, клітини HeLa, L-клітини, людська ембріональна ниркова клітина і клітинні лінії міеломи. Клітини можуть бути нелюдськими. Вектори експресії для цих клітин можуть містити послідовності контролю експресії, такі як ориджин реплікації, промотор, енхансер (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)) та необхідні сайти процесінгу інформації, такі як сайти зв'язування рибосоми, сайти розщеплення РНК, сайти поліаденілювання і послідовності транскрипційних термінаторів. Послідовності контролю експресії можуть містити промотори, виведені із ендогенних генів, цитомегаловірус, SV40, аденовірус, вірус бичачої папіломи тощо (Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992)).

В альтернативному варіанті, послідовності, що кодують антитіла, можуть вбудовуватися у трансгени для введення в геном трансгенної тварини і наступної експресії у молоці трансгенної тварини, як описано, наприклад, у (U.S. Pat. No. 5,741,957, U.S. Pat. No. 5,304,489, U.S. Pat. No. 5,849,992). Підходящими трансгенами для цього можуть бути кодуючі послідовності для легкого і/або важкого ланцюгів в оперативному зв'язку з промотором та енхансером із специфічного гена молочної залози, такого як казеїн або бета-лактоглобулін.

Вектори, що містять потрібні сегменти ДНК, можуть бути перенесені у клітину хазяїна способом, що залежить від типу клітини-хазяїна. Наприклад, для прокаріотичних клітин

зазвичай використовується трансфекція з хлоридом кальцію, у той час як для інших клітин-хазяїнів можуть використовуватися методи обробки фосфатом кальцію, електропорації, ліпофекції, біолістики або трансфекції на базі вірусів. Серед інших способів, використовуваних для трансформування клітин ссавців, можна назвати застосування полібрену, злиття протопластів, застосування ліпосом, електропорації і мікроін'єкцій. Для продукування трансгенних тварин, трансгени можуть шляхом мікроін'єкцій вводитися у запліднені ооцити або можуть вбудовуватися в геном ембріональних стовбурних клітин, а ядра таких клітин можуть переноситися в енукейовані ооцити.

Після введення вектора, що кодує важкий і легкий ланцюги антитіла, у клітинну культуру, пули клітин може бути піддані скринінгу за продуктивністю вирощування та якістю продукту у безсироватковому середовищі. Після цього найбільш продуктивні пули клітин можуть піддаватися одноклітинному клонуванню на основі FACS флуоресцентного сортера, продукуючи таким чином моноклональні лінії. При цьому рівень питомої продуктивності може становити більше 50 пг або 100 пг на клітину за день, що відповідає титрам продукту більше ніж 7,5 г/л культури. Антитіла, вироблені одноклітинними клонами, можуть також тестуватися щодо помутніння, відбору за властивостями, методами PAGE-електрофорезу, ізоелектричного фокусування IEF, УФ сканування, гель-хроматографії високого тиску HP-SEC, карбогідрат-олігосахаридного картування, мас-спектрометрії та аналізу зі зв'язування, наприклад, ELISA або Biacore. Після цього вибраний клон може бути поміщений у флакони і зберігатися у замороженому стані до наступного використання.

По завершенню експресії, антитіла очищають відповідно до стандартних процедур, прийнятих у даній галузі, включаючи хроматографію на протеїні А, HPLC очистку, колонкову хроматографію, гель-електрофорез і т. п. (Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

У технології промислового виробництва антитіл згідно з даним винаходом можуть використовуватися оптимізація кодонів, селекція промоторів, елементи і термінатори транскрипції, безсироваткове одноклітинне клонування, зберігання клітин у банку культур, використання маркерів селекції для збільшення кількості копій, CHO-термінатор, безсироваткове одноклітинне клонування, поліпшення білкових титрів, як описано, наприклад, у (US 5,786,464, US 6,114,148, US 6,063,598, US 7,569,339, W02004/050884, W02008/012142, W02008/012142, W02005/019442, W02008/107388 і W02009/027471, і US 5,888,809).

#### G. Серологічний аналіз

Антитіла можуть піддаватися декільком скринінгам, включаючи аналіз зі зв'язування, функціональні скринінги, скринінги на тваринних моделях хвороб, пов'язаних з відкладеннями  $\alpha$ -синуклеїну і клінічними дослідженнями. В аналізах зі зв'язування проводиться тестування щодо специфічного зв'язування та, необов'язково, афінності і специфічності епітопа щодо  $\alpha$ -синуклеїну (або його фрагментів, наприклад, амінокислотних залишків 118-126). Такі скринінги іноді проводяться в конкуренції з типовим антитілом, наприклад 5C1. У таких аналізах можливою є також імобілізація антитіла або  $\alpha$ -синуклеїну-мішені. Функціональні випробування можуть здійснюватися на клітинних моделях, включаючи клітини, які за своєю природою експресують  $\alpha$ -синуклеїн або трансфікуються ДНК, що кодує  $\alpha$ -синуклеїн або його фрагмент. Підходящими для цього клітинами є, наприклад, нейрони. Клітини можуть піддаватися скринінгу за зниженими рівнями  $\alpha$ -синуклеїну (наприклад, методом Вестерн-блотінгу або імунопреципітації клітинних екстрактів або супернатантів), зниженими рівнями агрегованого  $\alpha$ -синуклеїну (наприклад, шляхом імуногістохімічного розділення і/або за допомогою конфокальних методів), і/або зменшують токсичність, приписувану  $\alpha$ -синуклеїну.

Скринінги на тваринних моделях тестують здатність антитіл до терапевтичного або профілактичного поліпшення ознак або симптомів у піддослідних тварин, що симулюють людські хвороби, пов'язані з відкладеннями  $\alpha$ -синуклеїну, такі як хвороби з тільцями Леві. Підходящими для цього ознаками або симптомами, які піддаються моніторингу, є дефіцити моторного балансу, координації або когнітивної функції. Ступінь погіршення при цьому може визначатися шляхом порівняння з відповідним контролем, таким як дефіцит моторного балансу, координації або когнітивної функції у контрольних тварин, що отримували контрольне антитіло (наприклад, контрольне антитіло відповідного ізотипу), плацебо або не отримували жодного лікування. Трансгенні або інші тваринні моделі хвороби з тільцями Леві можуть експресувати людський  $\alpha$ -синуклеїновий трансген. Для полегшення тестування на тваринній моделі можуть використовуватися антитіла, що мають підходящу для тваринної моделі константну ділянку. Таким чином, можна зробити висновок, що гуманізована версія даного антитіла буде ефективною, якщо ефективним є відповідне мишаче антитіло або химерне антитіло у підходящій тваринній моделі, а гуманізоване антитіло має подібну їм афінність зв'язування

(наприклад, у 1,5, 2 або 3 рази більшу в межах експериментальної похибки).

У клінічних дослідженнях проводяться випробування щодо безпеки та ефективності антитіл у застосуванні до людей, що мають хворобу, пов'язану з відкладеннями  $\alpha$ -синуклеїну.

#### Н. Нуклеїнові кислоти

Даний винахід також пропонує нуклеїнові кислоти, що кодують будь-які важкі та легкі ланцюги, описані вище. Зазвичай, нуклеїнові кислоти також кодують сигнальний пептид, злитий зі зрілими важким і легким ланцюгами. Підходящими сигнальними пептидами є, наприклад, амінокислотні залишки 1-19 послідовності SEQ ID NO: 6 (кодованої нуклеотидами 1-57 послідовності SEQ ID NO: 5) та амінокислотні залишки 1-19 послідовності SEQ ID NO: 8 (кодованої нуклеотидами 1-57 послідовності SEQ ID NO: 7). Кодуючі послідовності в нуклеїнових кислотах можуть бути в оперативному зв'язку з регуляторними послідовностями для забезпечення експресії кодуючих послідовностей, таких як промотор, енхансер, сайт зв'язування рибосоми, сигнал термінації транскрипції і т. п. Нуклеїнові кислоти, що кодують важкий і легкий ланцюги, можуть зустрічатися в ізольованій формі або можуть бути клоновані в один або більше векторів. Нуклеїнові кислоти можна створювати, наприклад, методами твердофазного синтезу або полімеразно-ланцюгової реакції (PCR) олігонуклеотидів, що перекриваються. Нуклеїнові кислоти, що кодують важкий і легкий ланцюги, може бути об'єднані в одну сумішну нуклеїнову кислоту, наприклад, у векторі експресії, або можуть бути окремими, наприклад, кожна клонована у свій власний вектор експресії.

#### V. ТЕРАПЕВТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

Даний винахід пропонує декілька способів лікування або здійснення профілактики хвороб з тільцями Леві у пацієнтів, що страждають на них або є у групі ризику цих хвороб. Пацієнтами, яким підходить таке лікування, можуть бути особи, що є у групі ризику хвороби з тільцями Леві (LBD), але ще не виявляють її симптомів, а також пацієнти, які вже демонструють симптоми або ранні передвіщувальні ознаки синуклеїнопатії, наприклад, уповільнення електроенцефалографії (EEG), нейропсихіатричні прояви (депресія, деменція, галюцинації, відчуття тривоги, апатія, ангедонія), аутоімунні зміни (ортостатична гіпотензія, розлади сечового міхура, констипація, мимовільне випороження, гіперсаливація, розлад ковтання, статеві дисфункції, зміни у церебральному кровообігу), сенсорні зміни (відчуття нюху, болю, аномальне розпізнавання кольорів), розлади сну (розлад сну зі швидкими рухами очей (RBD), синдром втомлених ніг/періодичні рухи кінцівок, гіперсомнія, безсоння) та інші численні ознаки і симптоми (стомлювання, двоїння в очах, неясність зору, себорея, втрата або набирання маси тіла). Таким чином, запропоновані способи можуть застосовуватися в цілях профілактики до осіб, що мають відомий генетичний ризик захворювання на LBD. До таких осіб належать ті, які мають родичів, які самі були уражені цією хворобою, і ті, у яких ризик захворювання був визначений шляхом аналізу генетичних або біохімічних маркерів. До числа генетичних маркерів ризику розвитку хвороби Паркінсона входять мутації в  $\alpha$ -синуклеїні або паркіні, гени UCHL1 і CYP2D6, і особливо мутації у положеннях 30 і 53 гена  $\alpha$ -синуклеїну. Особи, що страждають на хворобу Паркінсона, можуть виявлятися за клінічними проявами у них тремтіння у спокійному стані, м'язової ригідності, брадикінезії та постуральної нестійкості.

Асимптоматичним пацієнтам лікування може надаватися у будь-якому віці (наприклад, 10, 20, 30 років). Але зазвичай починати лікування слід по досягненні пацієнтом віку 40, 50, 60 або 70 років. Як правило, лікування супроводжується введенням хворому численних доз ліків протягом певного періоду часу. Моніторинг процесу лікування може проводитися шляхом аналізу антитіл, або відповідей активованих Т-клітин або В-клітин на терапевтичний агент (наприклад, усичену форму  $\alpha$ -синуклеїнового пептиду) протягом певного часу. У разі відсутності відповіді може призначатися бустер-доза.

