

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202193215** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.03.10**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.05.22**

(51) Int. Cl. *A61P 25/00* (2006.01)  
*A61P 25/02* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01)  
*C07K 16/18* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

---

**(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ К TDP-43 И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **19176314.3; 19195916.2; 19207839.2;  
20161060.7**

(32) **2019.05.23; 2019.09.06; 2019.11.07;  
2020.03.04**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2020/064335**

(87) **WO 2020/234473 2020.11.26**

(71) Заявитель:  
**АС ИММЬОН СА (CH)**

(72) Изобретатель:  
**Середенина Тамара, Цим Тамар  
Магдалена, Афроз Тарик (CH)**

(74) Представитель:  
**Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,  
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Гизатуллина Е.М., Костюшенкова  
М.Ю., Строкова О.В., Прищепный  
С.В. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к области ДНК-связывающего белка транскриптивного ответа с молекулярной массой 43 кДа (TARDB или также TDP-43). Настоящее изобретение относится к молекулам, специфически связывающим TDP-43, в частности к антителам к TDP-43, или их антигенсвязывающему фрагменту, или их производному, и вариантам их применения. Настоящее изобретение относится к средствам и способам диагностики, предупреждения, облегчения и/или лечения заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с агрегатами TDP-43, в том числе без ограничения лобно-височной деменции (FTD), бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), хронической травматической энцефалопатии (CTE) и связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE).

---

**A1**

**202193215**

**202193215**

**A1**

# **СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ К TDP-43 И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

## **ОПИСАНИЕ**

### **Область техники**

Настоящее изобретение относится к области ДНК-связывающего белка транскриптивного ответа с молекулярной массой 43 кДа (TARDBP или также TDP-43). Настоящее изобретение относится к молекулам, специфически связывающим TDP-43, в частности к антителам к TDP-43, или их антигенсвязывающему фрагменту, или их производному, и вариантам их применения. Настоящее изобретение относится к средствам и способам диагностики, предупреждения, облегчения и/или лечения заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43, в том числе без ограничения лобно-височной деменции (FTD), бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ) и связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE).

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Возрастные расстройства головного мозга, характеризующиеся патологической агрегацией белков в центральной нервной системе (ЦНС) (протеинопатии) и периферических органах, представляют собой одну из ведущих причин инвалидности и смертности в мире. Наиболее хорошо охарактеризованным белком, который образует агрегаты, является бета-амилоид при болезни Альцгеймера и связанных с ней расстройствах. К другим связанным с заболеванием, склонным к агрегации белкам, приводящим к нейродегенерации, относятся без ограничения тау-белок, альфа-синуклеин (aSyn, a-syn), хантинтин, белок fused in sarcoma (FUS), белки с дипептидными повторами (DPR), получаемые при нетрадиционной трансляции участка с повторами C9orf72, супероксиддисмутаза 1 (SOD1) и TDP-43. Заболевания, связанные с агрегатами TDP-43, обычно причисляют к связанным с TDP-43 протеинопатиям, в том числе без ограничения ALS и FTD.

### **I. Введение в TDP-43**

ДНК-связывающий белок транскриптивного ответа (TAR) массой 43 кДа (TDP-43) представляет собой белок из 414 аминокислот, кодируемый геном TARDBP на хромосоме

1p36.2 (ALS10). TARDBP состоит из шести экзонов (экзон 1 является некодирующим; экзоны 2-6 являются кодирующими белок). TDP-43 принадлежит к семейству РНК-связывающих белков гетерогенных рибонуклеопротеинов (hnRNP) (Wang et al., *Trends in Molecular Medicine* Vol.14 No.11, 2008, 479-485; Lagier-Tourenne et al., *Human Molecular Genetics*, 2010, Vol. 19, Review Issue 1 R46-R64). TDP-43 содержит пять функциональных доменов (фиг. 1 в Warrach et al., *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (2010) 1606–1609): два мотива распознавания РНК (RRM1 и RRM2), которые имеют два участка высококонсервативных гексамерных рибонуклеопротеина 2 (RNP2) и участок октамерного рибонуклеопротеина 1 (RNP1), сигнал ядерного экспорта (NES) и сигнал ядерной локализации (NLS), позволяющие ему перемещаться между ядром и цитоплазмой, транспортируя связанную мРНК, и богатый глицином домен на С-конце, который опосредует межбелковые взаимодействия. TDP-43 участвует во многих аспектах процессинга РНК, в том числе транскрипции, сплайсинге, транспорте и стабилизации (Buratti and Baralle, *FEBS Journal* 277 (2010) 2268–2281). Он является высококонсервативным, убиквитарно экспрессируемым белком со строго регулируемым уровнем экспрессии, который непрерывно перемещается между ядром и цитоплазмой, но локализован преимущественно в ядре. В 2006 году TDP-43 был выявлен как белок, который накапливается в подавляющем большинстве случаев лобно-височной лобарной дегенерации (FTLD) с тау-отрицательными, убиквитин-положительными включениями (в таком случае называемой FTLD-TDP) и в большинстве случаев боковой амиотрофической склероз (ALS) (Arai et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351 (2006) 602–611; Neumann et al., *Science* 314, (2006), 130-133).

Тридцать восемь отрицательно-доминантных мутаций в TDP-43 были выявлены у спорадических и семейных пациентов с ALS, а также у пациентов с наследственной FTD, в основном локализованной в богатом глицином домене (фиг. 1 в Lagier-Tourenne and Cleveland, *Cell* 136, 2009, 1001-1004). TDP-43 по своей природе склонен к агрегации, как было выявлено с помощью анализов седиментации, и эта склонность дополнительно увеличивается из-за некоторых связанных с ALS мутаций TARDBP (Ticozzi et al., *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 2010, 9(3), 285-296.), связывая агрегацию TDP-43 с клиническим проявлением заболевания.

## **II. TDP-43 при нейродегенерации**

Агрегаты TDP-43 были выявлены в постоянно растущем перечне нейродегенеративных состояний (Lagier-Tourenne et al., *Human Molecular Genetics*, 2010, Vol. 19, Review Issue 1 R46-R64), в том числе без ограничения при следующих состояниях:

лобно-височной деменции (FTD, такой как спорадическая или семейная с или без заболевания двигательных нейронов (MND), с мутацией програнулина (GRN), с мутациями C9orf72, с мутацией TARDBP, с мутацией валозин-содержащего белка (VCP), связанная с хромосомой 9p, кортикобазальная дегенерация, лобно-височная лобарная дегенерация (FTLD) с убиквитин-положительными включениями TDP-43 (FTLD-TDP), болезнь аргирофильного зерна, болезнь Пика, семантический вариант первичной прогрессирующей афазии (svPPA), поведенческий вариант FTD (bvFTD), не затрагивающий беглость речи вариант прогрессирующей афазии (nfvPPA) и др.), боковом амиотрофическом склерозе (ALS, таком как спорадический ALS, с мутацией TARDBP, с мутацией ангиогенина (ANG)), болезни Александра (AxD), связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE), хронической травматической энцефалопатии (CTE), синдроме Перри, болезни Альцгеймера (AD, в том числе спорадических и семейных формах AD), синдроме Дауна, семейной британской деменции, полиглутаминовых заболеваниях (болезни Хантингтона и спинально-церебеллярной атаксии 3-го типа (SCA3; также известной как болезнь Мачадо-Джозефа)), деменции с гиппокампальным склерозом и миопатиях (спорадическом миозите с тельцами включения, миопатии с тельцами включения с мутацией валозин-содержащего белка (VCP; также называемая болезнью Педжета костей и лобно-височной деменцией), окулофарингеальной мышечной дистрофии с окаймленными вакуолями, миофибрилярных миопатиях с мутациями в гене миотилина (MYOT) или с мутациями в гене, кодирующем десмин (DES)), травме головного мозга (TBI), деменции с тельцами Леви (DLB) или болезни Паркинсона (PD).

Агрегированный TDP-43, полученный из головного мозга пациента, характеризуется рядом аномальных модификаций, в том числе гиперфосфорилированием, убиквитинированием, ацетилированием и C-концевыми фрагментами в результате протеолитического расщепления (Arai et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351 (2006) 602–611; Neumann et al., *Science* 314, (2006), 130-133; Neumann et al., *Acta Neuropathol.* (2009) 117: 137–149; Hasegawa et al., (2008) *Annals of Neurology* Vol 64 No 1, 60–70; Cohen et al., *Nat Commun.* 6: 5845, 2015). Другим характерным признаком патологии с TDP-43 является перераспределение TDP-43 из ядра в цитоплазму и его накопление. Отличительными признаками FTLD-TDP являются нейрональные и глиальные цитоплазматические включения (NCI и GCI соответственно) и дистрофические нейриты (DN), которые иммунореактивны в отношении TDP-43, а также убиквитина и p62, но отрицательны в отношении других белков, связанных с нейродегенеративными заболеваниями. Различия в морфологии включений и их распределении в тканях связаны

со специфическими мутациями и/или клиническими проявлениями. На данный момент с помощью гистологической классификации описано четыре типа патологий, связанных с TDP-43 (Mackenzie and Neumann, *J. Neurochem.* (2016) 138 (Suppl. 1), 54-70). Случаи FTLD-TDP типа А характеризуются широко распространенным краткосрочным дистрофическим невритом (DN) и компактным овальным или серповидным NCI, преимущественно во II слое неокортекса (фиг. 2f в Mackenzie et al., 2016 *J. Neurochem.* 138 (Suppl. 1), 54–70). Случаи с данной патологией обычно клинически проявляются либо в виде поведенческого варианта лобно-височной деменции (bvFTD), либо не затрагивающих беглость речи/аграмматических вариантов первичной прогрессирующей афазии (nfvPPA) и связаны с мутациями програнулина (GRN). В случаях типа В наблюдается умеренное количество компактных или гранулярных NCI как в поверхностных, так и в глубоких кортикальных слоях с относительно небольшим количеством DN и NII (нейрональные внутриядерные включения; фиг. 2g в Mackenzie et al., 2016 *J. Neurochem.* 138 (Suppl. 1), 54–70). Было обнаружено, что в большинстве случаев с одновременным появлением симптомов FTD и ALS присутствует патология FTLD-TDP типа В. При случаях типа С имеют место множество длинных извилистых невритов, преимущественно в поверхностных кортикальных пластинках, с небольшим количеством или отсутствием NCI (фиг. 2j в Mackenzie et al., 2016 *J. Neurochem.* 138 (Suppl. 1), 54–70). Данная патология особенно часто встречается в случаях с семантическим вариантом первичной прогрессирующей афазии (svPPA). FTLD-TDP типа D проявляется с обильными внутриядерными включениями лентиформных нейронов (NII) и короткими DN в неокортексе с редко встречающимися NCI (фиг. 2k в Mackenzie et al., 2016 *J. Neurochem.* 138 (Suppl. 1), 54–70). Тип Е характеризуется гранулофиламентными включениями у нейронов (GFNI) и очень мелкими точечными агрегатами нейропилей, поражающими все слои неокортекса в дополнение к криволинейным олигодендроглиальным включениям в белом веществе (Edward B. Lee et al., *Acta Neuropathol.* 2017 July; 134(1): 65–78.). Данный паттерн патологии встречается только в случаях с VCP в сочетании с миозитом с тельцами включения.

### III. TDP-43 при FTD

Лобно-височная деменция (FTD) является клиническим термином, который охватывает широкий спектр заболеваний, основанных на дегенерации лобных и височных долей - патологическом признаке, называемом лобно-височной лобарной дегенерацией (FTD). FTD является второй по распространенности причиной ранних форм дегенеративной деменции в возрастной группе до 65 лет (Le Ber, *Revue Neurologique* 169

(2013) 811-819). FTD представлена несколькими синдромами, в том числе bvFTD, которая характеризуется изменениями личности и поведения; семантической деменцией (SD) и прогрессирующей, не затрагивающей беглость речи афазией (PNFA), характеризующейся изменениями речевой функции; кортикобазальным синдромом (CBS), синдромом прогрессирующего надъядерного паралича и заболеванием двигательных нейронов (FTD-MND), характеризующимся нарушением двигательной функции. Клиническая диагностика данных синдромов сложна, и окончательный вывод может быть сделан только с помощью патогистологического анализа после смерти с целью обнаружения агрегированного белка и определения пораженных участков головного мозга. Что касается патологических белковых включений, приблизительно в 45% случаев наблюдается патологическое накопление неправильно свернутого тау-белка, в 45% случаев наблюдается патологическая форма TDP-43, и в меньшей подгруппе присутствуют агрегаты FUS и других белков.

#### **IV. TDP-43 при ALS**

Боковой амиотрофический склероз (ALS) представляет собой нейродегенеративное заболевание, характеризующееся преждевременной утратой верхних и нижних двигательных нейронов. Прогрессирование ALS характеризуется фатальным параличом и дыхательной недостаточностью, при этом течение болезни от момента постановки диагноза до смерти составляет от 1 до 5 лет. В большинстве случаев спорадического ALS невропатология характеризуется аномальным накоплением в цитоплазме TDP-43 в нейронах и глии первичной двигательной зоны коры головного мозга, двигательных ядер ствола головного мозга, спинного мозга и связанных участков белого вещества. При ALS с деменцией происходит накопление TDP-43 в экстрамоторных участках неокортекса и гиппокампе. Роль фосфорилирования TDP-43 у пациентов с ALS была исследована с помощью антител, которые специфически связываются с фосфорилированным TDP-43 в ядерных и цитоплазматических включениях с аминокислотами S379, S403, S404, S409, S410 в качестве основных сайтов фосфорилирования TDP-43 (Hasegawa et al., *Ann Neurol* 2008; 64: 60–70; Neumann et al., *Acta Neuropathol* (2009) 117: 137-149).

#### **V. TDP-43 при AD и других заболеваниях**

Патология с участием TDP-43 встречается в до 57% экземплярах головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера (Josephs KA et al., *Acta Neuropathol.* 2014; 127(6): 811-824; Josephs KA et al., *Acta Neuropathol.* 2014; 127(3): 441–450; McAleese et al., *Brain Pathol.* 2017 Jul; 27(4): 472-479). Агрегация TDP-43 связана с возрастом пациента и коррелирует

со снижением когнитивных функций, утратой памяти и атрофией медиальных отделов височной доли при AD. Судя по всему, при AD TDP-43 представляет собой вторичную или независимую патологию, которая имеет общее распределение в головном мозге с патологиями с участием бета- и тау-амилоида в медиальных отделах височной доли. Патологический TDP-43 следует стереотипному паттерну прогрессирующего отложения, который был описан с помощью так называемой схемы стадийности TDP-43 при AD (TAD): первые отложения TDP-43 в миндалинах (стадия I), затем в гиппокампе, лимбической, височной доле и, наконец, фронтальной части полосатого тела (стадия V) (Josephs KA et al., Acta Neuropathol. 2014;127(6): 811-824; Josephs KA et al., Acta Neuropathol. 2014; 127(3): 441–450).

## VI. Распределение TDP-43

Хотя начало и первые симптомы ALS и FTD значительно различаются среди пациентов, общим признаком прогрессирования заболевания является распространение патологии из начальной очаговой области на большинство нейронов. Продолжающееся ухудшение симптомов можно объяснить прогрессирующим распространением патологии TDP-43. Патология TDP-43 в головном мозге пациента с ALS, судя по всему, распространяется в виде четырехстадийного процесса, и считается, что распространение происходит транссинаптически через кортикофугальные выступы аксонов с помощью anterograde axonal transport (Brettschneider et al., Ann Neurol. 2013 July; 74(1): 20–38.). Недавние экспериментальные данные подтверждают гипотезу о распространении белка в нейрональной ткани в случае бета-амилоида, тау-белка, альфа-синуклеина и TDP-43 по прионоподобному механизму (Hasegawa et al., 2017), при этом исходные точки и топографические паттерны распространения у этих четырех белков различаются (Brettschneider J et al., Nature Rev. Neuroscience, 2015, 109). Считается, что в основе общего механизма объединения заболеваний лежит межклеточное распространение патологических белковых агрегатов. Данный механизм заключается в высвобождении агрегатов из пораженной клетки, поглощения наивной клеткой и посева патологической конформации белка с помощью шаблонного конформационного изменения эндогенных белков.

Межклеточное распространение TDP-43 было изучено на молекулярном уровне в нескольких *in vitro* моделях, в которых нерастворимые препараты TDP-43 из головного мозга пациента были способны индуцировать образование внутриклеточных агрегатов в рецепторных клетках (Nonaka et al., Cell Reports 4 (2013), 124–134; Feiler et al., 2015; Porta et al., Nat. Comm., 2018). Кроме того, было замечено, что внутриклеточные агрегаты TDP-

43 высвобождаются в ассоциации с экзосомами до распространения в следующую клетку (Nonaka et al., Cell Reports 4 (2013), 124–134)). Аналогично, экспрессия TDP-43, трансдуцированного аденовирусом, приводит к образованию цитоплазматических агрегатов, которые фосфорилируются, убиквитинируются и, что более важно, выполняют роль затравок, инициирующих распространение среди клеток (Ishii et al., PLoS ONE 12 (6): e0179375, 2017). Патологический TDP-43 пациента может привести к широкому отложению эндогенного TDP-43 после интрацеребральной инокуляции трансгенным мышам и мышам дикого типа (Porta et al., Nat. Comm., 2018).

## **VII. Предупреждение развития и лечение протеинопатий с участием TDP-43**

Агрегация TDP-43 и распространение патологии являются основными отличительными признаками ALS и FTD – смертельных заболеваний, от которых в настоящее время нет доступного лечения. Мутации в TDP-43 связаны с семейными случаями ALS и FTD, обеспечивая причинно-следственную связь между неправильной укладкой TDP-43 и прогрессированием заболевания.

## **VIII. Диагностика протеинопатий с участием TDP-43**

Диагностика FTD на основании клинических проявлений является недостаточной, поскольку клиническая картина может перекрываться с другими заболеваниями, в частности, на более ранних стадиях.

Ряд подходов направлен на разработку биохимических биомаркеров для дифференцировки различных типов патологии FTD. Разработка антител к различным конформациям TDP-43 может позволить создать более чувствительные и специфические диагностические инструменты. Параллельно с биохимическими биомаркерами разработка визуализирующих биомаркеров может сделать возможной раннюю и специфическую детекцию патологии при протеинопатиях с участием TDP-43. Возможность визуализации отложения TDP-43 в головном мозге может быть существенным достижением для диагностики и разработки лекарственных средств от протеинопатий с участием TDP-43. Такую детекцию может сделать возможной применение проникаемых для клеток фрагментов антител.

Наиболее ранним событием нейродегенеративных заболеваний, обусловленных неправильной укладкой различных белков, является приобретение альтернативной конформации, которая делает этот белок токсичным. Более того, данная неправильно свернутая конформация может самораспространяться путем рекрутирования эндогенного



нормального белка в неправильно свернутую конформацию в качестве механистической основы для наблюдаемого распространения по пораженной ткани.

Для разработки антител против различных конформационных состояний заданного белка были разработаны супрамолекулярные антигенные конструкции, у которых конформация представленного антигена контролировали до выработки конформационно-специфических антител к данной мишени в специфическом конформационном состоянии (WO2012/055933 и WO2012/020124). Конформационно-специфические антитела обладают множеством преимуществ, поскольку они могут различать ассоциированную с заболеванием и функциональную, эндогенную конформацию данных белков. Данный подход предлагает много преимуществ при терапевтическом применении, поскольку такие антитела с меньшей вероятностью будут адсорбированы при нормальной конформации белков, при этом они будут целенаправленно воздействовать на их связанную с заболеванием неправильно свернутую изоформу. Подобно этому при диагностическом применении такие антитела распознают только связанное с заболеванием структурное состояние белка, которое имеет первостепенное значение для разработки чувствительных и специфических диагностических инструментов.

Применение биомаркера на основе TDP-43 при протеинопатиях с участием TDP-43 еще предстоит освоить. Такая оценка была затруднена отчасти из-за отсутствия высокоаффинных антител, которые можно использовать в подходящем иммуноанализе для количественной оценки патологического TDP-43 в биологических жидкостях (Feneberg et al., *Molecular Neurobiology*, 2018).

Следовательно, существует явная потребность в биомаркерах, способных детектировать неправильно свернутый агрегированный TDP-43 и неагрегированный физиологический TDP-43, в частности в образце человека, для диагностики различных типов протеинопатий TDP-43 и/или для отслеживания эффективности терапевтических средств, применяемых для лечения заболеваний, расстройств и нарушений, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43.

Протеинопатии TDP-43 определяются как ряд нейродегенеративных расстройств, характеризующихся наличием патологического TDP-43.

## **IX. Предшествующий уровень техники**

В патентной заявке WO 2008/151055 раскрыты способы и материалы для применения уровней полипептидов TDP-43 и/или продуктов расщепления полипептида TDP-43 (например, продуктов расщепления полипептида TDP-43 с массой 25 кДа и 35

кДа) в биологической жидкости с целью определения того, имеет ли млекопитающее нейродегенеративное заболевание или нет.

В патентной заявке WO 2013/061163 раскрыты специфические связывающие TDP-43 молекулы, в том числе полипептиды, такие как человеческие антитела, а также их фрагменты, производные и варианты.

### **Сущность настоящего изобретения**

В свете вышеизложенного существует потребность в связывающих молекулах к TDP-43, которые связывают неправильно свернутый агрегированный TDP-43 и неагрегированный физиологический TDP-43, в частности человеческий TDP-43. Более того, актуальной задачей является и разработка чувствительных и специфических биомаркеров, позволяющих дифференцировать различные типы патологии в спектре FTD.

Техническая задача решается с помощью представленными в настоящем документе вариантами осуществления.

Соответственно, настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, в частности к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически распознают неправильно свернутый агрегированный TDP-43 и неагрегированный физиологический TDP-43. В объеме настоящего изобретения к неправильно свернутому TDP-43 относятся неправильно свернутый мономерный и/или неправильно свернутый олигомерный и/или неправильно свернутый агрегированный, и/или посттрансляционно модифицированный, и/или неправильно свернутый укороченный TDP-43. К посттрансляционно модифицированному TDP-43 относится фосфорилированный, убиквитилированный, ацетилованный, сумоилированный и/или метилированный TDP-43. К физиологическому TDP-43 относится растворимый ядерный TDP-43. В настоящем документе продемонстрировано, что связывающие молекулы по настоящему изобретению способны связывать патологический TDP-43, в том числе агрегаты TDP-43 и фосфорилированный TDP-43 (см. пример 13). Таким образом, настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, в частности к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически распознают неправильно свернутый агрегированный TDP-43 и неагрегированный физиологический TDP-43. Такие связывающие молекулы в настоящем документе называются связывающими «пан-TDP-43» молекулами, в частности, антителами к пан-TDP-43. Как поясняется в настоящем документе, связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению могут связывать неправильно свернутый агрегированный TDP-43 и неагрегированный физиологический TDP-43 в равной степени или предпочтительно с одним относительно другого, при этом

специфически связываясь с обеими категориями TDP-43. Настоящее изобретение также относится к связывающим молекулам, в частности антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, для предупреждения развития, облегчения, лечения и/или диагностики заболеваний, расстройств и нарушений, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43. Настоящее изобретение также относится к связывающим молекулам, в частности к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, для детекции и/или понимания (т. е. выявления) конкретного типа патологии, вызывающей нейродегенерацию. Предусмотрены варианты применения в качестве диагностических биомаркеров, делающих возможным более эффективный и точный отбор субъектов для продолжительного отслеживания в клинических исследованиях, что поддержит разработку новых терапевтических средств для лечения протеинопатий TDP-43.

Настоящее изобретение также относится к молекулам, связывающие TDP-43, в частности к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, в качестве лекарственного препарата (терапевтического средства).

Без желания ограничиваться теорией настоящее изобретение было разработано на основе предположения, что модифицированные конформационно-специфические антигенные пептиды и фрагменты пептидов, полученные из белка TDP-43 или цельного белка TDP-43, и антитела, получаемые или полученные с помощью указанных пептидов или фрагментов или цельного белка TDP-43, блокируют межклеточное распространение TDP-43, и/или разрушают агрегаты TDP-43, и/или блокируют заправку TDP-43, и/или ингибируют агрегацию белка TDP-43 или его фрагментов. Связывающие молекулы по настоящему изобретению, в частности полипептиды, более конкретно антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, связываются с неправильно свернутым агрегированным TDP-43, в частности с цитоплазматическим и внеклеточным неправильно свернутым TDP-43. Связывающие молекулы по настоящему изобретению, в частности полипептиды, более конкретно антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, связываются с полноразмерным TDP-43 и/или укороченным TDP-43. В соответствии с одним вариантом осуществления, связывающие молекулы по настоящему изобретению, в частности полипептиды, более конкретно антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, специфически связываются с цитоплазматическим неправильно свернутым TDP-43.

Неправильно свернутый агрегированный или связанный с патологией TDP-43 состоит из белков TDP-43, которые утрачивают свою нормальную укладку (т. е. являются неправильно свернутыми) и локализацию. Неправильно свернутый агрегированный TDP-

43 можно обнаружить в предвключениях и в нейрональных и глиальных цитоплазматических включениях (NCI и GCI соответственно), внутриядерных нейронных включениях (NI) и дистрофических нейритах (DN), которые иммунореактивны по отношению к TDP-43.

Неагрегированный физиологический TDP-43 представляет собой физиологически функциональный белок TDP-43, преимущественно локализованный в ядре и перемещающийся в цитоплазму, при этом он находится в состоянии, способном проявлять свою требуемую функцию в клеточной среде *in vivo*.

Связывающие молекулы по настоящему изобретению, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, неожиданно обладают по меньшей мере одной, предпочтительно двумя, более предпочтительно тремя, еще более предпочтительно всеми четырьмя из следующих характеристик:

- блокировка межклеточного распространения TDP-43;
- разрушение агрегатов TDP-43;
- ингибирование агрегации белка TDP-43 или его фрагментов;
- блокировка затравки TDP-43.

Независимо от комбинации одной, двух, трех или четырех перечисленных выше характеристик связывающие молекулы, предпочтительно антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, по настоящему изобретению могут ослаблять/ингибировать/уменьшать образование патологии TDP-43 в *in vivo* модели протеинопатий TDP-43 и, что более важно, у пациентов с патологией с участием TDP-43.

Связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут рекрутировать и/или активировать микроглию. Более конкретно, в настоящем документе продемонстрировано (см. пример 10 и фиг. 5), что связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению могут влиять на морфологию микроглии в том, что касается размера клеток и состояния активации. Это может способствовать снижению патологии с участием TDP-43, наблюдаемому при использовании связывающих TDP-43 молекул по настоящему изобретению.

В соответствии с настоящим изобретением, связывающие молекулы, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, специфически распознают TDP-43. К связывающим молекулам по настоящему изобретению относятся полипептиды и/или антитела и/или их антигенсвязывающие фрагменты, специфичные к/в отношении белка TDP-43. «Специфически распознавать TDP-43» означает, что связывающие молекулы по настоящему изобретению специфично, в целом и совместно связываются с TDP-43, в

частности с некоторыми эпитопами в TDP-43, в частности с эпитопом, экспонированном/доступным в одной или более патологических конформациях белка TDP-43, с большей аффинностью, чем к другим эпитопам. Связывающие молекулы по настоящему изобретению, в частности полипептиды, более конкретно антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с TDP-43, специфически распознают неправильно свернутый агрегированный TDP-43 и неагрегированный физиологический TDP-43. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, полноразмерный человеческий TDP-43 содержит, предпочтительно имеет, последовательность под SEQ ID NO: 1. В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, связывающие молекулы, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, специфически связываются с определенными участками связывания в пределах полноразмерного и/или укороченного TDP-43, причем участок связывания предпочтительно находится в пределах аминокислот 181-195, 199-213, 307-321, 352-366, 389-411, 397-411 или 140-200, более предпочтительно участки связывания находятся в пределах аминокислот 183-188, 203-213, 204-208, 204-211, 205-210, 316-323, 358-361, 400-405, 400-406 или 400-412 полноразмерного человеческого TDP-43, имеющего последовательность под SEQ ID NO: 1. Соответственно, связывающие молекулы, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предпочтительно специфически связываются с пептидами, содержащими связывающие области, предпочтительно состоящими из них, состоящими из аминокислот 181-195, 199-213, 307-321, 352-366, 389-411, 397-411 или 140-200 полноразмерного человеческого TDP-43, имеющего последовательность под SEQ ID NO: 1. В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, связывающие молекулы, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предпочтительно специфически связываются с пептидами, содержащими связывающие области, предпочтительно состоящими из них, состоящими из аминокислот 183-188, 203-213, 204-208, 204-211, 205-210, 316-323, 358-361, 400-405, 400-406 или 400-412 человеческого TDP-43 (SEQ ID NO: 1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающие TDP-43 молекулы, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, связываются в С-концевом участке TDP-43. Это может давать преимущество, например, потому что С-концевые фрагменты TDP-43 встречаются в нерастворимой фракции и, следовательно, могут быть релевантными с точки зрения патологии. Более конкретно, связывающие TDP-43 молекулы, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут связываться с эпитопом в пределах аминокислотных остатков 400-405, 400-406 или 400-

412 человеческого TDP-43 (SEQ ID NO: 1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, антитело представляет собой моноклональное антитело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело представляет собой мышинное, муринизированное, человеческое, гуманизированное или химерное антитело. Будет понятно, что эквивалентные связывающие участки существуют и у отличного от человеческого TDP-43. Так, например, аминокислотная последовательность мышинного TDP-43 (см. регистрационный № Q921F2 в базе Uniprot) также имеет длину 414 аминокислот и на 96% (398/414 остатков) идентична человеческой последовательности. Настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, в частности антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с участками/пептидами, эквивалентными участкам/пептидам, указанным выше с привязкой к SEQ ID NO: 1 в отличном от человеческого TDP-43, особенно в мышинном TDP-43.

В частности, настоящее изобретение кратко изложено в следующих вариантах осуществления:

1. Связывающая TDP-43 молекула, которая связывает неправильно свернутый агрегированный TDP-43 и неагрегированный физиологический TDP-43, в частности человеческий TDP-43.
2. Связывающая TDP-43 молекула по предыдущему варианту осуществления, которая связывается с эпитопом в пределах аминокислотных остатков 181-195, 199-213, 307-321, 352-366, 389-411, 397-411 или 140-200 человеческого TDP-43 (SEQ ID NO: 1).
3. Связывающая TDP-43 молекула по предыдущему варианту осуществления, которая связывается с эпитопом в пределах аминокислотных остатков 183-188, 203-213, 204-208, 204-211, 205-210, 316-323, 358-361, 400- 405, 400-406 или 400-412 человеческого TDP-43 (SEQ ID NO: 1).
4. Связывающая молекула по любому из предыдущих вариантов осуществления, которая представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
5. Связывающая молекула по любому из предыдущих вариантов осуществления или связывающая TDP-43 молекула, которая содержит
  - a) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность ES (Glu-Ser); VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15; VL-CDR2,







аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 143; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 146; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 147; или

k) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 151; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 152; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 153; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 155; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 156; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157.

6. Связывающая молекула по любому из предыдущих вариантов осуществления или связывающая TDP-43 молекула, которая представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

a. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 10, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 14, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14; или

b. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 20, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 20; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 24, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; или

c. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий

последовательность под SEQ ID NO: 30, или вариабельный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; и вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 34, или вариабельный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34; или

d. вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 40, или вариабельный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 40; и вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 44; или

e. вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 60, или вариабельный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60; и вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 64, или вариабельный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 64; или

f. вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 70, или вариабельный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 70; и вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 74, или вариабельный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 74; или

g. вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 80, или вариабельный участок тяжелой

цепи (VH), имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 80; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 84, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 84; или

h. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 100, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 100; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 104, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 104; или

i. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 120, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 120; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 124, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 124; или

j. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 140, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 140; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 144; или

k. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 150, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 150; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 154, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 154.

7. Связывающая молекула по любому из предыдущих вариантов осуществления или связывающая TDP-43 молекула, которая представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

- a. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 10, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 14; или
- c. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 20, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 24; или
- d. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 30, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 34; или
- e. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 40, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 44; или
- f. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 60, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 64; или
- g. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 70, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 74; или
- h. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 80, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 84; или
- i. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 100, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 104; или
- j. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий

последовательность под SEQ ID NO: 120, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 124; или

k. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 140, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 144; или

l. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 150, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 154.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит:

- a) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность ES (Glu-Ser); VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17; или
- b) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность ES (Glu-Ser); VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27; или
- c) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37; или
- d) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под



SEQ ID NO: 125; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 127; или

j) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 141; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 142; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 143; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 146; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 147; или

k) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 151; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 152; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 153; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 155; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 156; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит:

a) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность ES (Glu-Ser); или

b) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность ES (Glu-Ser); или

c) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33; или

d) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43; или

e) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под

SEQ ID NO: 61; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63; или

f) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 71; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 72; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 73; или

g) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 81; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 83; или

h) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 101; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103; или

i) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 121; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 122; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 123; или

j) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 141; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 142; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 143; или

k) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 151; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 152; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 153.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит:

a) VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17; или

b) VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под



SEQ ID NO: 27; или

c) VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37; или

d) VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 66; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 67; или

e) VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 75; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77; или

f) VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 85; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 86; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 87; или

g) VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 105; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 106; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 107; или

h) VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 125; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 127; или

i) VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 155; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 156; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит:

a) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12; VH-CDR3, содержащий аминокислотную





аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 105; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 106; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 107; или

i) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 121; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 122; VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 123; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 125; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 127; или

j) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 141; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 142; VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 143; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 146; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 147; или

k) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 151; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 152; VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 153; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 155; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 156; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157; или

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит:

a) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под







последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 156; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 157.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к TDP-43 содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть CDR, выбранных из (a) VH-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11; (b) VH-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; (c) VH-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность ES (Glu-Ser); (d) VL-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15; (e) VL-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и (f) VL-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к TDP-43 содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть CDR, выбранных из (a) VH-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; (b) VH-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22; (c) VH-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность ES (Glu-Ser); (d) VL-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25; (e) VL-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и (f) VL-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к TDP-43 содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть CDR, выбранных из (a) VH-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31; (b) VH-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32; (c) VH-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33; (d) VL-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35; (e) VL-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36; и (f) VL-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к TDP-43 содержит по меньшей мере один, два или три CDR, выбранных из (a) VH-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41; (b) VH-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42; (c) VH-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к TDP-43 содержит по меньшей мере четыре, пять или шесть CDR, выбранных из (a) VH-CDR1,





VL-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 105; (e) VL-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 106; и (f) VL-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 107.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к TDP-43 содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть CDR, выбранных из (a) VH-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 121; (b) VH-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 122; (c) VH-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 123; (d) VL-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 125; (e) VL-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и (f) VL-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 127.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к TDP-43 содержит по меньшей мере один, два или три CDR, выбранных из (a) VH-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 141; (b) VH-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 142; (c) VH-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 143.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к TDP-43 содержит по меньшей мере четыре, пять или шесть CDR, выбранных из (a) VH-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 141; (b) VH-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 142; (c) VH-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 143; (d) VL-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145; (e) VL-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 146; и (f) VL-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 147.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к TDP-43 содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть CDR, выбранных из (a) VH-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 151; (b) VH-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 152; (c) VH-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 153; (d) VL-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 155; (e) VL-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 156; и (f) VL-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157.

В соответствии с другим вариантом осуществления, антитело к TDP-43 содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), выбранный из SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 150, включая посттрансляционные модификации данной

последовательности. В соответствии с отдельным вариантом осуществления, переменный домен тяжелой цепи (VH) содержит по меньшей мере один, два или три CDR, выбранных из (a) VH-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 61, 71, 81, 101, 121, 141, 151, (b) VH-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 12, 22, 32, 42, 62, 72, 82, 102, 122, 142, 152, (c) VH-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 33, 43, 63, 73, 89, 103, 123, 143, 153 и ES (Glu-Ser).