Даний винахід пропонує способи лікування або профілактики хвороби з тільцями Леві у пацієнта шляхом введення пацієнту антитіловмісної композиції в умовах, у яких у пацієнта виробляється благотворна терапевтична відповідь (наприклад, зменшення нейритних і/або аксональних агрегатів альфа-синуклеїну, зменшення нейритної дистрофії, поліпшення когнітивної функції і/або повернення у зворотному напрямку розвитку хвороби, лікування або інгібування когнітивного погіршення). Деякі способи дозволяють зменшити зони нейритної дистрофії в нейропілю гомогенетичної кори головного мозку і/або базальних нервових вузлах на 10 %, 20 %, 30 %, 40 % або більше порівняно з контролем.

Когнітивне погіршення, прогресивне затухання когнітивної функції, зміни в морфології мозку і зміни в цереброваскулярній функції зазвичай спостерігаються у пацієнтів, що страждають на хвороби з тільцями Леві або є у групі їх ризику. З цього погляду Даний винахід пропонує способи інгібування погіршення когнітивної функції у таких пацієнтів.

Даний винахід пропонує також способи збереження або підвищення синаптичної густини

і/або дендритної густини. Індекс змін у синаптичній або дендритній густині може бути виміряний за допомогою маркерів утворення синапсу (синаптофізин) і/або дендритів (MAP2). Деякі способи дозволяють відновити синаптичну або дендритну густину до рівня синаптичної або дендритної густини у здорових індивідуумів. Деякі способи дозволяють підвищити рівень синаптичної або дендритної густини у пацієнта на 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % або більше порівняно з контролем.

#### VI. ФАРМАЦЕВТИЧНІ КОМПОЗИЦІЇ ТА СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ

У профілактичному застосуванні антитіло або фармацевтичну композицію, що його містить, вводять пацієнту, який є схильним до захворювання або іншим чином є у групі ризику хвороби, у режимі (дозування, частоти і шляху введення), що є ефективними у зменшенні ризику, полегшенні або затримуванні виникнення принаймні одної ознаки або симптому хвороби. У деяких випадках профілактичного застосування зазначений режим є ефективним для інгібування або уповільнення накопичення альфа-синуклеїну та його усічених фрагментів у мозку і/або для інгібування або уповільнення виникнення його токсичних ефектів і/або інгібування або уповільнення розвитку поведінкових дефіцитів. При терапевтичному використанні антитіло вводять пацієнту, стосовно якого існують підозри на виникнення хвороби або який вже страждає на хворобу з тільцями Леві, в режимі (дозування, частоти і шляху введення), що дозволяє ефективно поліпшувати або принаймні інгібувати подальше погіршення стану, що відповідає принаймні одній ознаці або симптому хвороби. У деяких випадках терапевтичного застосування зазначений режим є ефективним для зменшення або принаймні інгібування подальшого росту рівнів альфа-синуклеїну та його усічених фрагментів, асоційованих з ними токсичності і/або поведінкових дефіцитів.

Режим вважається терапевтично або профілактично ефективним, якщо підданий індивідуальному лікуванню пацієнт досягає більш успішного результату, ніж середній результат, отриманий у контрольній популяції пацієнтів з порівняними станами, які не отримували лікування за допомогою способів за даним винаходом, або якщо більш успішний результат демонструють пацієнти, які отримували лікування, у порівнянні з контрольними пацієнтами у контрольованих клінічних випробуваннях (наприклад, фази II, фази II/III або фази III випробувань) з величиною значущості  $p < 0,05$  або  $0,01$ , або навіть  $0,001$ .

Ефективні дози варіюють в залежності від багатьох різноманітних факторів, включаючи засоби введення ліків, місце призначення, фізіологічний стан пацієнта, включаючи такі фактори: тип хвороби з тільцями Леві; те, або є пацієнт носієм ApoE; те, є пацієнт людиною або твариною; інші введені ліки; і те, є лікування профілактичним або терапевтичним.

Типовий інтервал дозування антитіла лежить у межах від  $0,01$  до  $5$  мг/кг, а частіше - у межах від  $0,1$  до  $3$  мг/кг або  $0,15$  -  $2$  мг/кг або  $0,15$  -  $1,5$  мг/кг ваги тіла пацієнта. У таких дозах антитіло може вводитися щоденно, через день, раз на тиждень, раз на два тижні, щомісячно, щоквартально або відповідно до будь-якого іншого розкладу, визначеного шляхом емпіричного аналізу. Типове лікування передбачає введення численних доз протягом тривалого періоду часу, наприклад, принаймні шести місяців. Режимми додаткового типового лікування передбачають введення по одній дозі ліків кожні два тижні, або кожного місяця, або кожні 3 - 6 місяців.

Антитіла можуть вводитися периферійним шляхом, тобто, таким, що введене або індукване антитіло проходить крізь гематоенцефалічний бар'єр і досягає місця призначення у мозку. Підходящими для цього шляхами введення є місцевий, внутрішньовенний, пероральний, підшкірний, внутрішньоартеріальний, внутрішньочерепний, внутрішньооболонковий, внутрішньоперитонеальний, внутрішньоносовий та внутрішньом'язовий. У деяких випадках підходящими шляхами введення антитіла є внутрішньовенний і підшкірний. Ін'єкції цього типу найчастіше робляться у м'язи плеча або ноги. У деяких способах ін'єкції антитіл роблять безпосередньо в цільову тканину, де відбувається накопичення відкладень, наприклад, внутрішньочерепним шляхом.

Фармацевтичні композиції для парентерального введення можуть бути стерильними і по суті ізотонічними, і вироблятися в умовах GMP (належної виробничої практики). Фармацевтична композиція може постачатися в однодозовій лікарській формі (тобто, в дозі для одного введення). Фармацевтична композиція може мати склад з одним або більше фізіологічно прийнятними носіями, розріджувачами, ексципієнтами або допоміжними засобами. Склад композиції залежить від обраного шляху введення. Антитіла для ін'єкцій можуть готуватися у водних розчинах, у кращому варіанті - у фізіологічно сумісних буферних розчинах, таких як розчин Хенкса, розчин Рінгера або фізіологічний розчин або ацетатний буферний розчин (для зменшення дискомфорту у місці ін'єкції). Розчин може містити допоміжні засоби готування препарату, такі як суспендувальний засіб, стабілізатор і/або диспергатор. В альтернативному



варіанті антитіла можуть мати ліофілізовану форму для готування складу перед використанням з підходящим носієм, наприклад, стерильною водою без пірогену.

У даних режимах вводити антитіло можна в комбінації з іншим засобом лікування або профілактики хвороби, від якої потрібно лікувати. Наприклад, у випадку хвороби Паркінсона у комбінаціях з вищеописаними режимами можуть уводитися засоби імунотерапії проти альфа-синуклеїну (WO/2008/103472), леводопа, агоністи дофаміну, COMT інгібітори, MAO-B інгібітори, амантадин або антихолінергічні засоби.

#### VII. ІНШІ ВИДИ ЗАСТОСУВАННЯ

Описані вище антитіла можуть використовуватися для детектування  $\alpha$ -синуклеїну у контексті клінічного діагнозу або лікування, або у дослідженнях. Ці антитіла можуть також продаватися як дослідницькі реагенти для лабораторних досліджень з детектування клітин, що несуть  $\alpha$ -синуклеїн, та їхньої відповіді на різноманітні подразники. У такому використанні моноклональні антитіла може бути помічені флуоресцентними молекулами, спін-міченими молекулами, ферментами або радіоізотопами і можуть постачатися у формі комплекту з усіма необхідними реагентами для проведення аналізу щодо  $\alpha$ -синуклеїну. Антитіла згідно з винаходом можуть також використовуватися для очистки  $\alpha$ -синуклеїну, наприклад, методом афінної хроматографії.

Запропоновані антитіла можуть використовуватися для детектування LB-тілець у пацієнтів. Такі способи є корисними для постановки або підтвердження діагнозу щодо PD або іншої хвороби, пов'язаної з наявністю LB-тілець у мозку, або схильності до неї. Ці способи можна використовувати, наприклад, стосовно пацієнтів, які виявляють наявність у них симптомів деменції. Якщо пацієнт має LB-тілець, то цілком імовірно, що він є ураженим хворобою з тільцями Леві, такою як хвороба Паркінсона. Запропоновані способи можуть використовуватися також стосовно асимптоматичних пацієнтів. Присутність тілець Леві або інших аномальних відкладень  $\alpha$ -синуклеїну свідчить про схильність до симптоматичної хвороби у майбутньому. Способи згідно з винаходом можуть використовуватися також у моніторингу розвитку хвороби і/або реакції на лікування пацієнтів, у яких раніше діагностували хворобу з тільцями Леві.

Запропоновані способи можуть здійснюватися шляхом введення пацієнту антитіла і потім детектування цього антитіла після його зв'язування. У разі потреби, аналізу імунної відповіді можна уникнути, якщо використовувати фрагмент антитіла, в якому немає константної ділянки повної довжини, такої як Fab. У деяких способах одне і те саме антитіло може служити як лікувальним, так і діагностичним реагентом.

Для постановки діагнозу (наприклад, з візуалізацією *in vivo*), антитіла можуть уводитися шляхом внутрішньовенної ін'єкції в тіло пацієнта або безпосередньо в мозок шляхом внутрішньочерепної ін'єкції, або шляхом свердління отвору в черепі. Дозування реагенту при цьому повинно бути в таких самих межах, що й у способах лікування. Зазвичай антитіло є міченим, хоча у деяких способах антитіло є неміченим, а для зв'язування з антитілом використовується вторинний засіб мічення. Вибір підходящої мітки залежить від використовуваних засобів детектування. Наприклад, для оптичного детектування підходящою є флуоресцентна мітка. Парамагнітні мітки є підходящими для томографічного детектування без хірургічного втручання. Радіоактивні мітки можуть детектуватися також за допомогою томографів PET або SPECT.

Діагноз ставлять шляхом порівняння кількості, розміру і/або інтенсивності мічених локусів з відповідними величинами базового рівня. Величини базового рівня можуть бути представлені їхніми середніми значеннями у популяції індивідумів, які не захворіли. Величини базового рівня можуть бути також представлені попередніми рівнями, визначеними у того ж самого пацієнта. Наприклад, величини базового рівня можуть бути визначені у пацієнта перед початком лікування, а виміряні величини після цього можна порівнювати з величинами базового рівня. Виміряні величини, зменшені відносно базового рівня, будуть при цьому свідчити про позитивну реакцію на лікування.

Антитіла згідно з винаходом можна використовувати для продукування антиідіотипічних антитіл, як описано, наприклад, у (Greenspan & Bona, FASEB J. 7(5):437-444, 1989; i Nissinoff, J. Immunol. 147:2429-2438, 1991). Такі антиідіотипічні антитіла можуть використовуватися у фармакокінетичних, фармакодинамічних, біодистрибуційних дослідженнях, а також у дослідженнях клінічних відповідей на людські антитіла проти людських антитіл (НАНА) у індивідумів, що отримували лікування цими антитілами. Наприклад, антиідіотипічні антитіла специфічно зв'язують варіабельну ділянку гуманізованого антитіла 5C1 і, отже, можуть використовуватися для детектування гуманізованого антитіла 5C1 у фармакокінетичних дослідженнях і полегшують кількісну оцінку реакції на людські антитіла проти людських антитіл (НАНА) у індивідумів, що піддавались лікуванню.