В соответствии с другим вариантом осуществления, антитело к TDP-43 содержит переменный домен легкой цепи (VL), выбранный из SEQ ID NO: 14, 24, 34, 64, 74, 84, 104, 124, 154, включая посттрансляционные модификации данной последовательности. В соответствии с отдельным вариантом осуществления, переменный домен легкой цепи (VL) содержит по меньшей мере один, два или три CDR, выбранных из (a) VL-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15, 25, 35, 65, 75, 85, 105, 125, 155, и (b) VL-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16, 36, 66, 86, 106, 156, (c) VL-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 17, 27, 37, 67, 77, 87, 107, 127, 157 и ES (Glu-Ser).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к TDP-43 содержит по меньшей мере один, два или три CDR, выбранных из (a) VH-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 61, 71, 81, 101, 111, 121, 141, 151, (b) VH-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 12, 22, 32, 42, 62, 72, 82, 102, 122, 142, 152, (c) VH-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 33, 43, 63, 73, 83, 103, 123, 143, 153 и ES (Glu-Ser).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к TDP-43 содержит по меньшей мере один, два или три CDR, выбранных из (a) VL-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15, 25, 35, 65, 75, 85, 105, 125, 155, (b) VL-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16, 36, 66, 86, 106, 156, (c) VL-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 17, 27, 37, 67, 77, 87, 107, 127, 157.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, переменный домен легкой цепи (VL) содержит по меньшей мере один, два или три CDR, выбранных из (a) VL-CDR1, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:

15, 25, 35, 45, 65, 75, 85, 105, 125, 145, 155, и (b) VL-CDR2, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16, 36, 66, 86, 106, 156, (c) VL-CDR3, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 17, 27, 37, 67, 77, 87, 107, 127, 157.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителу, полученному из клонов гибридомы 631B2A2, 633B12C8, 634H10H7, 636E5B8, 641H1E7, 642A10B11, 642D12B4, 646B7F7, 712A6B10, 809D9C2 или 809F12D8.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителу, выбранному из ACI-7069-631B2-Ab1, ACI-7069-633B12-Ab1, ACI-7069-634H10-Ab2, ACI-7069-636E5-Ab1, ACI-7069-641H1-Ab2, ACI-7069-642A10-Ab1, ACI-7069-642D12-Ab1, ACI-7069-646B7-Ab1, ACI-7071-712A6-Ab1, ACI-7071-809D9-Ab2 и ACI-7071-809F12-Ab1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, связывающая молекула или антитело, представленные в настоящем документе, характеризуются константой диссоциации (KD)  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ,  $\leq 0,01$  нМ или  $\leq 0,001$  нМ (например,  $10^{-8}$  М или менее, например от  $10^{-8}$  М до  $10^{-13}$  М, например, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М), в частности в отношении связывания TDP-43, в частности растворимого TDP-43, агрегированного TDP-43 и/или олигомерного TDP-43. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут характеризоваться более низкой KD к агрегированному TDP-43, чем к растворимому TDP-43. Например, связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению могут характеризоваться KD к агрегированному TDP-43 30 нМ или менее, в соответствии с конкретными вариантами осуществления 1 нМ или менее, и KD к растворимому TDP-43 500 нМ или менее. Это продемонстрировано для связывающих TDP-43 молекул по настоящему изобретению в примере 8А на основе таблицы 8.

В соответствии с одним вариантом осуществления, аффинность связывания с растворимым или агрегированным FL TDP-43 можно оценить путем определения констант диссоциации (KD) с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR; Biacore T200, GE Healthcare Life Sciences). Для подробного описания подходящих способов SPR, которые могут быть использованы, можно обратиться к примерам 8А и 8В.

Связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, обычно связывают TDP-43 с высокой аффинностью. Например, у них можно наблюдать значение EC50 200 пМ или менее, более предпочтительно 20 пМ или менее и еще более предпочтительно 10 пМ или менее,

по результатам анализа Lumineх. Для получения дополнительных сведений о подходящем анализе см. пример 3. Аналогично, у них можно наблюдать значение EC50 1600 нг/мл или менее, более предпочтительно 120 нг/мл или менее и еще более предпочтительно 60 нг/мл или менее, по результатам анализа с помощью непрямого ELISA. Для получения дополнительных сведений о подходящем анализе см. пример 4.

Связывающие молекулы TDP-43 по настоящему изобретению, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, связываются как с неагрегированным физиологическим TDP-43, так и с агрегированным TDP-43. Таким образом, связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут примерно одинаково хорошо связываться с растворимым и агрегированным TDP-43. Связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут примерно одинаково связываться с агрегированным TDP-43 в сравнении с неагрегированным TDP-43. Более конкретно, связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут примерно одинаково связываться с агрегированным TDP-43 в цитоплазме в сравнении с неагрегированным TDP-43 в ядре. В соответствии с другими вариантами осуществления, связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут предпочтительно связываться с агрегированным TDP-43 в сравнении с неагрегированным TDP-43, при этом связываясь с обеими молекулами. Более конкретно, связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут предпочтительно связываться с агрегированным TDP-43 в цитоплазме в сравнении с неагрегированным TDP-43 в ядре, при этом связываясь с обеими молекулами. Альтернативно, в соответствии с другими вариантами осуществления, связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут предпочтительно связываться с неагрегированным TDP-43 в сравнении с агрегированным TDP-43, при этом связываясь с обеими молекулами. Более конкретно, связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут предпочтительно связываться с неагрегированным TDP-43 в ядре в сравнении с агрегированным TDP-43 в цитоплазме, при этом связываясь с обеими молекулами. Данные свойства связывания можно продемонстрировать, например, с помощью иммуногистохимии. Подходящая методология описана в настоящем документе на основе

примера 6, где представлены соответствующие контроли. Результаты представлены в таблице 7.

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим связывающую молекулу, в частности антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению (в том числе фрагменты и производные связывающего TDP-43 антитела), которые описаны в настоящем документе. Кроме того, настоящее изобретение относится к иммунотерапевтическим и/или иммунодиагностическим способам с применением таких композиций для предупреждения развития, диагностики и/или лечения протеинопатии TDP-43, при которых нуждающемуся в том субъекту вводят эффективное количество композиции.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, в частности антителам и их антигенсвязывающим фрагментам по настоящему изобретению, которые описаны в настоящем документе, которые специфически связывают TDP-43, и к применению данных связывающих молекул для диагностики, предупреждения, облегчения и/или лечения заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43, в том числе без ограничения лобно-височной деменции (FTD), бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ) и связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE). Способы и композиции, раскрытые в настоящем документе, находят применения в диагностике, предупреждении развития, облегчении и/или лечении заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатией TDP-43, в том числе без ограничения лобно-височной деменции (FTD), бокового амиотрофического склероза (ALS). Предпочтительно, применение данных связывающих молекул для диагностики, предупреждения развития, облегчения и/или лечения заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43, относится к амиотрофическому боковому склерозу (ALS), болезни Альцгеймера (AD) или лобно-височной деменции (FTD). Более предпочтительно, применение относится к боковому амиотрофическому склерозу (ALS). Более предпочтительно, применение относится к болезни Альцгеймера (AD). Более предпочтительно, применение относится к лобно-височной деменции (FTD).

В соответствии с другим вариантом осуществления, связывающую молекулу, в частности антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению,

которые описаны в настоящем документе, специфичные к TDP-43, приводят в контакт с образцом для детекции, диагностики и/или отслеживания заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43, которые выбраны из лобно-височной деменции (FTD, такой как спорадическая или семейная с или без заболевания двигательных нейронов (MND), с мутацией програнулина (GRN), с мутациями C9orf72, с мутацией TARDBP, с мутацией валозин-содержащего белка (VCP), связанная с хромосомой 9p, кортикобазальная дегенерация, лобно-височная лобарная дегенерация (FTLD) с убиквитин-положительными включениями TDP-43 (FTLD-TDP), болезнь аргирофильного зерна, болезнь Пика, семантический вариант первичной прогрессирующей афазии (svPPA), поведенческий вариант FTD (bvFTD), не затрагивающий беглость речи вариант прогрессирующей афазии (nfvPPA) и др.), бокового амиотрофического склероза (ALS, такого как спорадический ALS, с мутацией TARDBP, с мутацией ангиогенина (ANG)), болезни Александра (AxD), связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE), хронической травматической энцефалопатии, синдрома Перри, болезни Альцгеймера (AD, в том числе спорадических и семейных форм AD), синдрома Дауна, семейной британской деменции, полиглутаминовых заболеваний (болезни Хантингтона и спинально-церебеллярной атаксии 3-го типа (SCA3; также известной под названием болезнь Мачадо-Джозефа)), деменции с гиппокампальным склерозом и миопатий (спорадического миозита с тельцами включения, миопатии с тельцами включения с мутацией валозин-содержащего белка (VCP; также называемой болезнью Педжета костей и лобно-височной деменцией), окулофарингеальной мышечной дистрофии с окаймленными вакуолями, миофибриллярных миопатий с мутациями в гене миотилина (MYOT) или с мутациями в гене, кодирующем десмин (DES)), травмы головного мозга (TBI), деменции с тельцами Леви (DLB) или болезни Паркинсона (PD).

В соответствии с одним вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, в частности антителам или их антигенсвязывающим фрагментам по настоящему изобретению, которые описаны в настоящем документе, которые специфически связывают TDP-43, и к применению данных молекул, в частности данных антител, для детекции наличия TDP-43 в образце. Соответственно, связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению, такие как антитела к TDP43, которые описаны в настоящем документе, можно среди прочего применять для скрининга клинического образца, в частности человеческой крови, CSF, интерстициальной жидкости (ISF) и/или мочи на наличие TDP-43 в образцах, например, с применением анализа на основе ELISA или анализа с адаптированной поверхностью. В

некоторых случаях можно применять образцы тканей, например, образцы тканей головного мозга. Способы и композиции по настоящему изобретению также находят применение в диагностике пресимптоматического заболевания и/или в отслеживании прогрессирования заболевания и/или терапевтической эффективности. Согласно некоторым вариантам осуществления, антитело, специфичное к TDP-43 (например, полноразмерное антитело, или связывающий TDP-43 фрагмент, или производное антитела), приводят в контакт с образцом (например, крови, спинномозговой жидкости (CSF), интерстициальной жидкости (ISF) или ткани головного мозга) для детекции, диагностики и/или отслеживания лобно-височной деменции (FTD, такой как спорадическая или семейная с или без заболевания двигательных нейронов (MND), с мутацией програнулина (GRN), с мутациями C9orf72, с мутацией TARDBP, с мутацией валозин-содержащего белка (VCP), связанная с хромосомой 9p, кортикобазальная дегенерация, лобно-височная лобарная дегенерация (FTLD) с убиквитин-положительными включениями TDP-43 (FTLD-TDP), болезнь аргирофильного зерна, болезнь Пика, семантический вариант первичной прогрессирующей афазии (svPPA), поведенческий вариант FTD (bvFTD), не затрагивающий беглость речи вариант прогрессирующей афазии (nvPPA) и др.), бокового амиотрофического склероза (ALS, такого как спорадический ALS, с мутацией TARDBP, с мутацией ангиогенина (ANG)), болезни Александра (AxD), связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE), хронической травматической энцефалопатии, синдрома Перри, болезни Альцгеймера (AD, в том числе спорадических и семейных форм AD), синдрома Дауна, семейной британской деменции, полиглутаминовых заболеваний (болезни Хантингтона и спинально-церебеллярной атаксии 3-го типа (SCA3; также известной под названием болезнь Мачадо-Джозефа)), деменции с гиппокампальным склерозом и миопатий (спорадического миозита с тельцами включения, миопатии с тельцами включения с мутацией валозин-содержащего белка (VCP; также называемой болезнью Педжета костей и лобно-височной деменцией), окулофарингеальной мышечной дистрофии с окаймленными вакуолями, миофибриллярных миопатий с мутациями в гене миотилина (MYOT) или с мутациями в гене, кодирующем десмин (DES)), травмы головного мозга (TBI), деменции с тельцами Леви (DLB) или болезни Паркинсона (PD). Связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению можно применять для количественной оценки TDP-43 в подходящих образцах, в частности, в клинических образцах, таких как кровь, CSF, ISF или моча, с относительно высокими уровнями TDP-43 в сравнении с подходящим контролем, которая указывает на наличие заболевания и/или более поздней стадии заболевания. Известно много подходящих форматов



иммуноанализа. Так, способы (такие как ELISA, MSD (Meso Scale Discovery), HTRF (гомогенная флуоресценция с разрешением во времени) и AlphaLISA) можно осуществлять с целью диагностики с высокими уровнями TDP-43, что указывает на наличие заболевания. В качестве альтернативы, способы можно осуществлять с целью отслеживания. Повышение уровней со временем может указывать на прогрессирование заболевания. Снижение уровней со временем может указывать на регресс заболевания. Способы также можно применять для отслеживания терапии, в частности, для отслеживания эффективности конкретного лечения. Успешную терапию можно оценить по стабильным или снижающимся уровням TDP-43 после лечения. В настоящем документе продемонстрировано (пример 12), что при измерении с применением антител по настоящему изобретению уровни TDP-43 были выше в образцах CSF от пациентов с протеинопатией TDP-43, чем в контрольных образцах, взятых от здоровых субъектов (здоровый контроль). Контрольные образцы могут быть или не быть проанализированы параллельно с тестируемыми образцами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, контрольные уровни определяют из серии контрольных образцов, взятых у здоровых субъектов, в аналогичных или одинаковых экспериментальных условиях, и применяют в качестве компаратора для уровней, определяемых в тестируемом образце. Способы количественной оценки TDP-43 в подходящих образцах с применением связывающих молекул по настоящему изобретению также можно применять для выбора терапии (для дальнейшего лечения субъекта). Таким образом, предусмотрены индивидуальные способы лечения. Забор образца производят до и после лечения. Если лечение с применением данной терапии приводит к стабилизации или, предпочтительно, снижению уровней TDP-43 после лечения, данная терапия может быть выбрана для данного субъекта. Если терапия не приводит к стабилизации или, предпочтительно, снижению уровней TDP-43 после лечения, данную терапию не выбирают для данного субъекта. Терапия может представлять собой любое подходящее терапевтическое средство для лечения протеинопатий TDP-43. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления, терапия предусматривает использование связывающей TDP-43 молекулы по настоящему изобретению, обычно в форме фармацевтической композиции, которая описана в настоящем документе.

Связывающие TDP-43 молекулы по настоящему изобретению также можно применять для классификации заболеваний на конкретные типы или подтипы. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу классификации заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или для классификации протеинопатии TDP-43, предусматривающему:

- a. осуществление способов по настоящему изобретению, в которых уровни TDP-43 количественно оценивают в сравнении с подходящими контролями,
- b. необязательно выявление мутаций в образце от субъекта, в том числе без ограничения мутации програнулина (GRN), мутаций C9orf72, мутации TARDBP, с мутацией валозин-содержащего белка (VCP), мутации TARDBP, мутации ангиогенина (ANG), мутации в валозин-содержащем белке (VCP), мутации в гене миотилина (MYOT) или мутаций в гене, кодирующем десмин (DES), и
- c. классификацию заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43.

Аналогично, настоящее изобретение относится к способу классификации заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или классификации протеинопатии TDP-43, предусматривающему осуществление способов по настоящему изобретению, при которых уровни TDP-43 количественно оценивают в образце, полученном от субъекта с заболеванием, расстройством и/или нарушением, связанными с TDP-43, или протеинопатией TDP-43, при этом уровни сравнивают с контрольными образцами, взятыми у субъектов с различными типами или подтипами заболевания, расстройства и/или нарушения (т. е. определяют репрезентативный набор контрольных уровней для представляющих интерес типов или подтипов), связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43; и классификацию заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43, по результатам сравнения. Таким образом, классификация основана на определении наиболее близкого соответствия между тестируемым образцом и одним или более контрольными образцами. Данные способы могут дополнительно предусматривать выявление мутаций в образце, в том числе без ограничения мутации програнулина (GRN), мутаций C9orf72, мутации TARDBP, с мутацией валозин-содержащего белка (VCP), мутации TARDBP, мутации ангиогенина (ANG), мутации в валозин-содержащем белке (VCP), мутации в гене миотилина (MYOT) или мутаций в гене, кодирующем десмин (DES), причем выявленные мутации также применяют для классификации заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43. Во избежание сомнений выявление мутаций в образце можно осуществлять любым подходящим способом, например, на основе нуклеотидного секвенирования молекул нуклеиновой кислоты в образце. Образец может

быть отдельным и отличным от образца, в котором определяют уровни TDP-43, но от того же субъекта.

В соответствии с другими вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способам предупреждения, облегчения и/или лечения заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43. Согласно одному варианту осуществления, способы по настоящему изобретению предусматривают введение субъекту эффективной концентрации связывающей молекулы, в частности антитела по настоящему изобретению, специфичного к TDP-43 (например, полноразмерного антитела, или связывающего TDP-43 фрагмента, или производного антитела), которые описаны в настоящем документе. В соответствии с другим вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к способу предупреждения, облегчения и/или лечения протеинопатии TDP-43. Согласно некоторым вариантам осуществления, связывающую молекулу, в частности антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, которые описаны в настоящем документе, специфичные к TDP-43, вводят для лечения, облегчения и/или предупреждения лобно-височной дегенерации (FTD) или бокового амиотрофического склероза (ALS). В соответствии с другим вариантом осуществления, связывающую молекулу, в частности антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, которые описаны в настоящем документе, специфичные к TDP-43, вводят для предупреждения, облегчения и/или лечения нейродегенеративного заболевания, выбранного из лобно-височной деменции (FTD), бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD, в том числе спорадических и семейных форм AD), болезни Паркинсона (PD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ), связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE).

В соответствии с другим вариантом осуществления, связывающую молекулу, в частности антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, которые описаны в настоящем документе, специфичные к TDP-43, вводят для предупреждения, облегчения и/или лечения заболевания, выбранного из: лобно-височной деменции (FTD, такой как спорадическая или семейная с или без заболевания двигательных нейронов (MND), с мутацией програнулина (GRN), с мутациями C9orf72, с мутацией TARDBP, с мутацией валозин-содержащего белка (VCP), связанная с хромосомой 9p, кортикобазальная дегенерация, лобно-височная лобарная дегенерация (FTLD) с убиквитин-положительными включениями TDP-43 (FTLD-TDP), болезнь аргирофильного зерна, болезнь Пика, семантический вариант первичной

прогрессирующей афазии (svPPA), поведенческий вариант FTD (bvFTD), не затрагивающий беглость речи вариант прогрессирующей афазии (nfvPPA) и др.), бокового амиотрофического склероза (ALS, такого как спорадический ALS, с мутацией TARDBP, с мутацией ангиогенина (ANG)), болезни Александра (AxD), связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE), хронической травматической энцефалопатии, синдрома Перри, болезни Альцгеймера (AD, в том числе спорадических и семейных форм AD), синдрома Дауна, семейной британской деменции, полиглутаминовых заболеваний (болезни Хантингтона и спинально-церебеллярной атаксии 3-го типа (SCA3; также известной как болезнь Мачадо-Джозефа)), деменции с гиппокампальным склерозом и миопатий (спорадического миозита с тельцами включения, миопатии с тельцами включения с мутацией валозин-содержащего белка (VCP; также называемой болезнью Педжета костей и лобно-височной деменцией), окулофарингеальной мышечной дистрофии с окаймленными вакуолями, миофибриллярных миопатий с мутациями в гене миотилина (MYOT) или с мутациями в гене, кодирующем десмин (DES)), травмы головного мозга (TBI), деменции с тельцами Леви (DLB) или болезни Паркинсона (PD).

### **Подробное описание вариантов осуществления настоящего изобретения**

#### **Х.ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Термин «антигенсвязывающая молекула» в контексте настоящего документа означает любую молекулу, которая может специфически или селективно связываться с антигеном, в частности с TDP-43. Связывающая молекула может включать или представлять собой антитело или его фрагмент. Связывающая молекула к TDP-43 представляет собой молекулу, которая связывается с белком TDP-43, такую как антитело или его фрагмент к TDP-43 в конкретном сайте узнавания, эпитопе. То есть, антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению связываются с эпитопом в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. Представленные в настоящем документе антигенсвязывающие молекулы, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, распознают полноразмерный TDP-43. К другим связывающим молекулам к TDP-43 также можно отнести мультивалентные молекулы, мультиспецифические молекулы (например, диатела), гибридные молекулы, аптамеры, авимеры или другие встречающиеся в природе или созданные рекомбинантными методами молекулы. К иллюстративным антигенсвязывающим молекулам, пригодным в настоящем изобретении, относятся антителоподобные молекулы. Антителоподобная молекула представляет собой молекулу, которая может осуществлять свои функции путем

связывания с целевой молекулой (см., например, *Current Opinion in Biotechnology* 2006, 17:653-658; *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18:1-10; *Current Opinion in Structural Biology* 1997, 7:463-469; *Protein Science* 2006, 15:14-27), и к такой молекуле относятся, например, дарпины (DARPin) (WO 2002/020565), аффитело (WO 1995/001937), авимер (WO 2004/044011; WO 2005/040229), аднектин (WO 2002/032925) и финомеры (WO 2013/135588).

Термины «антитело к TDP-43» и «антитело, которое связывается с TDP-43» или просто «антитело» в контексте настоящего документа относятся к антителу, которое способно связывать TDP-43 с достаточной аффинностью, так чтобы антитело могло быть пригодным для использования в качестве диагностического и/или терапевтического средства при целенаправленном воздействии на TDP-43. В целом, термин «антитело» применяют в настоящем документе в наиболее широком смысле, и он охватывает различные структуры антител, в том числе без ограничения моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические или бипаратопные антитела), полностью человеческие антитела и фрагменты таких антител при условии, что они проявляют требуемую антигенсвязывающую активность. Антитела в объеме настоящего изобретения также могут быть химерными антителами, рекомбинантными антителами, антигенсвязывающими фрагментами рекомбинантных антител, гуманизированными антителами или антителами, экспонированными на поверхности фага или экспонированными на поверхности Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR).

«Антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела и которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают без ограничения Fv, Fab, Fab', Fa' -SH, F(ab')<sub>2</sub>, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител (например scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

«Антитело, которое связывается с эпитопом» в определенном участке белка, представляет собой антитело, которому для связывания с белком необходимо наличие одной или более аминокислот в данном участке.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, «антитело, которое связывается с эпитопом» в определенном участке белка, выявляют с помощью мутационного анализа, в котором аминокислоты белка подвергают мутации и определяют связывание антитела с полученным измененным белком (например, измененным белком, содержащим эпитоп), которое должно составлять по меньшей мере 20% от связывания с

неизменным белком. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, «антитело, которое связывается с эпитопом» в определенном участке белка, выявляют с помощью мутационного анализа, в котором аминокислоты белка подвергают мутации и определяют связывание антитела с полученным измененным белком (например, измененным белком, содержащим эпитоп), которое должно составлять по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90% от связывания с неизменным белком. В соответствии с определенными вариантами осуществления, связывание антитела определяют с помощью FACS, WB или подходящего анализа связывания, такого как ELISA.

Термин «связывание с», применяемый в контексте настоящего изобретения, определяет связывание (взаимодействие) по меньшей мере двух «антигенных сайтов взаимодействия» друг с другом. Термин «антигенный сайт взаимодействия» определяет, в соответствии с настоящим изобретением, мотив полипептида, т. е. часть антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, который характеризуется способностью к специфическому взаимодействию с конкретным антигеном или конкретной группой антигенов TDP-43. Указанное связывание/взаимодействие также понимают как определение термину «специфическое распознавание». Термин «специфически распознающий» означает, в соответствии с настоящим изобретением, что антитело способно специфически взаимодействовать и/или связываться по меньшей мере с двумя аминокислотами у TDP-43, как определено в настоящем документе, в частности, взаимодействовать/связываться по меньшей мере с двумя аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 181-195, 199-213, 307-321, 352-366, 389-411, 397-411 и 140-200 человеческого TDP-43 (SEQ ID NO: 1), еще более конкретно, взаимодействовать со связыванием по меньшей мере с двумя аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 183-188, 203-213, 204-208, 204-211, 205-210, 316-323, 358-361, 400-405, 400-406 или 400-412 человеческого TDP-43 (SEQ ID NO: 1).

Термин «антитело к пан-TDP-43» относится к антителу, которое связывается с неправильно свернутым агрегированным TDP-43 и неагрегированным физиологическим TDP-43, в том числе мономерным TDP-43, олигомерным TDP-43, посттрансляционно модифицированным TDP-43 (таким как фосфорилированный, убиквитинированный, ацетилованный, сумоилированный и/или метилированный), агрегированным TDP-43 и укороченным TDP-43.

Термин «специфическое взаимодействие», используемый в соответствии с настоящим изобретением, означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

по настоящему изобретению не вступает или фактически не вступает в перекрестную реакцию с (поли)пептидами со схожими структурами. Соответственно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению специфически связывается/взаимодействует со структурами TDP-43, образованными конкретными аминокислотными последовательностями, в пределах аминокислотных остатков 181-195, 199-213, 307-321, 352-366, 389-411, 397-411 и 140-200 человеческого TDP-43 (SEQ ID NO: 1), более конкретно, связывается/взаимодействует со структурами TDP-43, образованными конкретными аминокислотными последовательностями, в пределах аминокислотных остатков 183-188, 203-213, 204-208, 204-211, 205-210, 316-323, 358-361, 400-405, 400-406 или 400-412 человеческого TDP-43 (SEQ ID NO: 1).

Перекрестную реактивность антигенсвязывающих молекул, в частности исследуемой панели антител или их антигенсвязывающих фрагментов, можно протестировать, например, путем оценки связывания указанной панели антител или их антигенсвязывающих фрагментов в обычных условиях (см., например, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988) и *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1999)) с представляющим интерес (поли)пептидом, а также с рядом более или менее (структурно и/или функционально) близкородственных (поли)пептидов. Лишь те конструкции (т. е. антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и т. п.), которые связываются с определенной структурой TDP-43, который определен в настоящем документе, например, с конкретным эпитопом или (поли)пептидом/белком TDP-43, который определен в настоящем документе, но не связываются или фактически не связываются ни с одним из других эпитопов или (поли)пептидов того же TDP-43, считаются специфичными к представляющему интерес эпитопу или (поли)пептиду/белку и отбираются для дальнейших исследований в соответствии с представленным в настоящем документе способом. Данные способы могут предусматривать, среди прочего, исследования связывания, исследования блокировки и конкуренции со структурно и/или функционально близкородственными молекулами. Данные исследования связывания также предусматривают FACS-анализ, поверхностный плазмонный резонанс (SPR, например, с помощью BIACORE™), аналитическое ультрацентрифугирование, изотермическую титрационную калориметрию, флуоресцентную анизотропию, флуоресцентную спектроскопию или анализы связывания лиганда с радиоактивной меткой.

Соответственно, специфичность можно определить экспериментально с помощью известными в настоящей области техники способов и описанных в настоящем документе

способов. К таким способам относятся без ограничения вестерн-блоттинг, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-тесты и пептидное сканирование.

Термин «моноклональное антитело» в контексте настоящего документа относится к антителу, полученному из популяции практически однородных антител, т. е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны и направлены против одного антигенного сайта. Преимущество моноклональных антител заключается в том, что их можно синтезировать с помощью культуры гибридом, фактически не загрязненными другими иммуноглобулинами. Модифицированный термин «моноклональное» указывает на характер антитела как относящегося к практически однородной популяции антител, и его не следует истолковывать как необходимость получения антитела каким-либо конкретным способом. Как упомянуто выше, моноклональные антитела, которые будут применяться в соответствии с настоящим изобретением, можно получить гибридным способом, описанным у Kohler, Nature 256 (1975), 495.

Термин «поликлональное антитело» в контексте настоящего документа относится к антителу, которое было получено среди или в присутствии одного или более других неидентичных антител. Как правило, поликлональные антитела получают от В-лимфоцита в присутствии нескольких других В-лимфоцитов, которые продуцировали неидентичные антитела. Обычно, поликлональные антитела получают непосредственно от иммунизированного животного.

Термин «полностью человеческое антитело» в контексте настоящего документа относится к антителу, которое содержит только человеческие последовательности иммуноглобулина. Полностью человеческое антитело может содержать мышинные углеводные цепи, если оно продуцируется у мыши, в клетке мыши или в гибридоме, полученной из клетки мыши. Аналогично, «антитело мыши» или «мышинное антитело» относится к антителу, которое содержит только мышинные последовательности иммуноглобулина/последовательности иммуноглобулина мыши. Альтернативно, «полностью человеческое антитело» может содержать углеводные цепи крысы, если оно продуцируется у крысы, в клетке крысы или в гибридоме, полученной из клетки крысы. Аналогично, термин «антитело крысы» относится к антителу, которое содержит только последовательности иммуноглобулина крысы. Полностью человеческие антитела также можно получить, например, с помощью фагового дисплея, который представляет собой широко применяемую технологию скрининга, которая позволяет получать и подвергать



скринингу полностью человеческие антитела. Также в контексте настоящего изобретения можно применять фаговые антитела. Способы фагового дисплея описаны, например, в публикациях US 5403484, US 5969108 и US 5885793. Другая методика, которая позволяет разрабатывать полностью человеческие антитела, предусматривает модификацию методики мышинных гибридом. Мышей делают трансгенными так, чтобы они содержали локус человеческого иммуноглобулина взамен их собственных мышинных генов (см., например, US 5877397).

Термин «химерные антитела» относится к антителу, которое содержит переменный участок по настоящему изобретению, гибридный или химеризованный с участком антитела (например, константным участком) от другого, человеческого или отличного от человеческого вида (например, мыши, лошади, кролика, собаки, коровы, курицы).

Термин «антитело» также относится к рекомбинантным человеческим антителам, гетерологичным антителам и гетерогибридным антителам. Термин «рекомбинантное (человеческое) антитело» охватывает все антитела с человеческими последовательностями, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные от животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулина человека; антитела, экспрессируемые с применением рекомбинантного вектора экспрессии, введенного путем трансфекции в клетку-хозяина, антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител, или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые предусматривают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные участки (если они присутствуют), полученные из человеческих эмбриональных последовательностей иммуноглобулина. Однако такие антитела могут быть подвергнуты *in vitro* мутагенезу (или, если используют животное, трансгенное по человеческим последовательностям Ig, *in vivo* соматическому мутагенезу), и, таким образом, аминокислотные последовательности VH- и VL-участков рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из человеческих эмбриональных последовательностей VH и VL и являются родственными с ними, могут в природе не существовать в эмбриональном репертуаре человеческих антител *in vivo*.

«Гетерологичное антитело» определяют в отношении трансгенного, отличного от человеческого организма, продуцирующего такое антитело. Данный термин относится к

антителу, имеющему аминокислотную последовательность или кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую той, которая встречается в организме, не относящемуся к трансгенному, отличному от человека животному, и, как правило, получены от вида, отличного от вида трансгенного, отличного от человека животного.

Термин «гетерогибридное антитело» относится к антителу, имеющему легкую и тяжелую цепи различного организменного происхождения. Например, антитело, имеющее человеческую тяжелую цепь, связанную с мышшиной легкой цепью, является гетерогибридным антителом. Примеры гетерогибридных антител включают химерные и гуманизированные антитела.

Термин антитело также относится к гуманизированным антителам. «Гуманизированные» формы отличных от человеческих (например, мышшиных или кроличьих) антител представляют собой химерные иммуноглобулины, иммуноглобулиновые цепи или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из отличного от человеческого иммуноглобулина. Зачастую, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентные антитела), в которых остатки из определяющего комплементарность участка (CDR) реципиента заменены остатками из CDR отличного от человека вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса или кролик, обладающего требуемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях остатки каркасного участка Fv человеческого иммуноглобулина заменяют на соответствующие остатки отличного от человеческого происхождения. Более того, гуманизированное антитело может содержать остатки, которых нет ни в реципиентном антителе, ни в импортированных последовательностях CDR или каркасного участка. Данные модификации вносят для дополнительной доработки и оптимизации характеристик антител. В целом, гуманизированное антитело будет содержать практически все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или практически все CDR-участки соответствуют таковым из иммуноглобулина отличного от человеческого происхождения, и все или практически все FR-участки являются таковыми из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может также содержать по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), обычно участка человеческого иммуноглобулина. Для получения дополнительной информации см: Jones et al., Nature 321 (1986), 522-525; Reichmann Nature 332 (1998), 323-327 и Presta Curr Op Struct Biol 2 (1992), 593-596.

Популярный способ гуманизации антител предусматривает прививание CDR, при этом функциональный антигенсвязывающий сайт из отличного от человеческого «донорного» антитела прививают на человеческое «акцепторное» антитело. Способы прививки CDR известны из уровня техники и описаны, например, в публикациях US 5225539, US 5693761 и US 6407213. Другим родственным способом является получение гуманизованных антител от трансгенных животных, которые модифицированы методами генной инженерии так, чтобы они содержали один или более гуманизованных локусов иммуноглобулина, которые способны подвергаться генной перестройке и генной конверсии (см., например, US 7129084).

Соответственно, в контексте настоящего изобретения термин «антитело» относится к полным иммуноглобулиновым молекулам, а также к частям таких иммуноглобулиновых молекул (т. е. «его антигенсвязывающему фрагменту»). Более того, как рассмотрено выше, данный термин относится к модифицированным и/или измененным молекулам антител. Термин также относится к антителам, полученным/синтезированным рекомбинантными методами или методами синтеза. Термин также относится к интактным антителам, а также к их фрагментам антител, таким как разделенные легкие и тяжелые цепи, Fab, Fv, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>. Термин «антитело» также охватывает без ограничения полностью человеческие антитела, химерные антитела, гуманизованные антитела, антитела с привитыми CDR и конструкции антител, такие как одноцепочечные Fv (scFv) или слитые с антителами белки.

«Одноцепочечные Fv» или «scFv» фрагменты антител имеют в контексте настоящего изобретения V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-домены антитела, причем эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Обычно полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-доменами, которые позволяют scFv образовывать требуемую структуру для связывания антигена. Методики, описанные для получения одноцепочечных антител, описаны, например, в Plückthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, N.Y. (1994), 269-315.

«Fab-фрагмент» в контексте настоящего документа состоит из одной легкой цепи и C<sub>H</sub>1 и переменных участков одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи.

«Fc»-участок содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие C<sub>H</sub>2- и C<sub>H</sub>3-домена антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и гидрофобными взаимодействиями C<sub>H</sub>3-доменов.

«Fab'-фрагмент» содержит одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, которая содержит V<sub>H</sub>-домен и C<sub>H</sub>1-домен, а также участок между C<sub>H</sub>1- и C<sub>H</sub>2-доменами, так чтобы

могла быть образована межцепочечная дисульфидная связь между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов с образованием молекулы F(ab')<sub>2</sub>.

«F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент» содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константного участка между C<sub>H</sub>1- и C<sub>H</sub>2-доменами, так чтобы между двумя тяжелыми цепями образовывалась межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент состоит из двух Fab'-фрагментов, которые удерживаются вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями.

«Fv-участок» содержит переменные участки как тяжелой, так и легкой цепей, но не имеет константных участков.

Антитела, конструкции антител, фрагменты антител, производные антител (все из которых являются производными Ig), которые подлежат использованию в соответствии с настоящим изобретением, или их одна или более соответствующих иммуноглобулиновых цепей можно дополнительно модифицировать с помощью традиционных методик, известных из уровня техники, например, с применением одной или более аминокислотных делеций, вставок, замен, добавлений и/или рекомбинаций и/или любых других модификаций, известных в настоящей области техники, в отдельности или в комбинации. Способы введения таких модификаций в последовательность ДНК, лежащую в основе аминокислотной последовательности иммуноглобулиновой цепи, хорошо известны специалисту в настоящей области техники; см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2-е издание (1989 года) и 3-е издание (2001 года). Термин «производный от Ig домен», в частности, относится к (поли)пептидным конструкциям, содержащим по меньшей мере один CDR. Фрагменты или производные указанных производных от Ig доменов определяют (поли)пептиды, которые являются частями вышеупомянутых молекул антител и/или которые модифицированы химическими/биохимическими или молекулярно-биологическими способами. Соответствующие способы известны из уровня техники и описаны, среди прочего, в лабораторных руководствах (см. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2-е издание (1989 года) и 3-е издание (2001 года); Gerhardt et al., *Methods for General and Molecular Bacteriology* ASM Press (1994); Lefkovits, *Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*; Academic Press (1997); Golemis, *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002)).