#### VIII. НАБОРИ

Даний винахід пропонує також набори, в які входить  $\alpha$ -синуклеїн-специфічне антитіло та інструкції з користування. Такі набори можуть використовуватися, наприклад, для здійснення описаних вище діагностичних способів. В набір може входити також етикетка. Набори зазвичай містять маркування з інструкціями щодо користування набором. Маркування можуть включати також схему, таблицю або інший відповідний засіб, у якому вказані рівні кореляції вимірної величини з рівнями антитіл до  $\alpha$ -синуклеїну. Використовуваний тут термін "маркування" означає взагалі будь-який письмовий або іншим чином записаний засіб передачі інформації, який додається до набору або іншим чином його супроводжує у будь-який момент під час його виготовлення, транспортування, продажу або застосування. Термін "маркування" охоплює своїм значенням також рекламні листівки та брошури, пакувальні матеріали, інструкції, аудіо- або відеокасети, комп'ютерні диски, а також написи, надруковані безпосередньо на наборі.

Даний винахід пропонує також діагностичні набори для візуалізації *in vivo*. Такі набори зазвичай містять антитіло зв'язування з епітопом  $\alpha$ -синуклеїну відповідно до представленого в даному описі. Антитіло може бути міченим або до набору може бути включений допоміжний маркерний реагент. Такий набір може містити також інструкції стосовно проведення аналізу з візуалізацією *in vivo*.

Усі патентні заявки, веб-сайти та інші публікації, номери доступу та інші джерела, цитовані вище або нижче, є включеними тут в усій їхній повноті і для всіх цілей шляхом посилання в такому ж ступеню, як би кожне з них було в індивідуальному порядку та специфічним чином визначене включенням тут шляхом посилання. У тих випадках, коли різні версії певної послідовності є зв'язаними з номером доступу в різний час, у даному описі вказується версія зв'язана з номером доступу на діючу дату подачі даної заявки. Вираз "діюча дата подачі заявки" означає більш ранню, ніж фактична, дату подачі заявки з відсильним номером доступу, якщо він є діючим. Подібним чином, якщо різні версії тої або іної публікації, публікації на вебсайті і т. п. опубліковані в різний час, то, якщо не зазначено іншого, вказується версія з найбільш ранньою публікацією на діючу дату подачі заявки. Якщо спеціальним чином не зазначено іншого, то будь які особливості, стадії, елементи, втілення або аспекти за даним винаходом можуть використовуватися в комбінаціях з будь-якими іншими з них. Хоча в даному описі подана певна деталізація даного винаходу, вона представлена як приклад і несе виключно ілюстративне та роз'яснювальне спрямування і, цілком зрозуміло, жодним чином не обмежує певних змін та модифікацій, здійснених в рамках об'єму, окресленого Формулою винаходу.

#### ПРИКЛАДИ

##### Приклад 1. Відокремлення мишачого антитіла 5C1

Мишаче антитіло 5C1 було продуковане в миші, якій була зроблена ін'єкція пептидного кон'югату, що містив імуногенний пептид VDPDNEAYEGGC (SEQ ID NO: 14), зв'язаний з антитілом вівці проти миші. Цей пептид, який включає залишки 118-126  $\alpha$ -синуклеїну, злиті з С-кінцевим GGC-пептидом, був зв'язаний з антитілом вівці проти миші малеїмідним лінкером, зв'язаним з С-кінцевим цистеїновим залишком.

##### Приклад 2. Пасивна імунізація антитіла до $\alpha$ -синуклеїну

Для того, щоб протестувати ефект антитіл до  $\alpha$ -синуклеїну на тваринній моделі хвороби з тільцями Леві, використовували різноманітні антитіла до  $\alpha$ -синуклеїну для пасивної імунізації мишей. При цьому використовувалися  $\alpha$ -синуклеїн-нокаутні і  $\alpha$ -синуклеїн-трансгенні (лінія 61) самички мишей дикого типу, 3-4 місячного віку ( $n = 14$ /групу). Тестуванню піддавали такі антитіла:

- 9E4 (IgG1, епітоп: амінокислоти 118-126  $\alpha$ -синуклеїну);
- 5C1 (IgG1, імуноген: амінокислоти 118-126  $\alpha$ -синуклеїну, cys-лінкер);
- 5D12 (IgG2, імуноген: амінокислоти 118-126  $\alpha$ -синуклеїну, n-лінкер);
- 1H7 (IgG1, епітоп: амінокислоти 91-99  $\alpha$ -синуклеїну); і
- 27-1 (IgG1, контрольне антитіло).

Кожна миша отримала дозу антитіл 10 мг/кг протягом 5 місяців загалом 21 ін'єкцію. Крім того, тваринам робили ін'єкції лентивірусу (LV), що експресує людський  $\alpha$ -синуклеїн (дикого типу), шляхом одностороннього введення людського  $\alpha$ -синуклеїну (дикого типу) у гіпокамп.

Антитілами, що зчитувалися, були антитіла до  $\alpha$ -синуклеїну від Chemicon (епітоп:  $\alpha$ -синуклеїн повної довжини), Millipore (епітоп:  $\alpha$ -синуклеїн повної довжини) і ELADW 105 (епітоп: амінокислоти 121-124  $\alpha$ -синуклеїну, у кращому варіанті з  $\alpha$ -синуклеїном усіченим на групі 122-124).

Завершення експерименту. Перед завершенням експерименту був проведений моніторинг титрів антитіл. Поведінка оцінювалася за допомогою тестів на водному лабіринті Моріса (MWM: Morris Water Maze) і горизонтальних круглих балках. Тест на круглих балках дає оцінку моторному балансу, координації і ході за допомогою двох балок різних діаметрів. Балка А

призначається для тренування, має більший діаметр, і отже ходити по ній легше. Балка D призначається для тестування, має менший діаметр, і, таким чином, ходити по ній складніше. Тест у водному лабіринті проводили на 10 тижні, тобто перед самим завершенням експерименту. По завершенні експерименту мишей умертвляли і проводили нейропатологічні вимірювання щодо  $\alpha$ -агрегації синуклеїну, синаптофізину і MAP2. Крім того, проводили також біохімічні вимірювання стосовно  $\alpha$ -синуклеїну, PSD95 і синаптофізину. Вибрані методи множинного мічення і конфокального мічення здійснювали за допомогою синаптичних, нейронних і гліальних маркерів.

Результати. Отримані результати показали, що всі антитіла, за винятком 5D12, привели до значного зменшення накопичення  $\alpha$ -syn і до збереження синаптичної і дендритної густини, а також до позитивних результатів MWM-тестів. Антитіло 9E4 було ефективним у *in vitro* та *in vivo* дослідках а також у поведінкових тестах. Слід особливо підкреслити, що дані результати засвідчили здатність випробуваних антитіл проти  $\alpha$ -синуклеїну зменшувати нейритні та аксональні  $\alpha$ -агрегати синуклеїну.

Результати поведінкових досліджень. Антитіла 5C1 і 9E4 поліпшили поведінку у водному лабіринті  $\alpha$ -синуклеїн-трансгенних мишей; значне, хоча і трохи менше, поліпшення дало також антитіло 1H7 (Фіг. 3). На противагу ним, антитіло 5D12 не привело до поліпшення тесту у водному лабіринті  $\alpha$ -синуклеїн-трансгенн мишей. З погляду результатів тесту на горизонтальній круглій балці, антитіла 9E4 і 1H7 дали поліпшення як у швидкості руху, так і в кількості помилок, у той час як антитіла 5D12 і 5C1 такого поліпшення не продемонстрували (Фіг. 4). Дані, представлені на Фіг. 4, виражені у формі кількості сповзань (тобто, "помилки"), приведеної до 10 см відстані, і величини подоланої відстані за одиницю часу, тобто, "швидкості" - 10 см/с.

Результати нейропатологічних досліджень. Антитіла 5C1, 9E4 і 1H7 зменшили ELADW-105 позитивну нейритну дистрофію, у той час як антитіло 5D12 не показало цього. В  $\alpha$ -синуклеїн-трансгенних мишах антитіло 9E4 зменшило зону нейропілю на 43 % у гомогенетичній корі головного мозку і на 40 % у базальних нервових вузлах у порівнянні з контрольними мишами (тобто, з мишами, які отримували контрольне антитіло 27-1 IgG1). Антитіло 9E4 також зберігає забарвлення, характерне для синаптофізину і MAP2, у гомогенетичній корі головного мозку і базальних нервових вузлах.

Приклад 3. Секвенування варіабельних доменів антитіла 5C1

мРНК екстрагували та очищали від 5C1 гібридомного клітинного дебрісу за допомогою набору QIAGEN® OLIGOTEX® мРНК. Очищені мРНК транскрибували у сДНК за допомогою оліго-dT протизмістовного праймера і набору INVITROGEN® SUPERScript® II. Нуклеїновокислотні послідовності, що кодують варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів антитіла 5C1, ампліфікували із сДНК за допомогою PCR-реакцій, що кодують вироджені смислові праймери VH і VL та ген-специфічний (CH/CL) протизмістовний праймер. Продукти PCR-реакцій, які були сконструйовані для включення послідовності сигнального пептиду, варіабельного домену і константного домену (аж до протизмістовного праймера), були очищені гелем, клоновані у дефосфолірований вектор або TA-вектор, потім секвенували. Послідовності були виведені за аналізами принаймні 3 незалежних клонів, що мають відкриту рамку зчитування, починаючи від метіоніну і простягаючись далі через варіабельні ділянки у константну ділянку.

Нуклеїнова кислота, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла 5C1, має послідовність SEQ ID NO: 5. Послідовність відповідного протеїну (Фіг. 1), яка включає сигнальний пептид у положенні 1-19 (підкреслено), має такий вигляд:

MERHWIFLFLSVTGGVHSQVQLQQSGAELAKPGTSVQMCKASGYTFTNYWMNWIARPGQG  
LEWIGATNPNGYTDYNQRFKDKAILTADKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYFCASGGHLAYWGQGTV  
VTVSA (SEQ ID NO: 6)

Нуклеїнова кислота, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла 5C1, має послідовність SEQ ID NO: 7. Послідовність відповідного протеїну (Фіг. 2), яка включає сигнальний пептид у положенні 1-19 (підкреслено), має такий вигляд:

MKLPRVRLVLMFWIPASSSDVVMQTQIPLYLSVSPGDQASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPG  
QSPKLLINRVSNRFSGVPRDFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGVFCSQSAHVPWTFGGGKLEIR  
(SEQ ID NO: 8)

Амінокислотна послідовність для зрілої варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла 5C1 (SEQ ID NO: 9) показана у Табл. 1 (нижче), а відповідна амінокислотна послідовність для зрілої варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла 5C1 (SEQ ID NO: 24) показана у Табл. 2 (нижче). В усіх випадках використовується нумерація Kabat.

Приклад 4. Гумацізація мишачого 5C1

Аналіз CDR-ділянок Vh-ділянки антитіла 3H6 виявляє наявність CDR-H1 із 5 залишків (SEQ

ID NO: 10), CDR-H2 із 17 залишків (SEQ ID NO: 11) і CDR-H3 із 6 залишків (SEQ ID NO: 12). Аналогічний аналіз CDR-ділянок Vk-ділянки антитіла 3H6 виявляє наявність CDR-L1 із 16 залишків (SEQ ID NO: 25), CDR-L2 із 7 залишків (SEQ ID NO: 26) і із CDR-L3 9 залишків (SEQ ID NO: 27).