Термин «CDR» в контексте настоящего документа относится к «определяющему комплементарность участку», который хорошо известен в настоящей области техники. CDR являются частями иммуноглобулинов, которые определяют специфичность

указанных молекул и контактируют с конкретным лигандом. CDR являются наиболее вариабельной частью молекулы и вносят вклад в разнообразие данных молекул. В каждом V-домеене есть три CDR-участка: CDR1, CDR2 и CDR3. CDR-H представляет собой CDR-участок вариабельного участка тяжелой цепи, а CDR-L относится к CDR-участку вариабельного участка легкой цепи. VH означает вариабельный участок тяжелой цепи, а VL означает вариабельный участок легкой цепи. CDR-участки в производном от Ig участке можно определить так, как описано в Kabat “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5th edit. NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services (1991). Приведенные в настоящем документе последовательности CDR определены согласно Kabat. Тем не менее, специалисту в настоящей области техники будет понятно, что настоящее изобретение предназначено для охвата связывающих молекул, в которых последовательности CDR определены в соответствии с любой пригодной схемой выявления/нумерации. Например, для определения CDR на вооружение можно взять такие схемы нумерации, как Chothia (Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. Chothia C, Lesk AM. *J Mol Biol.* 1987 Aug 20; 196(4):901-17), IMGT (IMGT, международная база данных ImMunoGeneTics. Giudicelli V, Chaume D, Bodmer J, Müller W, Busin C, Marsh S, Bontrop R, Marc L, Malik A, Lefranc MP. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jan 1; 25(1):206-11 и Unique database numbering system for immunogenetic analysis. Lefranc MP. *Immunol Today.* 1997 Nov; 18(11):509), MacCallum (MacCallum RM, Martin AC, Thornton JM, *J Mol Biol.* 1996 Oct 11; 262(5):732-45), а также Martin (Abhinandan KR, Martin ACR. Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. *Mol Immunol.* (2008) 45:3832–9. 10.1016/j.molimm.2008.05.022).

Соответственно, в контексте настоящего изобретения описанная выше молекула антитела выбрана из группы, состоящей из полного антитела (иммуноглобулина, такого как IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgA1, IgGA2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgD или IgE), F(ab)-, Fab'-SH-, Fv-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, химерного антитела, антитела с привитым CDR, полностью человеческого антитела, двухвалентной конструкции антитела, слитого с антителом белка, синтетического антитела, двухвалентного одноцепочечного антитела, трехвалентного одноцепочечного антитела и поливалентного одноцепочечного антитела.

«Гуманизационные подходы» хорошо известны из уровня техники и, в частности, описаны для молекул антител, например, производных от Ig молекул. Термин «гуманизированное» относится к гуманизированным формам отличных от человеческих (например, мышиных) антител или их фрагментам (таким как Fv, Fab, Fab', F(ab)'), scFv или другим частичным антигенсвязывающим последовательностям антител), которые

содержат некоторую часть последовательности, производной от отличного от человеческого антитела. К гуманизированным антителам относятся человеческие иммуноглобулины, в которых остатки из определяющего комплементарность участка (CDR) человеческого иммуноглобулина заменены остатками из CDR отличного от человека вида, такого как мышь, крыса или кролик, обладающего требуемой специфичностью связывания, аффинностью и емкостью. В целом, гуманизированное антитело будет содержать практически все из по меньшей мере одного, а, как правило, двух переменных доменов, в которых все или практически все CDR-участки соответствуют таковым из иммуноглобулина отличного от человеческого происхождения, и все или практически все FR-участки являются таковыми из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело в оптимальном случае также будет содержать по меньшей мере часть константного участка (Fc) иммуноглобулина, обычно участка из человеческого иммуноглобулина; см., среди прочего, Jones et al., *Nature* 321 (1986),522-525, Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2 (1992),593-596. Способы гуманизации отличных от человеческих антител хорошо известны из уровня техники. Как правило, гуманизированное антитело имеет одну или более аминокислот, введенных в него из источника, который отличен от человеческого, но все еще сохраняет исходную связывающую активность антитела. Способы гуманизации антител/молекул антител более подробно описаны в Jones et al., *Nature* 321 (1986),522-525; Reichmann et al., *Nature* 332 (1988),323-327; и Verhoeven et al., *Science* 239 (1988),1534-1536. Конкретные примеры гуманизированных антител, например антитела, направленные против EpCAM, известны из уровня техники (см., например, LoBuglio, *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology Abstract* (1997), 1562 и Khor, *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology Abstract* (1997), 847).

Соответственно, в контексте настоящего изобретения представлены молекулы антител или их антигенсвязывающие фрагменты, которые являются гуманизированными и могут быть успешно использованы в фармацевтических композициях.

Специфичность антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может отражаться не только природой аминокислотной последовательности антитела или антигенсвязывающего фрагмента, как определено выше, но также эпитопом, с которым антитело способно связываться. Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к антителу к неправильно свернутому TDP-43 или его антигенсвязывающему фрагменту, которое распознает тот же эпитоп, что и антитело по настоящему изобретению.

Специалисту в настоящей области техники может быть понятно, что эпитопы

могут содержаться в белке TDP-43, но также могут содержаться в продукте его разложения или могут представлять собой химически синтезированный пептид. Аминокислотные положения указаны лишь для демонстрации положения соответствующей аминокислотной последовательности в последовательности белка TDP-43. Настоящее изобретение относится ко всем пептидам, содержащим данный эпитоп. Пептид может быть частью полипептида длиной более 100 аминокислот или может быть малым пептидом длиной менее 100, предпочтительно менее 50, более предпочтительно менее 25 аминокислот, еще более предпочтительно — менее 16 аминокислот. Аминокислоты такого пептида могут быть природными аминокислотами или неприродными аминокислотами (например, бета-аминокислотами, гамма-аминокислотами, D-аминокислотами) или их комбинацией. Дополнительно, настоящее изобретение может относиться к соответствующим ретро-инверсным пептидам эпитопов. Пептид может быть несвязанным или связанным. Он может быть связан, например, с малой молекулой (например, лекарственным средством или флуорофором), с высокомолекулярным полимером (например, полиэтиленгликолем (PEG), полиэтиленимином (PEI), гидроксипропилметакрилатом (HPMA) и т. д.) или с белком, жирной кислотой, сахарным фрагментом или может быть вставлен в мембрану.

Для того, чтобы протестировать, распознает ли рассматриваемое антитело и антитело по настоящему изобретению один и тот же эпитоп, можно провести следующее конкурентное исследование: инфицированные клетки Vero с 3 MOI (множественность инфекции) инкубируют спустя 20 часов с различными концентрациями рассматриваемого антитела в качестве конкурента в течение 1 часа. На второй стадии инкубации вносят антитело по настоящему изобретению в постоянной концентрации 100 нМ и детектируют его связывание с помощью проточно-цитометрического метода с применением меченого флуоресцентной меткой антитела к константным доменам антитела по настоящему изобретению. Связывание, которое происходит антипропорционально (обратно-пропорционально) концентрации рассматриваемого антитела, указывает на то, что оба антитела распознают один и тот же эпитоп. Тем не менее, из уровня техники известно много и других анализов, которые можно применять с данной целью.

Настоящее изобретение также относится к получению специфических антител к природным полипептидам и рекомбинантным полипептидам TDP-43. В основе такого получения лежит, например, иммунизация животных, таких как мыши. Тем не менее, в настоящем изобретении предусмотрены также и другие животные для получения антител/антисывороток. Например, моноклональные и поликлональные антитела могут продуцироваться кроликами, мышами, козами, ослами и т. п. Полинуклеотид, кодирующий

соответственно выбранный полипептид TDP-43, можно субклонировать в соответствующий вектор, причем рекомбинантный полипептид должен экспрессироваться в организме, способном к экспрессии, например, в бактериях. Так, экспрессируемый рекомбинантный белок можно ввести мышам внутрибрюшинно, а полученные специфические антитела можно, например, получить из сыворотки мышей, полученной путем внутрисердечной пункции крови. Настоящее изобретение также относится к получению специфических антител к природным полипептидам и рекомбинантным полипептидам с применением стратегии ДНК-вакцинации, как проиллюстрировано в прилагаемых примерах. Стратегии ДНК-вакцинации хорошо известны из уровня техники и охватывают опосредованную липосомами доставку, доставку с помощью генной пушки или струйной инъекции и внутримышечную или внутрикожную инъекцию. Таким образом, антитела к полипептиду, или белку, или эпитопу TDP-43, в частности эпитопу представленных в настоящем документе антител, можно получить путем непосредственной иммунизации животного путем непосредственной внутримышечной инъекции вектора, экспрессирующего требуемый полипептид, или белок, или эпитоп TDP-43, в частности эпитоп антител по настоящему изобретению, который находится в пределах аминокислотных остатков 181-195, 199-213, 307-321, 352-366, 389-411, 397-411 и 140-200 из SEQ ID NO: 1, более конкретно, эпитоп антител по настоящему изобретению, который находится в пределах аминокислотных остатков АК 183-188, 203-213, 204-208, 204-211, 205-210, 316-323, 358-361, 400-405, 400-406, 400-412 SEQ ID NO: 1. Количество полученного специфического антитела можно количественно оценить с помощью ELISA, который также описан в настоящем документе ниже. Дополнительные способы получения антител хорошо известны из уровня техники, см., например, Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988.

Таким образом, при определенных условиях анализа указанные антитела и соответствующий эпитоп TDP-43 связываются друг с другом и не связываются в значительном количестве с другими компонентами, присутствующими в образце. Для специфического связывания с целевым анализом в таких условиях может быть необходим связывающий фрагмент, который отобран по его специфичности для конкретного целевого анализа. Для отбора антител, специфически реактивных с конкретным антигеном, можно применять различные форматы иммуноанализа. Например, разновидности твердофазного иммуноферментного анализа ELISA обычно применяют для отбора моноклональных антител, специфически иммунореактивных с анализом. Для описания форматов и условий иммуноанализа, которые можно применять для определения специфической иммунореактивности, см. Shepherd and Dean (2000), *Monoclonal Antibodies: A Practical*



Approach, Oxford University Press, и/или Howard and Bethell. Чаще всего, специфическая или селективная реакция будет по меньшей мере в два раза превышать фоновый сигнал по сравнению с шумом и, еще чаще, более чем в 10-100 раз превышать фон. Специалист в настоящей области техники будет в силах предусмотреть и получить специфические связывающие молекулы к новым полипептидам. Что касается анализов специфического связывания, их можно легко использовать, чтобы избежать нежелательной перекрестной реактивности, например, поликлональные антитела можно без труда очистить и подвергнуть отбору с помощью известных способов (см. Shepherd and Dean, там же).

Термин «класс» антитела относится к типу константного домена или константного участка, которым обладает его тяжелая цепь. Есть пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно разделить на подклассы (изоотипы), например: IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, предусмотрены варианты аминокислотных последовательностей представленных в настоящем документе антител. Например, может быть необходимо улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела можно получить путем введения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. К таким модификациям относятся, например, делеции из, и/или вставки в, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для получения конечной конструкции можно произвести любую комбинацию делеции, вставки и замены при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например, антигенсвязывающими.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к вариантам антител, содержащим одну или более аминокислотных замен. К представляющим интерес сайтам для производящего замены мутагенеза относятся CDR и FR. Консервативные замены представлены в таблице 1 под заголовком «предпочтительные замены». Более существенные изменения представлены в таблице 1 под заголовком «иллюстративные замены» и дополнительно описаны ниже в отношении классов боковых цепей аминокислот. Аминокислотные замены можно ввести в представляющее интерес антитело, а продукты можно подвергнуть скринингу в отношении требуемой активности, например, сохранения/улучшения связывания антигена, снижения иммуногенности или увеличения ADCC или CDC.

ТАБЛИЦА 1

Исходный остаток	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Аминокислоты можно сгруппировать в соответствии с общими свойствами боковой цепи:

- (1) гидрофобные: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;

- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены повлекут за собой замену представителя одного из этих классов на представителя другого класса.

Один тип варианта с заменой предусматривает замену одного или более остатков гипервариабельного участка исходного антитела (например гуманизированное или человеческое антитело). Как правило, один или более полученных вариантов, отобранных для дальнейшего изучения, будут иметь модификации (например, улучшения) в определенных биологических свойствах (например, повышенную аффинность, пониженную иммуногенность) по сравнению с исходным антителом и/или в значительной степени сохраняют определенные биологические свойства исходного антитела. Иллюстративный вариант с заменой представляет собой антитело с созревшей аффинностью, которое без труда можно получить, например, с помощью методик созревания аффинности на основе фагового дисплея, таких как методики, описанные в настоящем документе. Вкратце: подвергают мутации один или более остатков CDR и подвергают скринингу варианты антитела, экспонированные на фаге, в отношении конкретной биологической активности (например, аффинности связывания).

Изменения (например, замены) можно произвести в CDR, например, для улучшения аффинности антител. Такие изменения можно выполнить в «горячих точках» CDR, т. е. по остаткам, кодируемым кодонами, которые подвергаются мутации с высокой частотой в процессе соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)) и/или SDR (а-CDR), при этом полученный вариант VH или VL тестируют в отношении аффинности связывания. Созревание аффинности путем конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек было описано, например, в Hoogenboom et al., in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) В соответствии с некоторыми вариантами осуществления созревания аффинности, в переменные гены, выбранные для созревания, разнообразие вносят с помощью любого из ряда способов (например, ПЦП с внесением ошибок, перетасовка цепей или олигонуклеотид-направленный мутагенез). Затем создают вторичную библиотеку. Затем библиотеку подвергают скринингу для выявления каких-либо вариантов антител с требуемой аффинностью. Другой способ введения разнообразия предусматривает направленные на CDR подходы, при которых рандомизации подвергают несколько остатков CDR (например, одновременно 4-6 остатков). Остатки CDR, задействованные в связывании антигена, можно, в частности, выявить, например, с помощью сканирующего аланином мутагенеза или моделирования. В частности, за цель

зачастую принимают CDR-H3 и CDR-L3.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, замены, вставки или делеции могут происходить в одной или более CDR, если такие изменения существенно не снижают способность антитела связывать антиген. Например, в CDR можно произвести консервативные изменения (например, консервативные замены, представленные в настоящем документе), которые существенно не снижают аффинность связывания. Такие изменения могут происходить за пределами «горячих точек» CDR или SDR. В соответствии с определенными вариантами осуществления вариантов последовательностей VH и VL, представленных выше, каждый CDR либо не изменен, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Пригодный способ выявления остатков или участков антитела, которые могут послужить целью для мутагенеза, называют «сканирующий аланином мутагенез», который описано у Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. В данном способе остаток или группу целевых остатков (например, такие заряженные остатки, как Arg, Asp, His, Lys и Glu) выявляют и заменяют на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту (например, аланин или полиаланин) с целью определения, затрагивается ли взаимодействие антитела с антигеном. В аминокислотные положения, демонстрирующие функциональную чувствительность к начальным заменам, можно ввести дополнительные замены. Альтернативно или дополнительно, для определения точек контакта между антителом и антигеном используют кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело. Такие контактирующие остатки и соседние остатки могут послужить мишенью или быть исключены как кандидаты на замену. Варианты можно подвергнуть скринингу для определения, содержат ли они требуемые свойства.

К вставкам аминокислотной последовательности относятся амино- и/или карбоксиконцевые слияния длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки одного или более аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком. К другим вариантам вставки у молекулы антитела относятся слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например для ADEPT) или полипептидом, который увеличивает время полужизни антитела в сыворотке.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, представленное в настоящем документе антитело изменяют с целью увеличения или уменьшения степени гликозилирования антитела. Добавление или удаление сайтов гликозилирования в антителе можно беспрепятственно осуществить путем изменения аминокислотной последовательности, так чтобы создавался или удалялся один или более сайтов

гликозилирования.

Если антитело содержит Fc-участок, то можно изменить присоединяемый к нему углевод. Природные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный двухантенарный олигосахарид, который обычно присоединен N-связью к Asn297 в CH2-домене Fc-участка. См., например, Wright et al., *TIBTECH* 15:26-32 (1997). К олигосахариду можно отнести различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в «стволе» двухантенарной олигосахаридной структуры. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в антителе по настоящему изобретению можно произвести модификации олигосахаридной структуры для создания вариантов антител с определенными улучшенными свойствами.

В соответствии с одним вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к вариантам антител, имеющим углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или косвенно) к Fc-участку. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Количество фукозы определяют путем расчета среднего количества фукозы в сахарной цепи в Asn297 относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, сложных, гибридных и высокоманнозных структур) по результатам измерений с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному приблизительно в положении 297 в Fc-участке (Eu-нумерация остатков Fc-участка; см. Edelman, G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969)); однако Asn297 также может быть расположен приблизительно на  $\pm 3$  аминокислоты выше или ниже положения 297, т. е. между положениями 294 и 300, из-за незначительных различий последовательности в антителах. Такие варианты фукозилирования могут обладать улучшенной ADCC-функцией. См., например, патентные публикации США №№ US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «дефицитным по фукозе» вариантам антител, включают: US 2003/0157108, WO 2000/61739, WO 2001/29246, US 2003/0115614, US 2002/0164328, US 2004/0093621, US 2004/0132140, US 2004/0110704, US 2004/0110282, US 2004/0109865, WO 2003/085119, WO 2003/084570, WO 2005/035586, WO 2005/035778, WO 2005/053742, WO 2002/031140; Okazaki et al., *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Примеры линий клеток, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают клетки CHO Lec13, дефицитные по фукозилированию белка (Ripka et al., *Arch.*

*Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, особенно в примере 11), и нокаутные линии клеток, такие как нокаутные по гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы, *FUT8*, клетки CHO (см., например, Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 94 (4):680-688 (2006); и WO 2003/085107).

Варианты антител дополнительно снабжены разделенными пополам олигосахаридами, например, в которых двухантенный олигосахарид, присоединенный к Fc-участку антитела, разделен пополам посредством GlcNAc. Такие варианты антител могут обладать сниженным фукозилированием и/или улучшенной ADCC-функцией. Примеры таких вариантов антител описаны, например в WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); патенте США № 6602684 (Umana *et al.*); и US 2005/0123546 (Umana *et al.*). Также настоящее изобретение относится к вариантам антител по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-участку. Такие варианты антител могут обладать улучшенной CDC-функцией. Такие варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); и WO 1999/22764 (Raju, S.).

В соответствии с определенными вариантами осуществления, в Fc-участок антитела, представленного в настоящем документе, можно ввести одну или более аминокислотных модификаций, тем самым получив вариант Fc-участка. Вариант Fc-участка может содержать человеческую последовательность Fc-участка, (например, человеческий Fc-участок IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или более аминокислотных положениях.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к варианту антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его желательным кандидатом для применений, в которых важен период полужизни антитела *in vivo*, а определенные эффекторные функции (такие как активация системы комплемента и ADCC) не нужны или вредны. Для подтверждения снижения/истощения CDC- и/или ADCC-активности можно провести *in vitro* и/или *in vivo* анализы цитотоксичности. Например, можно провести анализы связывания Fc-рецептора (FcR), чтобы убедиться, что антитело лишено связывания с FcγR (следовательно, вероятно, не обладает ADCC-активностью), но сохраняет способность связывания с FcRn. Первичные клетки, опосредующие ADCC, т. е. NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты и макроглия экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках кратко описана в таблице 3 на странице 464 публикации Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Неограничивающие примеры *in vitro* анализов для оценки ADCC-активности

представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5500362. (см., например, Hellstrom, I. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499- 1502 (1985); 5821337 (см. Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)).

Альтернативно, можно использовать нерадиоактивные способы анализа (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТП™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc., Маунтин-Вью, Калифорния; и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, Мэдисон, Висконсин). К подходящим эффекторным клеткам для таких анализов относятся мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и натуральные клетки-киллеры (NK).

Альтернативно или дополнительно, ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценить *in vivo*, например, на животной модели, такой как раскрытая в публикации Clynes et al., *Proc. Nat'l Acad. sci. USA* 95:652-656 (1998). Для подтверждения того, что антитело неспособно связывать C1q и, следовательно, не обладает CDC-активностью, также можно провести анализы связывания с C1q. См., например, ELISA на связывание C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента можно провести анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); и Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Также с помощью способов, известных из уровня техники, можно осуществить анализы связывания с FcRn и *in vivo* определение клиренса/периода полужизни (см., например, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

К антителам с пониженной эффекторной функцией относятся антитела с заменой в Fc-участке одного или более остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (патент США № 6737056). К таким Fc-мутантам относятся Fc-мутанты с заменами в двух или более аминокислотных положениях 265, 269, 270, 297 и 327, в том числе так называемый Fc-мутант «DANA» с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7332581). Альтернативно, к антителам с пониженной эффекторной функцией относятся антитела с заменой в Fc-участке одного или более остатков 234, 235 и 329, так называемый Fc-мутант «PG-LALA» с заменой остатков 234 и 235 на аланин и 329 на глицин (Lo, M. et al., *Journal of Biochemistry*, 292, 3900-3908).

Описаны некоторые варианты антител с увеличенным или уменьшенным связыванием с FcR. (См., например, патент США № 6737056; WO 2004/056312 и Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

В соответствии с определенными вариантами осуществления, вариант антитела

содержит Fc-участок с одной или более аминокислотными заменами, которые улучшают ADCC, например, замены в Fc-участке в положениях 298, 333 и/или 334 (EU-нумерация остатков).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в Fc-участок вносят изменения, которые приводят к изменению (т. е. либо увеличению, либо уменьшению) связывания с C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в патентах США № 6194551, WO 99/51642 и Idusogie et al., *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Антитела с увеличенным периодом полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который отвечает за передачу материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) и Kirn et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), описаны в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Эти антитела содержат Fc-участок с одной или более заменами в нем, которые улучшают связывание Fc-участка с FcRn. К таким вариантам Fc относятся варианты с заменами в одном или более остатках Fc-участка: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, замена остатка 434 Fc-участка (патент США № 7371826). См. также Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); патент США № 5648260, патент США № 5624821 и WO 94/29351, в которых рассмотрены другие примеры вариантов Fc-участков.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, может быть необходимо получить антитела со встроенными методами инженерии цистеином, например, «тиоMAb», в которых один или более остатков антитела заменены остатками цистеина. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, заменяемые остатки находятся в доступных сайтах антитела. Путем замены этих остатков на цистеин реакционноспособные тиоловые группы тем самым размещаются в доступных сайтах антитела и могут быть использованы для конъюгирования антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты лекарственного средства или фрагменты линкер-лекарственное средство, с получением иммуноконъюгата, как описано далее в настоящем документе. В соответствии с определенными вариантами осуществления, цистеином можно заменить любой один или более из следующих остатков: V205 (нумерация по Kabat) легкой цепи; A118 (EU-нумерация) тяжелой цепи; и S400 (EU-нумерация) Fc-участка тяжелой цепи. Антитела со встроенными методами инженерии цистеином можно получить так, как описано, например, в патенте США № 7521541.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, представленное в настоящем документе антитело можно дополнительно модифицировать так, чтобы оно



содержало дополнительные небелковые фрагменты, которые известны в настоящей области техники и легко доступны. К фрагментам, подходящим для дериватизации антитела, относятся без ограничения водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают без ограничения полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена и малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры пролипропиленоксида и этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Пропиональдегид полиэтиленгликоля может обеспечивать определенные преимущества при производстве из-за его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьировать, и если присоединено более одного полимера, они могут быть одинаковыми или разными молекулами. В целом, количество и/или тип применяемых для дериватизации полимеров можно определить, исходя из ряда подлежащих учету факторов, в том числе без ограничения, конкретных подлежащих улучшению свойств или функций антитела, будет ли производное антитела применяться в терапии при определенных условиях и т. д.

В соответствии с другим вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к конъюгатам антитела и небелкового фрагмента, которые можно избирательно нагревать под воздействием излучения. В соответствии с одним вариантом осуществления, небелковый фрагмент представляет собой углеродную нанотрубку (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). Излучение может характеризоваться любой длиной волны и включает без ограничения длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но нагревают небелковый фрагмент до температуры, при которой гибнут клетки, наиболее близкие к конъюгату антитела и небелкового фрагмента.

Антитела можно получить с применением рекомбинантных способов и композиций, например, так, как описано в патенте США № 4816567. В соответствии с одним вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело к неправильно свернутому TDP-43, описываемому в настоящем документе. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную

последовательность, содержащую VH антитела (например, легкие и/или тяжелые цепи антитела). В соответствии с дополнительным вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к одному или более векторам (например, векторам экспрессии), содержащим такую нуклеиновую кислоту. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей такую нуклеиновую кислоту. В соответствии с одним таким вариантом осуществления, клетка-хозяин содержит следующее (например, была трансформирована посредством этого): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В соответствии с одним вариантом осуществления, клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, YO, NSO, Sp20). В соответствии с одним вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к способу получения антитела к неправильно свернутому TDP-43, причем способ предусматривает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую указанное выше антитело, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и необязательно выделение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев).

Для рекомбинантного получения антитела к неправильно свернутому TDP-43 нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, которое описано выше, выделяют и вставляют в один или более векторов для последующего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине или в бесклеточной системе экспрессии. Такую нуклеиновую кислоту можно легко выделить и секвенировать с применением традиционных процедур (например, с применением олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела).

К подходящим клеткам-хозяевам для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, относятся описанные в настоящем документе прокариотические или эукариотические клетки. Например, антитела могут продуцироваться в бактериях, в частности, если нет необходимости в гликозилировании и эффекторной функции Fc. По поводу экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, патенты США №№ 5648237, 5789199 и 5840523. (См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, в которых

описана экспрессия фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии антитело можно выделить из биомассы бактериальных клеток в растворимой фракции и можно подвергнуть дополнительной очистке.

Помимо прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, являются эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, в том числе штаммы грибов и дрожжей, чьи пути гликозилирования были «гуманизированы», что привело в результате к продуцированию антител с частично или полностью человеческим паттерном гликозилирования. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела также могут происходить от многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Было выявлено множество штаммов бакуловирусов, которые можно применять в сочетании с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

В качестве хозяев также можно использовать культуры клеток растений. См., например, патенты США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (в которых описана технология PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

В качестве хозяев также можно использовать клетки позвоночных. Например, могут быть пригодны линии клеток млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другими примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почек макака, трансформированная посредством SV40 (COS-7); линия эмбриональных клеток почки человека (клетки 293 или просто 293, которые описаны, например, в Graham et al., *J. Gen. Viral.* 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомячка (ВНК); клетки сертоли мышши (клетки ТМ4, которые описаны, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки макака (CV 1); клетки почки африканского зеленого макака (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HeLa); клетки почки собаки (MDCK; клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мышши (MMT 060562); клетки TRI, которые описаны, например, в Mather et al., *Annals N. Y Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5; и клетки FS4. К другим пригодным линиям клеток-хозяев млекопитающих относятся клетки яичника китайского хомячка (CHO), в том числе клетки CHO DHFR (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и линии миеломных клеток, такие как YO, NSO и Sp2/0. По поводу обзора определенных линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продуцирования антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol.

248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Способы получения связывающей TDP-43 молекулы по настоящему изобретению, в частности антитела, могут предусматривать следующие стадии:

- a. культивирование подходящей клетки-хозяина или бесклеточной системы экспрессии в условиях, подходящих для получения связывающей молекулы, в частности антитела; и
- b. выделение связывающей молекулы, в частности антитела. Пригодные способы культивирования и выделения доступны специалисту в настоящей области техники.

Представленные в настоящем документе антитела к TDP-43 можно выявить, подвергнуть скринингу или охарактеризовать по их физическим/химическим свойствам и/или биологической активности с помощью различных анализов, известных из уровня техники.

В соответствии с одним аспектом, антитело по настоящему изобретению тестируют на его антигенсвязывающую активность, например, с помощью известных способов, таких как ELISA, BIAcore®, FACS, иммунофлуоресценция или иммуногистохимия.

В соответствии с другим аспектом можно применять конкурентные анализы для выявления антитела, которое конкурирует с любым из описываемых в настоящем документе антител за связывание с TDP-43. В соответствии с определенными вариантами осуществления, такое конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается описываемое в настоящем документе антитело. Подробные иллюстративные способы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," в *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

В иллюстративном конкурентном анализе иммобилизованный TDP-43 инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с TDP-43 (например, любое из описанных в настоящем документе антител), и второе немеченое антитело, которое тестируют на его способность конкурировать с первым антителом за связывание с TDP-43. В качестве контроля иммобилизованный TDP-43 инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, допускающих связывание первого антитела с TDP-43, удаляют избыток несвязавшегося антитела и измеряют количество метки, связанной с иммобилизованным TDP-43. Если количество метки, связанной с иммобилизованным TDP-43, существенно снижено в тестируемом образце по

сравнению с контрольным образцом, то это указывает на то, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с TDP-43. См. Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Настоящее изобретение также относится к иммуноконъюгатам, содержащим представленное в настоящем документе антитело к TDP-43, конъюгированное с одним или более терапевтическими средствами, такими как химиотерапевтические средства или лекарственные средства, ингибирующие рост средства, токсины (например, белковые токсины, ферментативно активные токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или их фрагменты), радиоактивные изотопы (т. е. радиоконъюгат), фрагменты, проникающие через гематоэнцефалический барьер, или детектируемые метки.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к изделию, содержащему материалы, пригодные для лечения, предупреждения и/или диагностики заболеваний, расстройств, нарушений, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43, которые описаны выше. Изделие включает емкость и этикетку или листок-вкладыш на емкости или в связи с ней. К подходящим емкостям относятся, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты для внутривенного (IV) раствора и т. д. Емкости могут быть выполнены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Емкость содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией, эффективна для лечения, предупреждения и/или диагностики патологического состояния, и может иметь стерильное впускное отверстие (например, емкость может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, которую можно пробить иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере одно активное средство в композиции представляет собой антитело по настоящему изобретению. На этикетке или вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного патологического состояния. Более того, изделие может содержать (a) первую емкость с содержащейся в ней композицией, причем композиция содержит антитело по настоящему изобретению; и (b) вторую емкость с содержащейся в ней композицией, причем композиция содержит дополнительное терапевтическое средство. Изделие, в соответствии с данным вариантом осуществления настоящего изобретения, может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, на котором указано, что композиции можно применять для лечения конкретного патологического состояния. В качестве альтернативы или дополнения, изделие может дополнительно содержать вторую (или третью) емкость, содержащую

фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно включать и другие материалы, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Понятно, что любое из вышеуказанных изделий вместо или в дополнение к антителу к TDP-43 может включать иммуноконъюгат по настоящему изобретению.

## **XI. ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕ TDP-43 МОЛЕКУЛЫ ИЛИ АНТИТЕЛА К TDP-43**

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, антитело содержит:

- a) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность ES (Glu-Ser); VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17; или
- b) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность ES (Glu-Ser); VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27; или
- c) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37; или
- d) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под



SEQ ID NO: 122; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 123; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 125; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 127; или

j) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 141; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 142; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 143; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 146; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 147; или

k) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 151; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 152; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 153; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 155; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 156; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит:

- a. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 10, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 14; или
- b. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 20, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 24; или
- c. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 30, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 34; или
- d. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 40, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 44; или
- e. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 60, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 64; или



- f. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 70, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 74; или
- g. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 80, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 84; или
- h. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 100, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 104; или
- i. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 120, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 124; или
- j. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 140, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 144; или
- k. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 150, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 154.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит:

- a. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 10, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 14, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14; или
- b. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 20, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 20; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 24, или переменный участок легкой

цепи (VL), имеющий по меньшей мере 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; или

c. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 30, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 34, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34; или

d. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 40, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 40; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 44; или

e. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 60, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 64, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 64; или

f. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 70, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 70; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 74, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 99%

идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 74; или

g. вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 80, или вариабельный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 80; и вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 84, или вариабельный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 84; или

h. вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 100, или вариабельный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 100; и вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 104, или вариабельный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 104; или

i. вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 120, или вариабельный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 120; и вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 124, или вариабельный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 124; или

j. вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 140, или вариабельный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 140; и вариабельный участок легкой

цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 144; или

k. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 150, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 150; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 154, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 154.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителу, полученному из клонов гибридомы 631B2A2, 633B12C8, 634H10H7, 636E5B8, 641H1E7, 642A10B11, 642D12B4, 646B7F7, 712A6B10, 809D9C2 или 809F12D8, как описано далее в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителу, выбранному из ACI-7069-631B2-Ab1, ACI-7069-633B12-Ab1, ACI-7069-634H10-Ab2, ACI-7069-636E5-Ab1, ACI-7069-641H1- Ab2, ACI-7069-642A10-Ab1, ACI-7069-642D12-Ab1, ACI-7069-646B7-Ab1, ACI-7071-712A6-Ab1, ACI-7071-809D9-Ab2 и ACI-7071-809F12-Ab1, как описано далее в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота кодирует описанное в настоящем документе антитело.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 18, кодирующую антитело к TPD-43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 19, кодирующую антитело к TPD-43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 28, кодирующую антитело к TPD-43.



кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 79, кодирующую антитело к TPD-43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 88, кодирующую антитело к TPD-43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 89, кодирующую антитело к TPD-43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 108, кодирующую антитело к TPD-43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 109, кодирующую антитело к TPD-43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 128, кодирующую антитело к TPD-43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 129, кодирующую антитело к TPD-43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 148, кодирующую антитело к TPD-43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 149, кодирующую антитело к TPD-43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 158, кодирующую антитело к TDP-43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к (выделенной) нуклеиновой кислоте, причем (выделенная) нуклеиновая кислота содержит последовательность под SEQ ID NO: 159, кодирующую антитело к TDP-43.

## **ХII. СОСТАВЫ И СПОСОБЫ**

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к иммуноконъюгату, причем иммуноконъюгат содержит описанное в настоящем документе (выделенное) антитело и терапевтическое средство. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к меченому антителу, содержащему описанное в настоящем документе антитело и детектируемую метку.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей описанное в настоящем документе (выделенное) антитело и фармацевтически приемлемый носитель.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающая TDP-43 молекула по настоящему изобретению связана с детектируемой меткой.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающая TDP-43 молекула является частью иммуноконъюгата, причем специфически связывающая TDP-43 молекула ковалентно связана с другим подходящим терапевтическим средством.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающая TDP-43 молекула или содержащий ее иммуноконъюгат представлены в виде композиции, содержащей специфически связывающую TDP-43 молекулу и агонисты TDP-43 и когнатные молекулы или, альтернативно, их антагонисты.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающая TDP-43 молекула является частью фармацевтической композиции, содержащей специфически связывающую TDP-43 молекулу или иммуноконъюгат, причем специфически связывающая TDP-43 молекула ковалентно связана с другим подходящим терапевтическим средством, или композиции, содержащей специфически связывающую

TDP-43 молекулу и агонисты TDP-43 и когнатные молекулы или, альтернативно, их антагонисты, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающая TDP-43 молекула является частью набора для детекции и/или диагностики, содержащей специфически связывающую TDP-43 молекулу или иммуноконъюгат, причем специфически связывающая TDP-43 молекула ковалентно связана с другим подходящим терапевтическим средством, или композиции, содержащей специфически связывающую TDP-43 молекулы и агонисты TDP-43 и когнатные молекулы или, альтернативно, их антагонисты.