5 Аналіз залишків на межі поділу Vk- і Vh-ділянок антитіла 5C1 показує, що в їхній більшості це є звичайні для таких ділянок залишки.

Дослідження бази даних ненадлишкових білкових послідовностей із генбанку NCBI дозволили провести відбір підходящих людських каркасів для імплантації в них CDR-ділянок мишачого антитіла 5C1. У випадку Vk-ділянки був вибраний людський легкий капа-ланцюг із генбанку NCBI з кодом доступу CAB51293.1 (GI:5578786; SEQ ID NO: 28). Для Vh-ділянки був вибраний важкий ланцюг AAY42876.1 (GI:66096557; SEQ ID NO: 13) людського Ig.

У Табл. 1 і Табл. 2 подані типові гуманізовані Vh- і Vk-конструкції зі зворотними мутаціями на основі вибраних людських каркасів.

Типові гуманізовані конструкції Vh-ділянки

15 Було сконструйовано п'ять різних гуманізованих версій Vh ділянки антитіла 5C1: H1, H2, H3, H4 і H5. При визначенні зворотних мутацій вибір, кінець кінців, пав на залишки H11, H27, H30, H48, H67, H69, H73, H91 і H94. У кожній конструкції гуманізованої Vh-ділянки залишки H11, H27, H30, H48 і H73 піддавали зворотним мутаціям, відповідно, на L, Y, T, I і K, оскільки ці залишки утворювали собою частину ділянки CDR-H1 відповідно до нумерації Chothia (H27 і H30) або оскільки відповідні залишки в людській каркасній послідовності не так часто зустрічаються (V у положенні H11, M у положенні H48 і E у положенні H73). У випадку версії H1 (SEQ ID NO: 14) додаткові залишки H67 і H69 піддавали зворотним мутаціям (відповідно, на A і L) для збереження CDR пакування. У версії H2 (SEQ ID NO: 15) жодних подальших зворотних мутацій не вводили (тобто, зворотні мутації у положеннях H67 і H69 у версії H1 ліквідували). У версії H3 (SEQ ID NO: 16) додаткові залишки H67, H69, H91 і H94 були піддані зворотним мутаціям (відповідно, на A, L, F і S). Зворотні мутації залишків H67, H69 і H94 були проведені з метою збереження пакування CDR, у той час як H91, Vh/Vk-інтерфейсний залишок, був підданий зворотній мутації з метою тестування його впливу на межу поділу. У версії H4 (SEQ ID NO: 17) зворотним мутаціям піддавали додаткові залишки H67, H69 і H94 (відповідно, на A, L і S). Таким чином, версія H4 відрізняється від H3 тим, що зворотна мутація в H91 була ліквідована. У версії H5 (SEQ ID NO: 18) додатковий залишок H94 був також підданий зворотній мутації (на S) з метою збереження CDR пакування.

Таблиця 1

Гуманізовані Vh-ділянки антитіла 5C1

Kabat #	Лінійна #	FR або CDR	Миша 5C1 (SEQ ID NO: 9)	Hu VH Акцептор FR (SEQ ID NO: 13)	5C1 H1 (SEQ ID NO: 14)	5C1 H2 (SEQ ID NO: 15)	5C1 H3 (SEQ ID NO: 16)	5C1 H4 (SEQ ID NO: 17)	5C1 H5 (SEQ ID NO: 18)
				Acc#AAY42876.1					
1	1	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	A	K	K	K	K	K	K
13	13	Fr1	K	K	K	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G

Таблиця 1

## Гуманізовані Vh-ділянки антитіла 5C1

Kabat #	Лінійна #	FR або CDR	Миша 5C1 (SEQ ID NO: 9)	Hu VH Акцептор FR (SEQ ID NO: 13)	5C1 H1 (SEQ ID NO: 14)	5C1 H2 (SEQ ID NO: 15)	5C1 H3 (SEQ ID NO: 16)	5C1 H4 (SEQ ID NO: 17)	5C1 H5 (SEQ ID NO: 18)
16	16	Fr1	T	S	S	S	S	S	S
17	17	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
18	18	Fr1	V	V	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	Q	K	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	M	V	V	V	V	V	V
21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
26	26	Fr1	G	G	G	G	G	G	G
27	27	Fr1	Y	G	Y	Y	Y	Y	Y
28	28	Fr1	T	T	T	T	T	T	T
29	29	Fr1	F	F	F	F	F	F	F
30	30	Fr1	T	N	T	T	T	T	T
31	31	CDR-H1	N	N	N	N	N	N	N
32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	W	A	W	W	W	W	W
34	34	CDR-H1	M	I	M	M	M	M	M
35	35	CDR-H1	N	N	N	N	N	N	N
35A		CDR-H1	—	—	—	—	—	—	—
35B		CDR-H1	—	—	—	—	—	—	—
36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	I	V	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	R	R	R	R	R	R
39	39	Fr2	A	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	A	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	G	G	G	G	G	G	G
43	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
44	44	Fr2	G	G	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	I	I	I	I	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	A	G	A	A	A	A	A
51	51	CDR-H2	T	I	T	T	T	T	T
52	52	CDR-H2	N	I	N	N	N	N	N

Таблиця 1

## Гуманізовані Vh-ділянки антитіла 5C1

Kabat #	Лінійна #	FR або CDR	Миша 5C1 (SEQ ID NO: 9)	Hu VH Акцептор FR (SEQ ID NO: 13)	5C1 H1 (SEQ ID NO: 14)	5C1 H2 (SEQ ID NO: 15)	5C1 H3 (SEQ ID NO: 16)	5C1 H4 (SEQ ID NO: 17)	5C1 H5 (SEQ ID NO: 18)
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	—	—	—	—	—	—	—
52C		CDR-H2	—	—	—	—	—	—	—
53	54	CDR-H2	N	I	N	N	N	N	N
54	55	CDR-H2	N	F	N	N	N	N	N
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	D	T	D	D	D	D	D
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	N	A	N	N	N	N	N
61	62	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
62	63	CDR-H2	R	K	R	R	R	R	R
63	64	CDR-H2	F	F	F	F	F	F	F
64	65	CDR-H2	K	Q	K	K	K	K	K
65	66	CDR-H2	D	G	D	D	D	D	D
66	67	Fr3	K	R	R	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	A	V	A	A	V
68	69	Fr3	I	T	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	L	I	L	I	L	L	I
70	71	Fr3	T	T	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	K	E	K	K	K	K	K
74	75	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	T	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	N	N	N	N	N	N
77	78	Fr3	T	T	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	M	M	M	M	M	M	M
81	82	Fr3	H	E	E	E	E	E	E
82	83	Fr3	L	L	L	L	L	L	L

Таблиця 1

## Гуманізовані Vh-ділянки антитіла 5C1

Kabat #	Лінійна #	FR або CDR	Миша 5C1 (SEQ ID NO: 9)	Hu VH Акцептор FR (SEQ ID NO: 13)	5C1 H1 (SEQ ID NO: 14)	5C1 H2 (SEQ ID NO: 15)	5C1 H3 (SEQ ID NO: 16)	5C1 H4 (SEQ ID NO: 17)	5C1 H5 (SEQ ID NO: 18)
82A	84	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	R	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	S	T	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	F	Y	Y	Y	F	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
94	98	Fr3	S	R	R	R	S	S	S
95	99	CDR-H3	G	E	G	G	G	G	G
96	100	CDR-H3	G	G	G	G	G	G	G
97	101	CDR-H3	H	N	H	H	H	H	H
98		CDR-H3	—	L	—	—	—	—	—
99		CDR-H3	—	N	—	—	—	—	—
100		CDR-H3	—	W	—	—	—	—	—
100A	102	CDR-H3	L	L	L	L	L	L	L
100B		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100C		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100D		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100E		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100F		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100G		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100H		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100I		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100J		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100K		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—

Таблица 1

## Гуманізовані Vh-ділянки антитіла 5C1

Kabat #	Лінійна #	FR або CDR	Миша 5C1 (SEQ ID NO: 9)	Hu VH Акцептор FR (SEQ ID NO: 13)	5C1 H1 (SEQ ID NO: 14)	5C1 H2 (SEQ ID NO: 15)	5C1 H3 (SEQ ID NO: 16)	5C1 H4 (SEQ ID NO: 17)	5C1 H5 (SEQ ID NO: 18)
101	103	CDR-H3	A	D	A	A	A	A	A
102	104	CDR-H3	Y	P	Y	Y	Y	Y	Y
103	105	Fr4	W	W	W	W	W	W	W
104	106	Fr4	G	G	G	G	G	G	G
105	107	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	108	Fr4	G	G	G	G	G	G	G
107	109	Fr4	T	T	T	T	T	T	T
108	110	Fr4	V	L	L	L	L	L	L
109	111	Fr4	V	V	V	V	V	V	V
110	112	Fr4	T	T	T	T	T	T	T
111	113	Fr4	V	V	V	V	V	V	V
112	114	Fr4	S	S	S	S	S	S	S
113	115	Fr4	A	S	S	S	S	S	S

Типові нуклеїновокислотні послідовності, що кодують гуманізовані H1, H2, H3, H4 і H5 антитіла 5C1, пропонуються у послідовностях SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22 і 23, відповідно.

Типові гуманізовані конструкції Vk-ділянки

- 5 Були сконструйовані чотири різні гуманізовані версії 5C1антитіла 5C1: L1, L2, L3 і L4. При визначенні зворотних мутацій вибір, кінець кінців, пав на залишки L2, L12, L14, L45, L49 і L87. У кожній конструкції гуманізованої Vk-ділянки залишки L12 і L14 були піддані зворотній мутації на S, оскільки відповідні залишки в людській каркасній послідовності (відповідно, P і T) є залишками, що зустрічаються з відносно низькою частотою. У випадку версії L1 (SEQ ID NO: 29) додаткові залишки L2, L45, L49 і L87 піддавали зворотним мутаціям (відповідно, на V, K, N і F).
- 10 L2 є канонічним залишком, що взаємодіє з CDR; L45 зазнає перемикування полярності та заряду з мишачої на людську каркасну послідовність (K на Q) і, таким чином, може впливати на фолдінг; L49 є ноніусним залишком, а L87 є Vh/Vk-інтерфейсним залишком. У версії L2 (SEQ ID NO: 30) додатковий залишок L45 був підданий зворотній мутації на K. Таким чином, відносно L1, зворотні мутації на залишках L2, L49 і L87 були ліквідовані. У версії L3 (SEQ ID NO: 31) додаткові залишки L2, L49 і L87 були піддані зворотним мутаціям (відповідно, на V, N і F). Таким чином, відносно L1, зворотна мутація на залишку L45 була ліквідована. У версії L4 (SEQ ID NO: 32) зворотним мутаціям не було піддано жодних додаткових залишків (тобто, зворотним мутаціям були піддані лише залишки L12 і L14).

20

Таблица 2

## Гуманізовані Vk-ділянки антитіла 5C1

Kabat #	Лінійна #	FR або CDR	Миша 5C1 VL (SEQ ID NO: 24)	Hu Vk Акцептор Fr (SEQ ID NO: 28)	5C1 L1 (SEQ ID NO: 29)	5C1 L2 (SEQ ID NO: 30)	5C1 L3 (SEQ ID NO: 31)	5C1 L4 (SEQ ID NO: 32)
				Acc# CAB51293.1				
1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	V	I	V	I



Гуманізовані V<sub>k</sub>-ділянки антитіла 5C1

Kabat #	Лінійна #	FR або CDR	Миша 5C1 VL (SEQ ID NO: 24)	Hu V <sub>k</sub> Акцептор Fr (SEQ ID NO: 28)	5C1 L1 (SEQ ID NO: 29)	5C1 L2 (SEQ ID NO: 30)	5C1 L3 (SEQ ID NO: 31)	5C1 L4 (SEQ ID NO: 32)
3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	I	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	Y	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	P	S	S	S	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	T	S	S	S	S
15	15	Fr1	P	P	P	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	D	E	E	E	E	E
18	18	Fr1	Q	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	F	L	F	F	F	F
27D	31	CDR-L1	H	H	H	H	H	H
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27F		CDR-L1	—	—	—	—	—	—
28	33	CDR-L1	K	N	K	K	K	K
29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G	G
30	35	CDR-L1	N	Y	N	N	N	N
31	36	CDR-L1	T	N	T	T	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L	L

Гуманізовані V<sub>k</sub>-ділянки антитіла 5C1

Kabat #	Лінійна #	FR або CDR	Миша 5C1 VL (SEQ ID NO: 24)	Hu V <sub>k</sub> Акцептор Fr (SEQ ID NO: 28)	5C1 L1 (SEQ ID NO: 29)	5C1 L2 (SEQ ID NO: 30)	5C1 L3 (SEQ ID NO: 31)	5C1 L4 (SEQ ID NO: 32)
34	39	CDR-L1	H	D	H	H	H	H
35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
37	42	Fr2	L	L	L	L	L	L
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	K	K	K	K	K	K
40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	K	Q	K	K	Q	Q
46	51	Fr2	L	L	L	L	L	L
47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	N	Y	N	Y	N	Y
50	55	CDR-L2	R	L	R	R	R	R
51	56	CDR-L2	V	G	V	V	V	V
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N	N
54	59	CDR-L2	R	R	R	R	R	R
55	60	CDR-L2	F	A	F	F	F	F
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	S	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	G	G	G	G	G	G
65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D	D

Гуманізовані V<sub>κ</sub>-ділянки антитіла 5C1

Kabat #	Лінійна #	FR або CDR	Миша 5C1 VL (SEQ ID NO: 24)	Hu V <sub>κ</sub> Акцептор Fr (SEQ ID NO: 28)	5C1 L1 (SEQ ID NO: 29)	5C1 L2 (SEQ ID NO: 30)	5C1 L3 (SEQ ID NO: 31)	5C1 L4 (SEQ ID NO: 32)
71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	K	K	K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	G	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	L	V	V	V	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	F	Y	F	Y	F	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	S	M	S	S	S	S
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	S	A	S	S	S	S
92	97	CDR-L3	A	L	A	A	A	A
93	98	CDR-L3	H	Q	H	H	H	H
94	99	CDR-L3	V	T	V	V	V	V
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3	—	—	—	—	—	—
95B		CDR-L3	—	—	—	—	—	—
95C		CDR-L3	—	—	—	—	—	—
95D		CDR-L3	—	—	—	—	—	—
95E		CDR-L3	—	—	—	—	—	—
95F		CDR-L3	—	—	—	—	—	—
96	101	CDR-L3	W	P	W	W	W	W
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	G	G	G	G	G
101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G

Таблиця 2

## Гуманізовані Vk-ділянки антитіла 5C1

Kabat #	Лінійна #	FR або CDR	Миша 5C1 VL (SEQ ID NO: 24)	Hu Vk Акцептор Fr (SEQ ID NO: 28)	5C1 L1 (SEQ ID NO: 29)	5C1 L2 (SEQ ID NO: 30)	5C1 L3 (SEQ ID NO: 31)	5C1 L4 (SEQ ID NO: 32)
102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	V	V	V	V	V
105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	I	I	I	I	I
106A		Fr4	—	—	—	—	—	—
107	112	Fr4	R	K	K	K	K	K

Типові нуклеїновокислотні послідовності, що кодують гуманізовані L1, L2, L3 і L4 антитіла 5C1, пропонуються в послідовностях, відповідно, SEQ ID NO: 33, 34, 35 і 36.

Приклад 5. Афінність гуманізованого антитіла 5C1 до альфа-синуклеїну

- 5 За допомогою твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA) були проведені дослідження афінності різноманітних комбінацій гуманізованих важких ланцюгів і гуманізованих протеїнів легких ланцюгів антитіла 5C1 до  $\alpha$ -синуклеїну. Як показано на Фіг. 5, версія H1L1 гуманізованого антитіла 5C1 не відобразила афінності щодо  $\alpha$ -синуклеїну в умовах аналізу. На протипагу цьому, химерне антитіло 5C1 мало більшу афінність до  $\alpha$ -синуклеїну, ніж мишаче антитіло 5C1. Гуманізовані версії H3L4, H4L3 і химерна версія H + L3 показали порівнянні з цим і майже такі самі результати, що й химерне антитіло 5C1. Крім того, гуманізовані версії H3L3 і H3L1 показали порівнянні з вищеописаними результати, хоча і з трохи нижчою афінністю, ніж H3L4, H4L3 і химерне H + L3.

- 15 [0002] Більш точного визначення афінності зв'язування різноманітні гуманізовані версії антитіла 5C1 були також проаналізовані щодо біомолекулярної взаємодії на приладі Biacore. Для цього був приготований сенсорний чип IgG CM5 (Biacore) проти людини відповідно до протоколу від компанії GE Healthcare. Кожна гуманізована версія антитіла 5C1 незалежно захоплювалося на рівень, де  $R_{max}$  не був би більше 50, за допомогою рівняння:

$$R_{max} = (RU \text{ захопленого антитіла}) * (MW \text{ синуклеїну}) / (MW \text{ захопленого антитіла}) * 2$$

- 20 Коефіцієнт 2 у знаменнику означає кількість сайтів зв'язування в антитілі. Потік альфа-синуклеїну перепускали над чипом у концентрації, що варіювала від ~10X вище очікуваної рівноважної константи взаємодії (KD) до ~10X нижче очікуваної KD. Отримані дані збирали та віднімали подвійний базовий рівень для врахування дрейфу і малої величини неспецифічного зв'язування. Ці дані аналізували за допомогою програми Biacore оцінки результатів досліджень, використовуючи модель 1:1 та принцип загальної узгодженості.

- 25 Результати аналізу за методикою Biacore підсумовані в Табл. 3 (нижче). Ці результати вказують на те, що найбільша частина втрати афінності до альфа-синуклеїну зумовлена збільшеною дисоціацією (off rate) у деяких версіях антитіла. На основі цих даних щодо афінності, версія H4L3 була визнана кращим антитілом.

30

Таблиця 3

## Афінність варіантів антитіла 5C1, визначена за методикою Biacore

Варіант 5C1	# Каркасні мишачі амінокислоти		K <sub>D</sub> Рівноважна константа взаємодії	K <sub>on</sub> Швидкість зв'язування	K <sub>off</sub> Швидкість дисоціації
	HC Важкий ланцюг	LC Легкий ланцюг			
m5C1	82	80	68,7 нМ	7,5x10 <sup>4</sup> /с	5,1x10 <sup>3</sup> /с

Таблиця 3

Афінність варіантів антитіла 5C1, визначена за методикою Biacore

Варіант 5C1	# Каркасні мишачі амінокислоти		K <sub>D</sub> Рівноважна константа взаємодії	K <sub>on</sub> Швидкість зв'язування	K <sub>off</sub> Швидкість дисоціації
Ch5C1	82	80	86,0 нМ	6,1x10 <sup>4</sup> /с	5,3x10 <sup>3</sup> /с
h5C1_H3L4	65, включно 9 зворотних мутацій (V11L, G27Y, N30T, M48I, V67A, I69L, E73K, Y91F, R94S)	69, включно 2 зворотні мутації (P12S, T14S)	1237,0 нМ	4,4x10 <sup>4</sup> /с	54,5x10 <sup>3</sup> /с
h5C1_H4L3	64, включно 8 зворотних мутацій (V11L, G27Y, N30T, M48I, V67A, I69L, E73K, R94S)	72, включно 5 зворотних мутацій (I2V, P12S, T14S, Y49N, Y87F)	119,8 нМ	4,4x10 <sup>4</sup> /с	5,1x10 <sup>3</sup> /с
h5C1_H4L4		69, включно 2 зворотних мутацій (P12S, T14S)	600,9 нМ	5,3x10 <sup>4</sup> /с	32,4x10 <sup>3</sup> /с
h5C1_H5L3	62, включно 6 зворотних мутацій (V11L, G27Y, N30T, M48I, E73K, R94S)	72, включно 5 зворотних мутацій (I2V, P12S, T14S, Y49N, Y87F)	283,1 нМ	3,9x10 <sup>4</sup> /с	11,1x10 <sup>3</sup> /с
h5C1_H5L4		69, включно 2 зворотні мутації (P12S, T14S)	1062,0 нМ	3,7x10 <sup>4</sup> /с	40,3x10 <sup>3</sup> /с

## Приклад 6. Аланін-сканувальний мутагенез

Епітопи, зв'язані антитілами 5C1, 9E4 і 5D12, були приблизно картовані таким чином, щоб бути в інтервалі залишків 118-126 альфа-синуклеїну завдяки антитілам зв'язування з пептидами, що перекриваються. У даному прикладі описане більш точне картування шляхом аланін-сканувального мутагенезу кожного залишку в інтервалі між положенням 118 і 126 альфа-синуклеїну. Аланін використовувався через його невелику, хімічно інертну, метильну функціональну групу, яка, незважаючи на це, все ж імітує переваги вторинної структури, які мають багато інших амінокислот. На верхніх частинах Фіг. 6, 7 і 8 представлені результати вестерн-блотів, забарвлених антитілами, відповідно, 9E4, 5C1 і 5D12. Ці блоти включають альфа-синуклеїн повної довжини і точкові мутанти альфа-синуклеїну, продуковані аланін-сканувальним мутагенезом залишків 118-126 і забарвлені 0,5  $\mu$ г/мл антитіла. Мутації у положенні 122 і 125 практично ліквідують зв'язування антитіла 9E4, у той час як мутації в інших

положеннях мають невеликий, якщо взагалі мають будь-який, ефект. Таким чином, антитіло 9E4 контактує переважно з залишками 122 і 125. Мутації у положенні 120-122 практично ліквідують зв'язування антитіла 5C1, а мутації у положенні 123 і 124 по суті зменшують зв'язування, але не руйнують його. Таким чином, антитіло 5C1 контактує переважно з залишками 120-122 і, в меншій мірі, з залишками 123-124. Мутації у положенні 120-122 практично ліквідують зв'язування антитіла 5D12, а мутації у положеннях 118, 119, 123 і 124 по суті зменшують зв'язування, але не руйнують його. Таким чином, антитіло 5D12 зв'язується переважно з положеннями 120-122 і, в меншій мірі, з положеннями 118, 119, 123 і 124. На фігурах креслення Фіг. 6-8 антитіло 1H7 використовується як контроль. 1H7 зв'язується з залишками 91-98 альфа-синуклеїну і, отже, може зв'язуватися з альфа-синуклеїном незалежно від наявності мутацій у залишках 118-126.