Также настоящее изобретение относится к наборам, содержащим связывающие молекулы по настоящему изобретению. В частности, такие наборы могут быть пригодны для осуществления диагностических способов по настоящему изобретению (к которым относятся способы классификации, отслеживания и выбора терапии). Таким образом, настоящее изобретение относится к набору для диагностики заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43 или для применения в способе по настоящему изобретению, предусматривающем применение специфически связывающей TDP-43 молекулы по настоящему изобретению. Такие наборы могут содержать все необходимые компоненты для осуществления представленных в настоящем документе способов. Как правило, каждый компонент хранится отдельно в единой общей упаковке. Подходящими дополнительными компонентами для включения в наборы являются, например, буферы, детектируемые красители, лабораторное оборудование, реакционные емкости, инструкции и т. п. Инструкции по применению можно адаптировать к конкретному способу, для которого будут использовать набор. Также настоящее изобретение относится к меченым соответствующим образом связывающим TDP-43 молекулам по настоящему изобретению, которые могут быть включены в такие наборы.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающую TDP-43 молекулу применяют в иммунодиагностическом способе для применения в предупреждении, диагностике или лечении протеинопатии TDP-43.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающая TDP-43 молекула является частью иммунотерапевтического способа предупреждения или лечения протеинопатии TDP-43, при котором нуждающемуся в том субъекту вводят эффективное количество специфически связывающей TDP-43 молекулы или иммуноконъюгата, причем специфически связывающая TDP-43 молекула ковалентно связана с другим подходящим терапевтическим средством, или композиции, содержащей



специфически связывающую TDP-43 молекулу и агонисты TDP-43 и когнатные молекулы или, альтернативно, их антагонисты.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающую TDP-43 молекулу или иммуноконъюгат, причем специфически связывающая TDP-43 молекула ковалентно связана с другим подходящим терапевтическим средством, или композицию, содержащую специфически связывающую TDP-43 молекулу и агонисты TDP-43 и когнатные молекулы или, альтернативно, их антагонисты, вводят нуждающемуся в том субъекту и применяют для диагностики, предупреждения, облегчения или лечения заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43, в том числе без ограничения лобно-височной деменции (FTD), бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ) и связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающую TDP-43 молекулу или иммуноконъюгат, причем специфически связывающая TDP-43 молекула ковалентно связана с другим подходящим терапевтическим средством, или композицию, содержащую специфически связывающую TDP-43 молекулу и агонисты TDP-43 и когнатные молекулы или, альтернативно, их антагонисты, вводят нуждающемуся в том субъекту и применяют в способе диагностики или отслеживания заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43, которые выбраны из лобно-височной деменции (FTD, такой как спорадическая или семейная с или без заболевания двигательных нейронов (MND), с мутацией програнулина (GRN), с мутациями C9orf72, с мутацией TARDBP, с мутацией валозин-содержащего белка (VCP), связанная с хромосомой 9p, кортикобазальная дегенерация, лобно-височная лобарная дегенерация (FTLD) с убиквитин-положительными включениями TDP-43 (FTLD-TDP), болезнь аргирофильного зерна, болезнь Пика, семантический вариант первичной прогрессирующей афазии (svPPA), поведенческий вариант FTD (bvFTD), не затрагивающий беглость речи вариант прогрессирующей афазии (nfvPPA) и др.), бокового амиотрофического склероза (ALS, такого как спорадический ALS, с мутацией TARDBP, с мутацией ангиогенина (ANG)), болезни Александра (AxD), связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE), хронической травматической энцефалопатии, синдрома Перри, болезни Альцгеймера (AD, в том числе спорадических и семейных форм AD), синдрома Дауна,

семейной британской деменции, полиглутаминовых заболеваний (болезни Хантингтона и спинально-церебеллярной атаксии 3-го типа (SCA3; также известной под названием болезнь Мачадо-Джозефа)), деменции с гиппокампальным склерозом и миопатий (спорадического миозита с тельцами включения, миопатии с тельцами включения с мутацией валозин-содержащего белка (VCP; также называемой болезнью Педжета костей и лобно-височной деменцией), окулофарингеальной мышечной дистрофии с окаймленными вакуолями, миофибриллярных миопатий с мутациями в гене миотилина (MYOT) или с мутациями в гене, кодирующем десмин (DES)), травмы головного мозга (TBI), деменции с тельцами Леви (DLB) или болезни Паркинсона (PD).

В соответствии с другим вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к любым способам детекции, диагностики или отслеживания заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43, которые выбраны из лобно-височной деменции (FTD), бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ) и связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE).

Предпочтительно, заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, в частности связанные с агрегатами TDP-43, или протеинопатия TDP-43 выбраны из амиотрофического бокового склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD) или лобно-височной деменции (FTD). Более предпочтительно, заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, в частности связанные с агрегатами TDP-43, или протеинопатия TDP-43 представляют собой боковой амиотрофический склероз (ALS). Более предпочтительно, заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, в частности связанные с агрегатами TDP-43, или протеинопатия TDP-43, представляют собой болезнь Альцгеймера (AD). Более предпочтительно, заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, в частности связанные с агрегатами TDP-43, или протеинопатия TDP-43, представляют собой лобно-височную деменцию (FTD).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающую TDP-43 молекулу применяют в способе диагностики пресимптоматического заболевания, или для отслеживания прогрессирования заболевания и терапевтической эффективности, или для прогнозирования способности дать ответ, или для отбора субъектов, которые, вполне вероятно, будут отвечать на лечение с помощью специфически связывающей TDP-43 молекулы. Указанный способ предпочтительно осуществляют с применением образца крови или мочи человека. Наиболее

предпочтительно, способ предусматривает анализ на основе ELISA или анализ с адаптированной поверхностью.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающую TDP-43 молекулу применяют в способе, который предусматривает, что специфически связывающую TDP-43 молекулу по настоящему изобретению вводят в контакт с образцом (например, крови, спинномозговой жидкости или ткани мозга) для детектирования, диагностики или отслеживания лобно-височной дегенерации (FTD) или бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD), хронической травматической энцефалопатии, синдрома Перри, связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE) и/или болезни Паркинсона (PD).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающую TDP-43 молекулу применяют в способе, который предусматривает, что специфически связывающую TDP-43 молекулу по настоящему изобретению вводят в контакт с образцом (например, крови, спинномозговой жидкости или ткани мозга) для детектирования, диагностики или отслеживания заболевания, выбранного из лобно-височной деменции (FTD, такой как спорадическая или семейная с или без заболевания двигательных нейронов (MND), с мутацией програнулина (GRN), с мутациями C9orf72, с мутацией TARDBP, с мутацией валозин-содержащего белка (VCP), связанная с хромосомой 9p, кортикобазальная дегенерация, лобно-височная лобарная дегенерация (FTLD) с убиквитин-положительными включениями TDP-43 (FTLD-TDP), болезнь аргирофильного зерна, болезнь Пика, семантический вариант первичной прогрессирующей афазии (svPPA), поведенческий вариант FTD (bvFTD), не затрагивающий беглость речи вариант прогрессирующей афазии (nfvPPA) и др.), бокового амиотрофического склероза (ALS, такого как спорадический ALS, с мутацией TARDBP, с мутацией ангиогенина (ANG)), болезни Александера (AxD), связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE), хронической травматической энцефалопатии, синдрома Перри, болезни Альцгеймера (AD, в том числе спорадических и семейных форм AD), синдрома Дауна, семейной британской деменции, полиглутаминовых заболеваний (болезни Хантингтона и спинально-церебеллярной атаксии 3-го типа (SCA3; также известной под названием болезнь Мачадо-Джозефа)), деменции с гиппокампальным склерозом и миопатий (спорадического миозита с тельцами включения, миопатии с тельцами включения с мутацией валозин-содержащего белка (VCP; также называемой болезнью Педжета костей и лобно-височной деменцией), окулофарингеальной мышечной дистрофии с

окаймленными вакуолями, миофибриллярных миопатий с мутациями в гене миотилина (MYOT) или с мутациями в гене, кодирующем десмин (DES)), травмы головного мозга (TBI), деменции с тельцами Леви (DLB) или болезни Паркинсона (PD).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающую TDP-43 молекулу или иммуноконъюгат, причем специфически связывающая TDP-43 молекула ковалентно связана с другим подходящим терапевтическим средством, или композицию, содержащую специфически связывающую TDP-43 молекулу и агонисты TDP-43 и когнатные молекулы или, альтернативно, их антагонисты, вводят нуждающемуся в том субъекту и применяют для предупреждения, облегчения или лечения заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатий TDP-43, или лобно-височной дегенерации (FTD), или бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD, в том числе спорадических и семейных форм AD), хронической травматической энцелопатии, синдрома Перри и связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE) и/или болезни Паркинсона (PD).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, нуждающемуся в том субъекту вводят специфически связывающую TDP-43 молекулу или иммуноконъюгат, причем специфически связывающая TDP-43 молекула ковалентно связана с другим подходящим терапевтическим средством, или композицию, содержащую специфически связывающую TDP-43 молекулу, и агонисты TDP-43, и когнатные молекулы или, альтернативно, их антагонисты, и применяют для лечения заболевания, выбранного из: лобно-височной деменции (FTD, такой как спорадическая или семейная с или без заболевания двигательных нейронов (MND), с мутацией програнулина (GRN), с мутациями C9orf72, с мутацией TARDBP, с мутацией валозин-содержащего белка (VCP), связанная с хромосомой 9p, кортикобазальная дегенерация, лобно-височная лобарная дегенерация (FTLD) с убиквитин-положительными включениями TDP-43 (FTLD-TDP), болезнь аргирофильного зерна, болезнь Пика, семантический вариант первичной прогрессирующей афазии (svPPA), поведенческий вариант FTD (bvFTD), не затрагивающий беглость речи вариант прогрессирующей афазии (nfvPPA) и др.), бокового амиотрофического склероза (ALS, такого как спорадический ALS, с мутацией TARDBP, с мутацией ангиогенина (ANG)), болезни Александра (AxD), связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE), хронической травматической энцелопатии, синдроме Перри, болезни Альцгеймера (AD, в том числе спорадических и семейных формах AD), синдрома Дауна,

семейной британской деменции, полиглутаминовых заболеваний (болезни Хантингтона и спинально-церебеллярной атаксии 3-го типа (SCA3; также известной как болезнь Мачадо-Джозефа)), деменции с гиппокампальным склерозом и миопатий (спорадического миозита с тельцами включения, миопатии с тельцами включения с мутацией валозин-содержащего белка (VCP; также называемая болезнью Педжета костей и лобно-височной деменцией), окулофарингеальной мышечной дистрофии с окаймленными вакуолями, миофибриллярных миопатий с мутациями в гене миотилина (MYOT) или с мутациями в гене, кодирующем десмин (DES)), травмы головного мозга (TBI), деменции с тельцами Леви (DLB) или болезни Паркинсона (PD). Предпочтительно, указанное лечение заболевания помогает сохранить или повысить умственное распознавание и/или снизить уровень агрегатов TDP-43 в головном мозге.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специфически связывающую TDP-43 молекулу или иммуноконъюгат, причем специфически связывающая TDP-43 молекула ковалентно связана с другим подходящим терапевтическим средством, или композицию, содержащую специфически связывающую TDP-43 молекулу и агонисты TDP-43 и когнатные молекулы или, альтернативно, их антагонисты, вводят нуждающемуся в том субъекту и применяют для производства лекарственного препарата для лечения заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатий TDP-43, или лобно-височной дегенерации (FTD), или бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD, в том числе спорадических и семейных форм AD), хронической травматической энцефалопатии, синдрома Перри и связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE) и/или болезни Паркинсона (PD).

Фармацевтические составы с антителом к TDP-43 (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгата, которые описаны в настоящем документе, получают путем смешивания такого антитела или иммуноконъюгата, обладающего требуемой степенью чистоты, с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для принимающих их пациентов в используемых дозировках и концентрациях, и к ним относятся без ограничения буферы, такие как фосфатный, цитратный и на основе других органических кислот; антиоксиданты, в том числе аскорбиновая кислота и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония;

хлорид бензалкония; хлорид бензетония; феноловый, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкоза, манноза или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например белковые комплексы с Zn); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG). Примеры фармацевтически приемлемых носителей в настоящем документе дополнительно включают средства, диспергирующие лекарственные средства, такие как растворимые нейтрально-активные гиалуронидазные гликопротеины (sHASEGP), например, человеческие растворимые гиалуронидазные гликопротеины PH-20, такие как rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Некоторые иллюстративные sHASEGP и способы их применения, в том числе rHuPH20, описаны в патентных публикациях США № 2005/0260186 и № 2006/0104968. В соответствии с одним аспектом sHASEGP комбинируют с одной или более дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

Иллюстративные составы с лиофилизированными антителами или иммуноконъюгатами описаны в патенте США № 6267958. К водным составам с антителами или иммуноконъюгатам относятся описанные в патенте США № 6171586 и в WO 2006/044908, причем последние составы включают гистидин-ацетатный буфер.

Описываемый в настоящем документе состав также может содержать более одного активного ингредиента, если это необходимо для конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно ингредиенты с дополняющими активностями, которые не оказывают отрицательного воздействия друг на друга.

Активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, методиками коацервации или межфазной полимеризацией, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и полиметилметацилатные микрокапсулы соответственно в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие методики раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Можно приготовить препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело или иммуноконъюгат, причем эти матрицы представлены в форме изделий определенной формы, например, пленки или микрокапсулы. Составы, подлежащие применению для *in vivo* введения, как правило, являются стерильными. Стерильности можно легко достичь, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Любую из антигенсвязывающих молекул, антител к TDP-43 или иммуноконъюгатов, представленных в настоящем документе, можно применять в способах, например терапевтических способах.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к антителу к TDP-43 (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгату для применения в качестве лекарственного препарата. В соответствии с дополнительными аспектами, настоящее изобретение относится к неправильно свернутому антителу к TDP-43 (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгату для применения в способе лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителу к TDP-43 (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгату для применения в предупреждении, диагностике и/или лечении протеинопатии TDP-43. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, антитело к TDP-43 (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгат предназначены для применения при предупреждении, диагностике и/или лечении заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43, в том числе без ограничения лобно-височной деменции (FTD), бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ) и связанной с TDP-43 возрастной энцефалопатии с преимущественным поражением лимбической системы (LATE).

В соответствии с дополнительным аспектом, настоящее изобретение относится к применению антитела к TDP-43 (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгата при производстве или приготовлении лекарственного препарата. В соответствии с одним таким вариантом осуществления, способ дополнительно предусматривает введение индивидууму эффективного количества

по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, например, которое описано ниже.

«Субъект» или «индивидуум» согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления может быть животным, млекопитающим, предпочтительно человеком.

В соответствии с дополнительным аспектом, настоящее изобретение относится к фармацевтическим составам, содержащим любое из антител к TDP-43 (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгата, представленных в настоящем документе, например, для применения в любом из вышеуказанных терапевтических способов. В соответствии с одним вариантом осуществления, фармацевтический состав содержит любое из антител к TDP-43 (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгатов, представленных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В соответствии с другим вариантом осуществления, фармацевтический состав содержит любое из антител к TDP-43 (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгатов, представленных в настоящем документе, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, которое описано ниже.

Антитела или иммуноконъюгаты по настоящему изобретению можно применять отдельно или в комбинации с другими средствами в терапии. Например, антитело (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгат по настоящему изобретению можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством.

Такие вышеупомянутые комбинированные способы терапии охватывают комбинированное введение (когда два или более терапевтических средства включены в один и тот же или отдельные составы) и раздельное введение, в этом случае введение антитела (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгата по настоящему изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта. Антитела (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгаты по настоящему изобретению также можно применять в комбинации с лучевой терапией.

Антитело (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгат по настоящему изобретению (и любое дополнительное терапевтическое средство) можно вводить любыми подходящими способами, в том числе парентеральным, внутрилегочным и интраназальным и, если необходимо для местного



лечения, внутриочаговым, внутриматочным или внутрипузырным введением. К парентеральным инфузиям относятся внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Прием дозы можно осуществлять любым подходящим путем, например, инъекциями, такими как внутривенные или подкожные инъекции, отчасти в зависимости от того, является ли назначение кратковременным или постоянным. В настоящем документе предусмотрены различные схемы приема доз, в том числе без ограничения однократное или многократное введение в различные моменты времени, струйное введение и импульсная инфузия.

Антитела (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгаты по настоящему изобретению могут быть составлены, приняты в виде дозы и введены способом, совместимым с надлежащей медицинской практикой. К факторам для рассмотрения в данном контексте относятся подвергаемые лечению конкретное заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, в частности связанные с агрегатами TDP-43, или протеинопатия TDP-43, подвергаемое лечению конкретное млекопитающее, клиническое состояние индивидуального субъекта, причина заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43, место доставки средства, способ введения, график введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антитело или иммуноконъюгат не обязательно должны быть, но необязательно могут быть составлены с одним или более средствами, которые в настоящее время применяют для предупреждения или лечения рассматриваемых заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43. Эффективное количество таких других средств зависит от количества антитела или иммуноконъюгата, присутствующего в составе, типа заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43 или лечения и других факторов, рассмотренных выше. Их обычно применяют в тех же дозах и с путями введения, которые описаны в настоящем документе, или приблизительно от 1 до 99% от доз, описанных в настоящем документе, или в любой дозе и любым путем, которые эмпирически/клинически определены как подходящие.

Для предупреждения или лечения заболевания подходящая доза антитела (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгата по настоящему изобретению (при применении отдельно или в комбинации с одним или более другими дополнительными терапевтическими средствами) будет зависеть от типа подлежащего лечению заболевания, типа антитела или

иммуноконъюгата, тяжести и течения заболевания, вводится ли антитело или иммуноконъюгат в предупредительных или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни субъекта и ответа на антитело или иммуноконъюгат, а также решения лечащего врача. Антитело (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгат подходящим образом вводят субъекту за один раз или в течение ряда курсов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания начальной потенциальной дозой для введения субъекту может быть от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг) антитела (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) или иммуноконъюгата, например, в зависимости от того будут ли ее вводить за одно или более отдельных введений или путем непрерывной инфузии. Одна типичная суточная доза может составлять от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от упомянутых выше факторов. При повторных введениях в течение нескольких суток или дольше, в зависимости от состояния, лечение обычно будут продолжать до тех пор, пока не произойдет требуемое подавление симптомов заболевания. Одна иллюстративная доза антитела или иммуноконъюгата может находиться в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Таким образом, субъекту можно вводить одну или более доз приблизительно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Такие дозы можно вводить с перерывами, например, раз в неделю или раз в три недели (например, так, чтобы субъект получал от приблизительно двух до приблизительно двадцати, или, например, приблизительно шесть доз антитела). Можно ввести начальную, более высокую, ударную дозу с последующим введением одной или более более низких доз. Однако могут быть пригодны и другие схемы приема доз. Прогресс данной терапии легко отслеживать с помощью традиционных методик и анализов.

Понятно, что любой из вышеуказанных составов или терапевтических способов можно осуществить с применением как иммуноконъюгата по настоящему изобретению, так и антитела к TDP-43 (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к изделию, содержащему материалы, пригодные для лечения, предупреждения и/или диагностики заболеваний, расстройств или нарушений, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43, которые описаны выше. Изделие включает емкость и этикетку или листок-вкладыш на емкости или в связи с нею. К подходящим емкостям относятся, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты для IV раствора и т. д. Емкости могут быть выполнены из различных материалов, таких

как стекло или пластик. Емкость содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией, эффективна для лечения, предупреждения и/или диагностики заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, в частности связанных с агрегатами TDP-43, или протеинопатии TDP-43, и может иметь стерильное впускное отверстие (например, емкость может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, которую можно пробить иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере одно активное средство в композиции представляет собой антитело или иммуноконъюгат по настоящему изобретению. На этикетке или вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного патологического состояния. Более того, изделие может содержать (а) первую емкость с содержащейся в ней композицией, причем композиция содержит антитело (предпочтительный тип молекулы, специфически связывающей TDP-43) по настоящему изобретению; и (b) вторую емкость с содержащейся в ней композицией, причем композиция содержит дополнительное терапевтическое средство. Изделие, в соответствии с данным вариантом осуществления настоящего изобретения, может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, на котором указано, что композиции можно применять для лечения конкретного патологического состояния. В качестве альтернативы или дополнения, изделие может дополнительно содержать вторую (или третью) емкость, содержащую фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера или раствор декстрозы. Он может дополнительно включать и другие материалы, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к способу сохранения или увеличения познавательной и запоминающей способности, двигательной и речевой функции или предупреждения и/или замедления снижения познавательной и запоминающей способности, двигательной и речевой функции у субъекта, предусматривающему введение связывающей молекулы по настоящему изобретению, иммуноконъюгата по настоящему изобретению, композиции по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В соответствии со следующим вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к способу снижения уровня TDP-43, предусматривающему введение связывающей молекулы по настоящему изобретению, иммуноконъюгата по настоящему

изобретению, композиции по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Способы по настоящему изобретению могут предусматривать введение по меньшей мере одного дополнительного средства терапии, предпочтительно, причем дополнительное средство терапии выбрано без ограничения из неврологических лекарственных средств, антител к бета-амилоиду, антител к тау-белку, ингибиторов агрегации тау-белка, ингибиторов агрегации бета-амилоида, антител к BACE1 и ингибиторов BACE1.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу детектирования TDP-43, предусматривающему приведение образца в контакт со связывающей молекулой по настоящему изобретению, предпочтительно, причем образец представляет собой образец головного мозга, образец спинномозговой жидкости, образец мочи или образец крови.