Відмінна специфічність зв'язування антитіла 9E4 у порівнянні з 5C1 і 5D12 може частково бути віддзеркаленням відповідних способів їх продукування. 9E4 було отримане шляхом імунізації альфа-синуклеїном повної довжини, продуктом чого стало антитіло, що зв'язує конформаційний епітоп. 5C1 і 5D12 були отримані шляхом імунізації пептидом із 10 амінокислот, продуктом чого став лінійний епітоп.

На Фіг. 9 показана модель, яка побудована із кульок на гілках і відображає просторову структуру амінокислот в альфа-синуклеїні поблизу сайтів зв'язування антитіл 9E4, 5C1 і 5D12. Два безперервні залишки епітопа, залишки 122 і 125, що є зв'язаними антитілом 9E4, утворюють кишеню в конформації альфа-синуклеїнового білка повної довжини.

Представлений тут опис даного винаходу не обмежує жодних змін і модифікацій, які можуть бути зроблені в рамках його ідеї та об'єму, окреслених у доданій Формулі винаходу. Якщо із контексту даного опису з очевидністю не випливає іншого, то будь-які стадії, особливості, втілення або аспекти можуть використовуватися в комбінаціях з будь-якими іншими з них. Усі публікації, патентні заявки, веб-сайти, номери доступу та інші джерела, цитовані в даному описі, є включеними тут в усій їхній повноті і для всіх цілей шляхом посилання в такому ж ступеню, як би кожне з них було в індивідуальному порядку та специфічним чином визначене включеним тут шляхом посилання. У випадку існування різних версій того або іншого посилання, діючою є найбільш рання версія на фактичну дату подачі даної заявки.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

&lt;110&gt; ПРОТЕНА БІОСАЄНСІЗ ЛІМІТЕД

ЕАРБОУР, Робін

ГЕЙМС ТІЕЛ, Кейт Дора

НІДЖАР, Тарлохан С.

&lt;120&gt; АНТИТІЛА, ЩО РОЗПІЗНАЮТЬ АЛЬФА-СИНУКЛЕЇН

&lt;130&gt; 057450/437818

&lt;140&gt; PCT/US2013/063945

&lt;141&gt; 2013-10-08

&lt;150&gt; 61/711,204

&lt;151&gt; 2013-10-08

&lt;150&gt; 61/719,281

&lt;151&gt; 2012-10-26

&lt;150&gt; 61/840,432

&lt;151&gt; 2013-06-27

&lt;150&gt; 61/872,366

&lt;151&gt; 2013-08-30

&lt;160&gt; 41

&lt;170&gt; FastSEQ для Windows, Версія 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 140

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
 1           5           10           15
Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
      20           25           30
Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
      35           40           45
Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
      50           55           60
Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
      65           70           75           80
Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
      85           90           95
Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
      100          105          110
Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
      115          120          125
Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
      130          135          140

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr  
 20 25 30  
 Gly Phe Val  
 35

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser  
 20 25

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Gly Gly Cys  
 1 5 10

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 402

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтезована

&lt;400&gt; 5

atggaaaggc actggatctt tctcttcctg ttatcagtaa ctggaggtgt ccactcccag 60  
 gtccagctgc agcagtcctg ggctgaactg gcaaaacctg ggacctcagt gcagatgtcc 120  
 tgcaaggctt ctggctacac ctttactaat tactggatga actggataaa agcgaggcct 180  
 ggacagggtc tggaatggat tggggctact aatcctaaca atggttatac tgactacaat 240  
 cagagggtca aggacaaggc catattaact gcagacaaat cctccaatac agcctacatg 300  
 cacctgagca gcctgacatc tgaagactct gcagtcctatt tctgtgcaag tggggggcac 360  
 ttggcttact gggggccagg gactgtgggc actgtctctg ca 402

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 134

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтезована

&lt;400&gt; 6

Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Gly Gly



```

      1           5           10           15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys
      20           25           30
Pro Gly Thr Ser Val Gln Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
      35           40           45
Thr Asn Tyr Trp Met Asn Trp Ile Lys Ala Arg Pro Gly Gln Gly Leu
      50           55           60
Glu Trp Ile Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn
      65           70           75           80
Gln Arg Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn
      85           90           95
Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
      100          105          110
Tyr Phe Cys Ala Ser Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      115          120          125
Val Val Thr Val Ser Ala
      130

```

<210> 7  
 <211> 393  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтезована

```

<400> 7
atgaagtgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgcttc cagcagtgat 60
gttgtgatga cccaaattcc actctacctg tctgtcagtc ctggagatca agcctccatc 120
tcttgcatat ctagtcagag ccttttccat agtaaaggaa acacctattt acattggtat 180
ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatcaaca gggtttccaa ccgattttct 240
gggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
ggagtgagg ctgaagatct gggagtttat ttctgttctc aaagtgcaca tgttccgtgg 360
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aga 393

```

<210> 8  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтезована

```

<400> 8
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
      1           5           10           15
Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Tyr Leu Ser Val
      20           25           30
Ser Pro Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
      35           40           45
Phe His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
      50           55           60
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Ile Asn Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
      65           70           75           80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
      85           90           95
Leu Lys Ile Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
      100          105          110
Ser Gln Ser Ala His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
      115          120          125

```

Glu Ile Arg  
130

<210> 9  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтезована

<400> 9  
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Thr  
1 5 10 15  
Ser Val Gln Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30  
Trp Met Asn Trp Ile Lys Ala Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe  
50 55 60  
Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Ala Ser Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Val Val Thr  
100 105 110  
Val Ser Ala  
115

<210> 10  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтезована

<400> 10  
Asn Tyr Trp Met Asn  
1 5

<210> 11  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтезована

<400> 11  
Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe Lys  
1 5 10 15  
Asp

<210> 12  
<211> 6

<212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтезована

<400> 12  
 Gly Gly His Leu Ala Tyr  
 1 5

<210> 13  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтезована

<400> 13  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Asn Tyr  
 20 25 30  
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Gly Asn Leu Asn Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 14  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтезована

<400> 14  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 15  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтезована

<400> 15  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30  
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe  
50 55 60  
Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110  
Val Ser Ser  
115

<210> 16  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтезована

<400> 16  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30  
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe  
50 55 60  
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Ala Ser Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110  
Val Ser Ser  
115

<210> 17  
<211> 115  
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтезована

<400> 17

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser
 1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
      20           25           30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35           40           45
Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe
 50           55           60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85           90           95
Ala Ser Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
      100          105          110
Val Ser Ser
      115

```

<210> 18

<211> 115

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтезована

<400> 18

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser
 1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
      20           25           30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35           40           45
Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe
 50           55           60
Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85           90           95
Ala Ser Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
      100          105          110
Val Ser Ser
      115

```

<210> 19

<211> 402

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтезована

<400> 19

atggaggttcg gcctgtcctg gctgttcctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtgccag 60

```

gtgcagctgg tgcagtcagg cgccgagctg aagaagcccc gtcctccgt gaagggtgtcc 120
tgcaaggcct ccggctacac cttcaccac tactggatga actgggtgag ccaggccccc 180
ggccagggcc tggagtggat cggcgccacc aaccccaaca acggctacac cgactacaac 240
cagcgcttca aggaccgggc caccctgacc gccgacaagt ccaccaaacac cgcctacatg 300
gagctgtcct ccctgcgctc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg cggcggccac 360
ctggcctact gggggccagg caccctggtg accgtgtcct cc 402

```

<210> 20

<211> 402

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтезована

<400> 20

```

atggagttcg gcctgtcctg gctgttctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtgccag 60
gtgcagctgg tgcagtcagg cgccgagctg aagaagcccc gtcctccgt gaagggtgtcc 120
tgcaaggcct ccggctacac cttcaccac tactggatga actgggtgag ccaggccccc 180
ggccagggcc tggagtggat cggcgccacc aaccccaaca acggctacac cgactacaac 240
cagcgcttca aggaccgggc caccctgacc gccgacaagt ccaccaaacac cgcctacatg 300
gagctgtcct ccctgcgctc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg cggcggccac 360
ctggcctact gggggccagg caccctggtg accgtgtcct cc 402

```

<210> 21

<211> 402

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтезована

<400> 21

```

atggagttcg gcctgtcctg gctgttctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtgccag 60
gtgcagctgg tgcagtcagg cgccgagctg aagaagcccc gtcctccgt gaagggtgtcc 120
tgcaaggcct ccggctacac cttcaccac tactggatga actgggtgag ccaggccccc 180
ggccagggcc tggagtggat cggcgccacc aaccccaaca acggctacac cgactacaac 240
cagcgcttca aggaccgggc caccctgacc gccgacaagt ccaccaaacac cgcctacatg 300
gagctgtcct ccctgcgctc cgaggacacc gccgtgtact tctgcgcctc cggcggccac 360
ctggcctact gggggccagg caccctggtg accgtgtcct cc 402

```

<210> 22

<211> 402

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтезована

<400> 22

```

atggagttcg gcctgtcctg gctgttctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtgccag 60
gtgcagctgg tgcagtcagg cgccgagctg aagaagcccc gtcctccgt gaagggtgtcc 120
tgcaaggcct ccggctacac cttcaccac tactggatga actgggtgag ccaggccccc 180
ggccagggcc tggagtggat cggcgccacc aaccccaaca acggctacac cgactacaac 240
cagcgcttca aggaccgggc caccctgacc gccgacaagt ccaccaaacac cgcctacatg 300
gagctgtcct ccctgcgctc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcctc cggcggccac 360
ctggcctact gggggccagg caccctggtg accgtgtcct cc 402

```

<210> 23

<211> 402

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтезована

&lt;400&gt; 23

```

atggagttcg gctgtctctg gctgttctctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtgccag 60
gtgcagctgg tgcagtcgg cgccgagctg aagaagcccg gctcctccgt gaagggtgcc 120
tgcaaggcct cgggctacac cttcaccaac tactggatga actgggtgcg ccaggccccc 180
ggccagggcc tggagtggat cggcgccacc aacccaaca acggctacac cgactacaac 240
cagcgcttca aggaccgctg gaccatcacc gccgacaagt ccaccaacac cgcctacatg 300
gagctgtcct cctgcgctc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag cggcggccac 360
ctggcctact ggggccaggg caccctggtg accgtgtcct cc 402

```

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтезована

&lt;400&gt; 24

```

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

```

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтезована

&lt;400&gt; 25

```

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1             5             10             15

```

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтезована

&lt;400&gt; 26

```

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

```



1

5

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтезована

&lt;400&gt; 27

Ser Gln Ser Ala His Val Pro Trp Thr

1

5

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтезована

&lt;400&gt; 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1

5

10

15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20

25

30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85

90

95

Leu Gln Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтезована

&lt;400&gt; 29

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser

20

25

30

Lys Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Leu Leu Ile Asn Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser



				85					90				95				
Ala	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
			100					105					110				

<210> 30  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтезована

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

<210> 31  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтезована

<400> 31  
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser  
 20 25 30  
 Lys Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Asn Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 85 90 95  
 Ala His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 32  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтезована

<400> 32

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

<210> 33

<211> 402

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтезована

<400> 33

atggacatgc	gcgtgccgc	ccagctgctg	ggcctgctga	tgctgtgggt	gtccggctcc	60
tccggcgacg	tggatgatgac	ccagtcctcc	ctgtccctgt	ccgtgtcccc	cggcgagccc	120
gcctccatct	cctgccgctc	ctcccagtc	ctgttccact	ccaagggcaa	cacctacctg	180
cactgggtacc	tgcagaagcc	cggccagtc	cccaagctgc	tgatcaaccg	cgtgtccaac	240
cgcttctccg	gcgtgccga	ccgcttctcc	ggctccggt	ccggcaccga	cttcacctg	300
aagatctccc	gcgtggaggc	cgaggacgtg	ggcgtgtact	tctgtctcca	gtccgcccac	360
gtgccctgga	ccttcggcgg	cggcaccaag	gtggagatca	ag		402

<210> 34

<211> 402

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтезована

<400> 34

atggacatgc	gcgtgccgc	ccagctgctg	ggcctgctga	tgctgtgggt	gtccggctcc	60
tccggcgaca	tctgatgac	ccagtcctcc	ctgtccctgt	ccgtgtcccc	cggcgagccc	120
gcctccatct	cctgccgctc	ctcccagtc	ctgttccact	ccaagggcaa	cacctacctg	180
cactgggtacc	tgcagaagcc	cggccagtc	cccaagctgc	tgatctaccg	cgtgtccaac	240
cgcttctccg	gcgtgccga	ccgcttctcc	ggctccggt	ccggcaccga	cttcacctg	300
aagatctccc	gcgtggaggc	cgaggacgtg	ggcgtgtact	actgtctcca	gtccgcccac	360
gtgccctgga	ccttcggcgg	cggcaccaag	gtggagatca	ag		402

<210> 35

<211> 402

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтезована

<400> 35  
 atggacatgc gcggtgcccgc ccagctgctg ggccctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60  
 tccggcgacg tggatgatgac ccagtccccc ctgtccctgt ccgtgtcccc cggcgagccc 120  
 gcctccatct cctgcccgtc ctcccagtc ctgttccact ccaagggcaa cacctacctg 180  
 cactgggtacc tgcagaagcc cggccagtc ccccagctgc tgatcaaccg cgtgtccaac 240  
 cgtttctccg gcggtgcccga ccgcttctcc ggctccgggt ccggcaccca cttaccctg 300  
 aagatctccc gcggtggagc cgaggacgtg ggctgtgtact tctgtcccca gtccgcccac 360  
 gtgccctgga ccttcggcgg cggcaccaag gtggagatca ag 402

<210> 36  
 <211> 402  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтезована

<400> 36  
 atggacatgc gcggtgcccgc ccagctgctg ggccctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60  
 tccggcgaca tggatgatgac ccagtccccc ctgtccctgt ccgtgtcccc cggcgagccc 120  
 gcctccatct cctgcccgtc ctcccagtc ctgttccact ccaagggcaa cacctacctg 180  
 cactgggtacc tgcagaagcc cggccagtc ccccagctgc tgatctaccg cgtgtccaac 240  
 cgtttctccg gcggtgcccga ccgcttctcc ggctccgggt ccggcaccca cttaccctg 300  
 aagatctccc gcggtggagc cgaggacgtg ggctgtgtact actgtcccca gtccgcccac 360  
 gtgccctgga ccttcggcgg cggcaccaag gtggagatca ag 402

<210> 37  
 <211> 991  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтезована

<400> 37  
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60  
 ggcacagcgg cctggggtg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtc 120  
 tggaaactcag ggcgctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180  
 ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240  
 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaagggt ggacaagaga gttgagccca 300  
 aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac 360  
 cgtcagtcctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggacccctg 420  
 aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag ttcaactggt 480  
 acgtggacgg cgtggagggt cataatgtca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca 540  
 gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg 600  
 agtacaaagt caaggctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 660  
 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacgct gccccatcc cgggaggaga 720  
 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg 780  
 cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgctgt 840  
 ggactccgac ggctccttct tctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca 900  
 gcaggggaac gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca 960  
 gaagagcctc tccctgtccc cgggtaaatg a 991

<210> 38  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтезована

&lt;400&gt; 38

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Val Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтезована

&lt;400&gt; 39

actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60  
 actgcctctg ttgtgtgcoct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120  
 aagggtggata acgcocctoca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180  
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240  
 cacaaggtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccggt cacaagagagc 300  
 ttcaacaggg gagagtgtta g 321



```

<210> 40
<211> 106
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтезована

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

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu
 1          5

```

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антитіло, що зв'язується з людським альфа-синуклеїном, яке містить зрілу варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить три CDR-ділянки легкого ланцюга відповідно до нумерації за Kabat SEQ ID NOs: 25-27, і зрілу варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить три CDR-ділянки важкого ланцюга відповідно до нумерації за Kabat SEQ ID NOs: 10-12.
- 10 2. Антитіло за п. 1, яке є мишачим антитілом, химерним антитілом, вініруваним антитілом, або гуманізованим антитілом.
3. Антитіло за п. 1, яке містить зрілу варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, щонайменше на 90 % ідентичну H4 (SEQ ID NO: 17), і зрілу варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, щонайменше на 90 % ідентичну L3 (SEQ ID NO: 31), де вказане антитіло специфічно зв'язується з людським альфа-синуклеїном.
- 15 4. Антитіло за п. 3, в якому положення H11, H27, H30, H48 та H73 займають, відповідно, L, Y, T, I та K, а положення L12 та L14 займає S.
5. Антитіло за п. 4, в якому положення H67, H69 і H94 займають, відповідно, A, L і S.
6. Антитіло за п. 4, в якому положення L2, L49 і L87 займають, відповідно, V, N і F.
- 20 7. Антитіло за п. 3, яке містить зрілу варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, щонайменше на 95 % ідентичну H4 (SEQ ID NO: 17), і зрілу варіабельну ділянку легкого ланцюга, щонайменше на 95 % ідентичну L3 (SEQ ID NO: 31).
8. Антитіло за п. 3, в якому зріла варіабельна ділянка важкого ланцюга є злитою з константною ділянкою важкого ланцюга, а зріла варіабельна ділянка легкого ланцюга є злитою з константною ділянкою легкого ланцюга.
- 25 9. Антитіло за п. 8, в якому зріла варіабельна ділянка важкого ланцюга є злитою з константною ділянкою важкого ланцюга, що має послідовність SEQ ID NO: 38, та/або зріла варіабельна ділянка легкого ланцюга є злитою з константною ділянкою легкого ланцюга, що має послідовність SEQ ID NO: 40.
- 30 10. Антитіло за будь-яким із пп. 3-9, в якому зріла варіабельна ділянка важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, позначену H4 (SEQ ID NO: 17), а зріла варіабельна ділянка легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, позначену L3 (SEQ ID NO: 31).

11. Антитіло за будь-яким із пп. 3-9, в якому зріла варіабельна ділянка важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, позначену H5 (SEQ ID NO: 18), а зріла варіабельна ділянка легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, позначену L3 (SEQ ID NO: 31).

12. Антитіло за будь-яким із пп. 1-7, в якому зазначеним антитілом є Fab-фрагмент.

5 13. Антитіло за будь-яким із пп. 1-9, в якому вказане антитіло має чистоту щонайменше 95 % (мас.).

14. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за будь-яким із попередніх пунктів та фармацевтично прийнятний носій.

10 15. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за будь-яким із пп. 1-13 та фармацевтично прийнятний носій.

16. Нуклеїнова кислота, що кодує важкий та/або легкий ланцюг (ланцюги) антитіла за будь-яким із пп. 1-13.

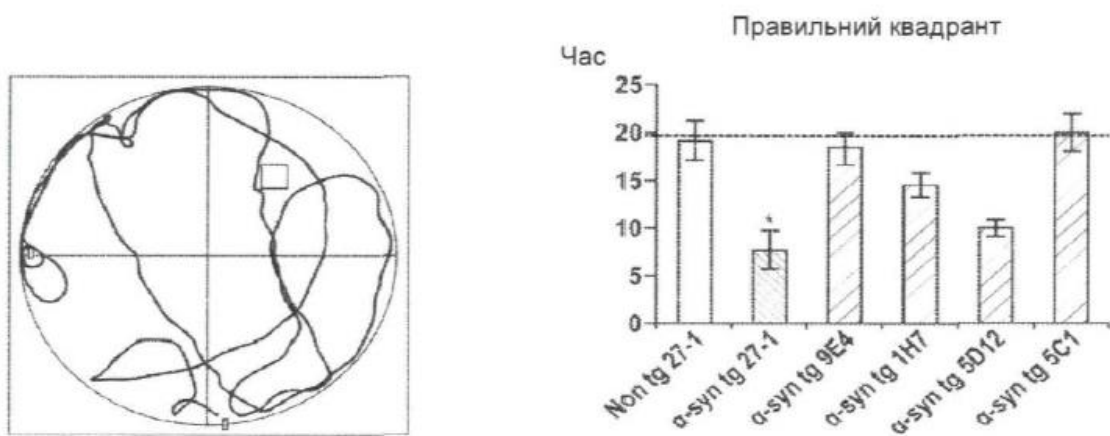
17. Застосування антитіла за будь-яким із пп. 1-13 для виготовлення медикаменту для лікування або профілактики хвороби з тільцями Леві.

	5C1-VH																			
m5C1VH за нумерацією Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	A	K	P	G	T	S	V	Q	M
m5C1VH за нумерацією Kabat	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	I	K	A	R
m5C1VH за нумерацією Kabat	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59
	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>
m5C1VH за нумерацією Kabat	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	K	A	I	L	T	A	D	K	S	S	N	T	A	Y
m5C1VH за нумерацією Kabat	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
	M	H	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	A	S	<u>G</u>	<u>Q</u>
m5C1VH за нумерацією Kabat	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114		
	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	-	-	<u>Y</u>	W	G	Q	G	T	V	V	T	V	S	A	-		

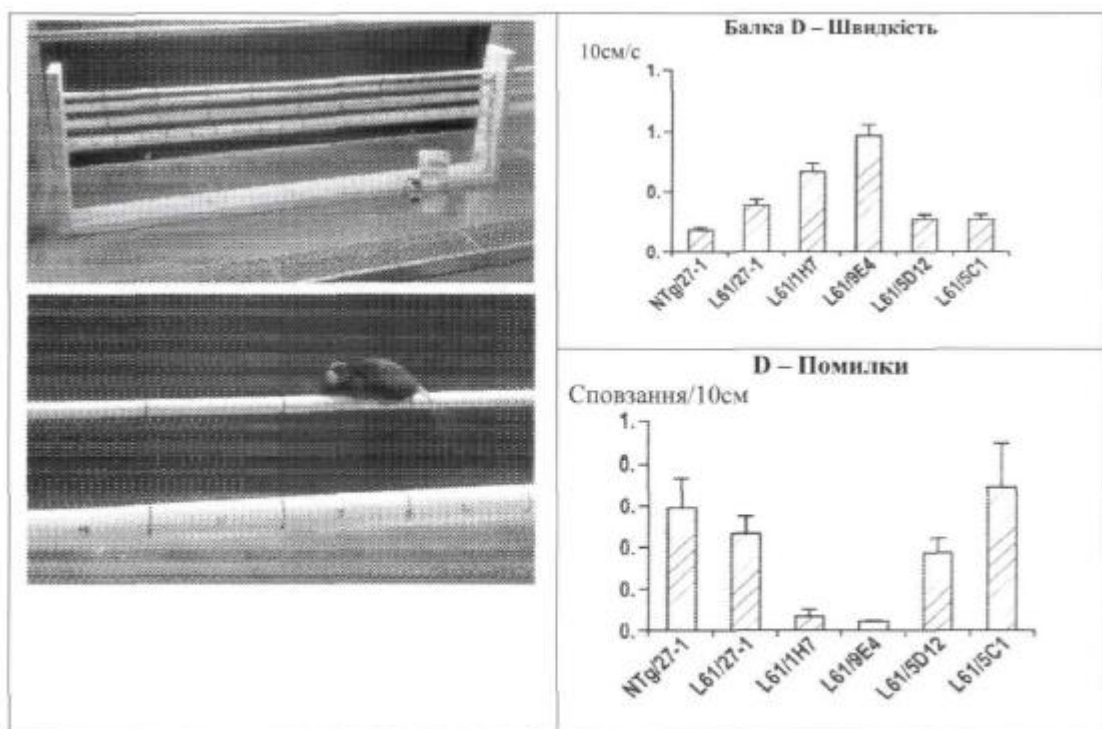
ФІГ. 1

	5C1-VL																			
mSCVL за нумерацією Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	D	V	V	M	T	Q	I	P	L	Y	L	S	V	S	P	G	D	Q	A	S
mSCVL за нумерацією Kabat	21	22	23	24	25	26	27	27A	27B	27C	27D	27E	27F	28	29	30	31	32	33	34
	I	S	C	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	-	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>N</u>
mSCVL за нумерацією Kabat	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	N	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>R</u>
mSCVL за нумерацією Kabat	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
	<u>F</u>	<u>S</u>	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K
mSCVL за нумерацією Kabat	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
	I	S	G	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	F	C	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>V</u>
mSCVL за нумерацією Kabat	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107							
	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	K	L	E	I	R							

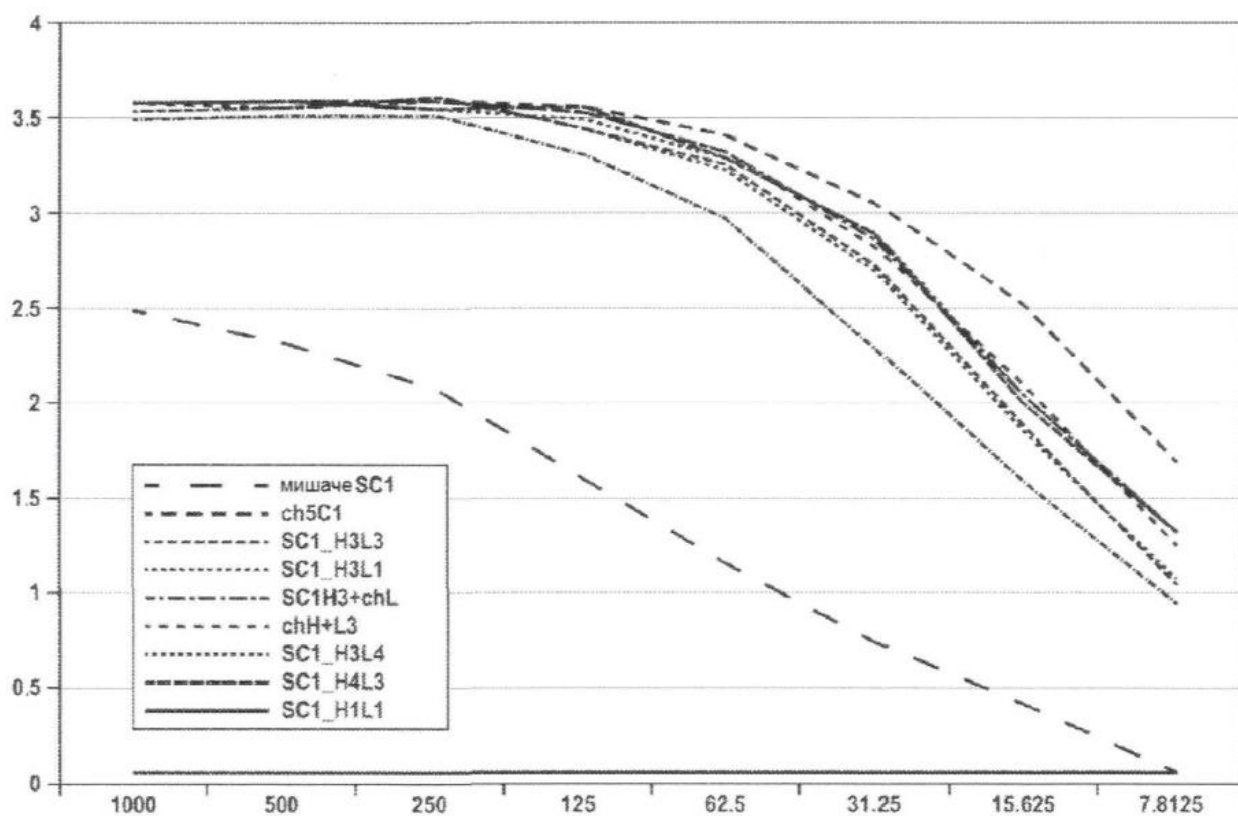
ФІГ. 2



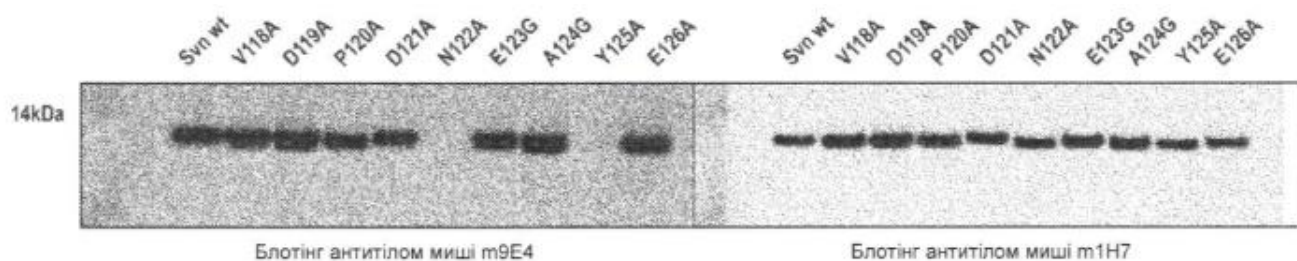
ФІГ. 3



ФІГ. 4



ФІГ. 5

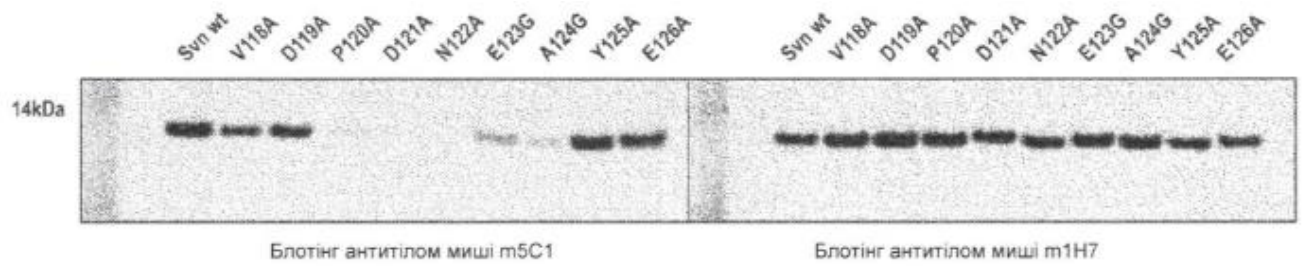


9E4 Епітоп:

V	D	P	D	N	E	A	Y	E
118	119	120	121	122	123	124	125	126

ФІГ. 6

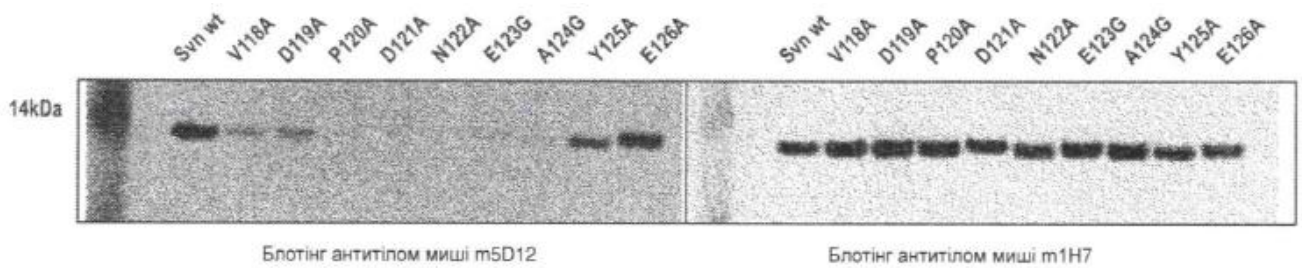




5C1 Епітоп:

V	D	<b>P</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	E	<b>A</b>	Y	E
118	119	120	121	122	123	124	125	126

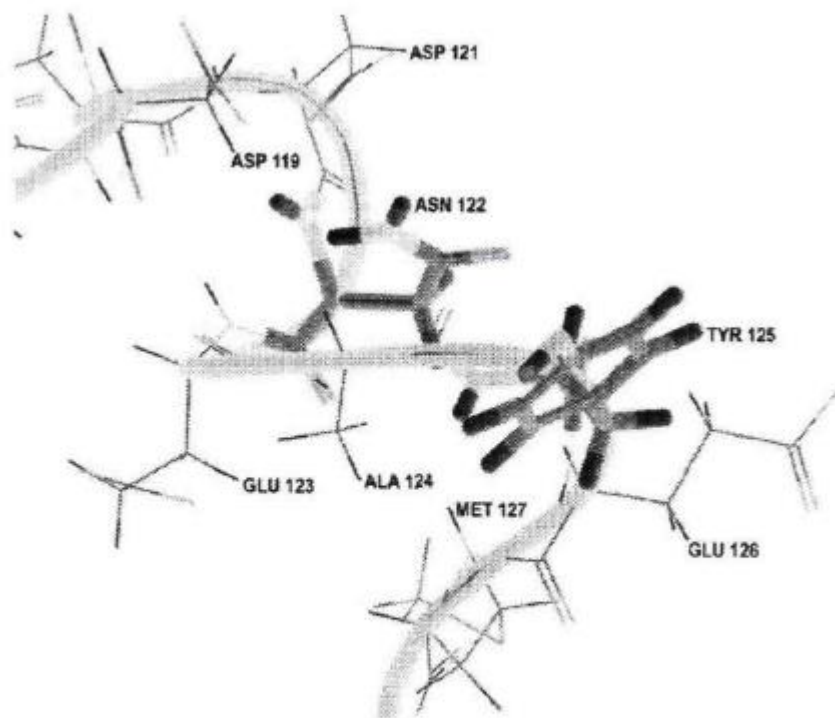
ФІГ. 7



5D12 Епітоп:

V	D	<b>P</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	E	<b>A</b>	Y	E
118	119	120	121	122	123	124	125	126

ФІГ. 8



ФІГ. 9

---

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601