### **Краткое описание чертежей**

**Фиг. 1.** Детекция TDP-43 на срезах тканей субъекта с лобно-височной деменцией (FTD) с патологией типа А. Иммуногистохимию проводили на замороженных срезах толщиной 10 мкм из лобной доли коры пациента с FTD с патологией типа А с применением меченых флуоресцентной меткой вторичных антител для детекции. В качестве контролей применяли следующие антитела: кроличьи поликлональные антитела пан-TDP-43 (Proteintech, 10782-2-AP) для детекции патологических включений и физиологического ядерного TDP-43; кроличье моноклональное фосфо-TDP-43 p409/410 антитело (Cosmobio, TTP-PTD-P02) для детекции патологического агрегированного и фосфорилированного TDP-43. Стрелками указаны агрегаты TDP-43; толстыми стрелками указан физиологический TDP-43 в ядрах (ядра визуализированы с помощью красителя DAPI). Название гибридомы или коммерческий источник антител указаны в верхнем левом углу каждого изображения.

**Фиг. 2.** Детекция TDP-43 в растворимых и нерастворимых в детергенте (саркозиле) фракциях, полученных из посмертной ткани головного мозга с FTD типа А (лобной доли коры). На иммуноблотах с коммерческими антителами, связывающимися либо с N-концевым участком (А, В), либо с С-концевым участком (С), видно присутствие TDP-43 в растворимых (дорожка 1) и нерастворимых (дорожка 2) в саркозиле фракциях. Иммуноблоты с mAb к TDP-43, полученные в данном исследовании, с эпитопами в N-концевом участке TDP-43 (D-I). Иммуноблоты с mAb к TDP-43, которые связываются с С-концевым участком TDP-43 (J-N). Все mAb к TDP-43 специфически распознавали полноразмерный TDP-43. Кроме того, некоторые mAb (К, М, N) распознавали

патологические паттерны болезненного состояния, такие как С-концевые фрагменты в нерастворимой фракции.

**Фиг. 3.** Показана плотность иммунореактивных объектов рTDP-43, измеренная для мышей, обработанных наполнителем (n=30, серые столбцы) и посредством ACI-7069-633B12-Ab1 (вариантом IgG2a) (n=25, заштрихованные серым столбцы), у двух участков головного мозга: полосатое тело (А) и кора головного мозга (В). (С) Нерастворимые фракции, полученные из коры левого полушария головного мозга, количественно оценивали в отношении общего TDP-43 у групп, обработанных наполнителем (n=30) и посредством ACI-7069-633B12-Ab1 (вариантом IgG2a) (n=25) (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001).

**Фиг. 4.** Агрегацию TDP-43, индуцированную расщеплением TEV в присутствии ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a) или изотипического контроля, измеряли по мутности на уровне 600 нм спустя 30 часов. Конечные точки через 30 часов нормализовали к изотипическому контролю (серый столбец) и рассчитывали % агрегированного TDP-43 для ACI-7069-633B12-Ab1 (заштрихованный серым столбец). Средние значения  $\pm$  SD показаны для трех независимых экспериментов, а статистические различия между изотипическим контролем и ACI-7069-633B12-Ab1 (вариантом IgG2a) анализировали с помощью t-критериев Уэлча (\*\*\*p<0,001).

**Фиг. 5.** (А) Показана положительная по Iba1 иммунореактивная площадь, измеренная у мышей, обработанных наполнителем (n=16, серые столбцы) и посредством ACI-7069-633B12-Ab1 (вариантом IgG2a) (n=16, заштрихованные серым столбцы), у коры головного мозга. Планками погрешности представлена стандартная ошибка среднего (SEM). (В-С) Показан средний размер клеток микроглии, измеренный у мышей, обработанных наполнителем (n=16, серые столбцы) и посредством ACI-7069-633B12-Ab1 (вариантом IgG2a) (n=16, заштрихованные серым столбцы), у коры головного мозга. В зависимости от ее морфологии микроглию делили на три класса: (В) большая гипертрофированная, (С) небольшая разветвленная и (D) разветвленная в состоянии покоя. Статистические различия между контрольным наполнителем и ACI-7069-633B12-Ab1 (вариантом IgG2a) анализировали с помощью t-критерия (\*p<0,05).

**Фиг. 6.** Количественная оценка уровней TDP-43 в CSF различных пациентов с FTLD-TDP по сравнению со здоровыми контролями по результатам анализа AlphaLISA с ACI-7069-633B12-Ab1 (вариантом IgG2a) и ACI-7071-809F12-Ab1 (вариантом IgG2a). Необработанные результаты измерений AlphaLISA (ось y) для общего TDP-43, полученного для различных образцов CSF (ось x). Статистический анализ проводили с помощью линейной смешанной модели для необработанных результатов измерений с

использованием следующих критериев: группы, эксперимента, пола и возраста в качестве фиксированных факторов и индивидуумов в качестве случайного фактора с данными, полученными в трех независимых экспериментах (\*\*p<0,01)

**Фиг. 7.** Иммуноистощение TDP-43 и pTDP-43 с помощью антител ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a) (1), ACI-7069-642D12-Ab1 (варианта IgG2a) (2) и контроля в виде мышинового IgG2a (3) из нерастворимых в детергенте (саркозиле) фракций, полученных из посмертных тканей головного мозга с FTD типа А. Подвергнутые иммуноистощению фракции 1-3 анализировали с помощью вестерн-блоттинга с применением специфичных к TDP-43 или pTDP-43 детектирующих антител. IN предназначен для ввода материала (до иммуноистощения).

### Примеры

#### Пример 1. Получение вакцинной композиции с TDP-43

Вакцины на основе липосом получали в соответствии с протоколами, опубликованными в WO2012/055933. Для получения антител применяли вакцины, содержащие полноразмерный белок TDP-43 (FL TDP-43) в качестве антигена (таблица 2, SEQ ID NO: 1).

**Таблица 2.** Описание белкового и пептидного антигена TDP-43

SEQ ID NO	Определение	Аминокислотная последовательность (1-буквенный код)
SEQ ID NO: 1	Q13148 (UniProt) TADBP_HUMAN ДНК- связывающий белок TAR 43 AK 1-414	MSEYIRVTEDENDPEIEIPSEDDGTVLLSTVTAQFP GACGLRYRNPVSQCMRGVRLVEGILHAPDAGWG NLVYVVNYPKDNKRKMDETDASSAVKVKRAVQ KTSDLIVLGLPWKTTEQDLKEYFSTFGVLMVQV KKDLKTGHSGFGFVRFTEYETQVKVMSQRHMI DGRWCDCKLPNSKQSQDEPLRSRKVFVGRCTED MTEDELREFFSQYGDVMDVFIKPFRAFVFVTF DDQIAQSLCGEDLIKGISVHISNAEPKHNSNRQLE RSGRFGGNPFGFGNQGFGNSRGGGAGLGNNQG SNMGGMNFGAFSINPAMMAAAQAALQSSWGM MGMLASQQNQSGPSGNNQNQGNMQREPNQAFG SGNNSYSGSNSGAAIGWGSASNAGSGSGFNNGGFG SSMDSKSSGWGM

## **Пример 2. Получение антител к TDP-43**

### **А. Иммунизация мышей**

Самок C57BL/6J OlaHsd (C57BL/6) и BALB/c OlaHsd (BALB/c) мышей дикого типа (Harlan, США) получали в возрасте 9 недель. Вакцинирование начинали в возрасте 10 недель. Мышей вакцинировали полноразмерным белком TDP-43, экспонированным на поверхности липосом, в присутствии монофосфорил-гекса-ацил-липида А, 3-деацил (синтетического) (3D-(6-ацил) PHAD®) в качестве адъюванта.

Мышей вакцинировали подкожной инъекцией (п/к) на 0-е, 4-е, 8-е, 21-е, 35-е и 60-е сутки. У мышей брали кровь и получали гепаринизированную плазму за 7 суток до иммунизации (предиммунная плазма) и на 14-е, 28-е, 42-е, 81-е и 121-е сутки после первой иммунизации. Мышей, использованных для слияния с миеломными клетками, дополнительно вакцинировали тремя ежедневными бустерными инъекциями белка TDP-43 посредством внутривентральной инъекции без адъюванта.

Ответ на вакцину измеряли в плазме мышей. При связывании полученных из плазмы антител от иммунизированных мышей с иммобилизованным рекомбинантным полноразмерным (FL) TDP-43 наблюдали высокие титры антител к TDP-43.

### **В. Получение гибридом и отбор для субклонирования**

Мышей умерщвляли и проводили слияние с клетками миеломы с применением спленоцитов от четырех отдельных мышей. Скрининг на антитела из успешно слитых клеточных линий гибридомы проводили следующим образом. Разведенные (1:32) надосадочные жидкости культур клеток анализировали с помощью мультиплексного анализа на основе микроносителей Luminex (Luminex, Нидерланды). Микроносители Luminex конъюгировали с FL TDP-43 и с захватывающими IgG с антителами к мышиним IgG-Fc, специфичными к подклассам IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c и IgG3 (Jackson ImmunoResearch, США). По результатам связывания с микроносителями, конъюгированными с FL TDP-43, было выявлено 386 ответных реакций, полученных от мышей, иммунизированных липосомальной вакциной с FL TDP-43.

Жизнеспособные гибридомы выращивали с применением селективных сред, содержащих сыворотку. Клоны с преимущественным связыванием с включениями TDP-43 в головном мозге человека с FTD и клоны, связывающиеся с С-концом TDP-43, отбирали для дальнейшего субклонирования. После ограничивающего разведения клональные гибридомы выращивали в среде с низким содержанием иммуноглобулина, а стабильные колонии отбирали для скрининга и отбора антител. По результатам данного скрининга были выявлены антитела, показанные в таблице 3.

### **Пример 3. Определение эффективности связывания (EC50)**

Анализы Lumindex с серийным разведением антител выполняли так, как описано ранее, для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC50) связывания антител с FL TDP-43. Все значения EC50 приведены в таблице 3. Таким образом, все протестированные антитела связывались с полноразмерным TDP-43 с высокой аффинностью.

**Таблица 3. Значения EC50, определенные с помощью анализа Lumindex**

<b>Клон гибридомы</b>	<b>Название антитела</b>	<b>Изотип</b>	<b>κ, λ-цепь</b>	<b>EC50 (пМ), белок TDP-43</b>
631B2A2	ACI-7069-631B2-Ab1	IgG1	κ	<10
633B12C8	ACI-7069-633B12-Ab1	IgG2b	κ	<10
634H10H7	ACI-7069-634H10-Ab2	IgG2b	κ	<10
636E5B8	ACI-7069-636E5-Ab1	IgG2b	λ	<10
641H1E7	ACI-7069-641H1-Ab2	IgG2b	κ	<10
642A10B11	ACI-7069-642A10-Ab1	IgG1	κ	20
642D12B4	ACI-7069-642D12-Ab1	IgG2b	κ	<10
646B7F7	ACI-7069-646B7-Ab1	IgG2b	κ	<10
712A6B10	ACI-7071-712A6-Ab1	IgG2c	κ, λ	180
809D9C2	ACI-7071-809D9-Ab2	IgG2b	κ	<10
809F12D8	ACI-7071-809F12-Ab1	IgG2b	κ	<10

### **Пример 4. Связывание антител с человеческим FL TDP-43**

Связывание антител с человеческим FL TDP-43 определяли с помощью непрямого ELISA. Нанесение покрытия на планшет для ELISA в количестве 1 мкг/мл человеческого FL TDP-43 проводили в течение ночи в карбонатном буфере при температуре 4°C. Планшеты промывали посредством 0,05% Tween-20/PBS, а затем блокировали с помощью 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в 0,05% Tween-20/PBS в течение 1 часа при температуре 37°C. Затем вносили антитела, очищенные из надосадочных жидкостей гибридомы, в 3-кратном серийном разведении, начиная с 1 мкг/мл, и инкубировали в



течение 2 часов при температуре 37°C, после чего промывали планшеты. Конъюгированные с AP вторичные антитела к мышинным IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Великобритания) вносили при разведении 1/1000 в 0,05% Tween-20/PBS на 1 час при температуре 37°C. После последней промывки планшеты инкубировали с раствором фосфатазного субстрата pNPP (Sigma-Aldrich, Швейцария) и считывали на 405 нм с помощью планшет-ридера для ELISA (Tecan, Швейцария). Все протестированные клоны связывались с полноразмерным TDP-43 с различными значениями EC50 в диапазоне 10-1567 нг/мл (таблица 4).

**Таблица 4.** Значения EC50 по результатам ELISA

<b>Название клона гибридомы</b>	<b>EC50, нг/мл</b>
631B2A2	53
633B12C8	32
634H10H7	53
636E5B8	15
641H1E7	16
642A10B11	1567
642D12B4	14
646B7F7	11
712A6B10	102
809D9C2	17
809F12D8	14
Контроль 2E2D3	20.7

**Пример 5. Картирование эпитопов с помощью ELISA и пептидного чипа**

Антитела, очищенные из бессывороточных надосадочных жидкостией гибридомы, подвергали скринингу с помощью непрямого ELISA-анализа для определения связывающих участков с применением линейных пептидов длиной 40-66 АК или библиотеки 15-мерных пептидов, биотинилированных на N-конце и покрывающих всю последовательность TDP-43 со смещением в АК 9 и перекрытием в 6 АК. Пептидные последовательности представлены в таблице 5.

96-луночные планшеты покрывали посредством 5 мкг/мл небиотинилированных пептидов в течение ночи в карбонатном буфере при температуре 4°C. Планшеты промывали посредством 0,05% Tween-20/PBS, а затем блокировали с помощью 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в 0,05% Tween-20/PBS в течение 1 часа при температуре 37°C. Затем вносили антитело, очищенное из надосадочной жидкости гибридомы, в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C, после чего промывали планшеты. Конъюгированные с AP вторичные антитела к мышинным IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Великобритания) вносили при разведении 1/1000 в 0,05% Tween-20/PBS на 1 час при температуре 37°C. После последней промывки планшеты инкубировали с раствором фосфатазного субстрата pNPP (Sigma-Aldrich, Швейцария) и считывали на 405 нм с помощью планшет-ридера для ELISA (Tecan, Швейцария).

В случае биотинилированных пептидов 96-луночные планшеты для ELISA, покрытые стрептавидином, инкубировали с 5 мкг/мл биотинилированных 15-мерных пептидов. Планшеты 3 раза промывали посредством 0,05% Tween-20/PBS, а затем блокировали с помощью 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в 0,05% Tween-20/PBS в течение 1 часа при температуре 37°C. Затем вносили антитело, очищенное из надосадочной жидкости гибридомы, в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C, после чего промывали планшеты. Конъюгированные с AP вторичные антитела к мышинным IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Великобритания) вносили при разведении 1/1000 в 0,05% Tween-20/PBS на 1 час при температуре 37°C. После последней промывки планшеты инкубировали с раствором субстрата для AP pNPP (Sigma-Aldrich, Швейцария) и считывали на 405 нм с помощью планшет-ридера для ELISA (Tecan). Определенные связывающие участки представлены в таблице 6. Было обнаружено, что протестированные антитела связываются со следующими пептидами: TP-21, TP-23, TP-35, TP-40, TP-48, TDP-6, соответствующие участкам 181-195, 199-213, 307-321, 352-366, 389-411, 140-200 соответственно из последовательности под SEQ ID NO: 1.

Более точные линейные эпитопы картировали с применением библиотеки 15-мерных пептидов, непосредственно синтезированных на твердой подложке и покрывающих всю последовательность TDP-43 согласно SEQ ID NO: 1 со смещением в 1 АК и перекрытием в 14 АК (PerScan, Нидерланды). Пептидные чипы блокировали лошадиной сывороткой и овальбумином и инкубировали с раствором очищенных антител в концентрациях от 0,75 до 5 мкг/мл в течение ночи при температуре 4°C. После промывки пептидные чипы инкубировали с разведением 1/1000 конъюгата HRP и

кроличьего антитела к мышиным IgG(H+L) (Southern Biotech, США) в течение одного часа при температуре 25°C. После промывания вносили пероксидазный субстрат 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолинсульфонат (ABTS) и 20 мкл/мл 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Через час проявление цвета количественно оценивали с помощью камеры на основе полупроводниковой светочувствительной матрицы (CCD) и системы для обработки изображений. Эти связывающие участки подтверждали путем картирования эпитопов, и были выявлены следующие эпитопы (представленные в таблице 6): АК 183-188, 203-213, 204-208, 204-211, 205-210, 316-323, 358-361, 400-405, 400-406, 400-412 из последовательности под SEQ ID NO: 1.

**Таблица 5. Пептиды, применяемые для определения связывающих участков с помощью ELISA**

<b>Номер пептида</b>	<b>Положение согласно SEQ ID NO: 1</b>
TP-21	181-195
TP-23	199-213
TP-35	307-321
TP-40	352-366
TP-48	389-411
TDP-6	140-200

**Таблица 6. Связывающие участки и эпитопы для тестируемых антител**

<b>Название клона гибридомы</b>	<b>Связывающие участки, АК</b>	<b>Эпитопы, АК</b>
631B2A2	397-411	400-406
633B12C8	397-411	400-405
634H10H7	140-200	183-188
636E5B8	352-366	358-361
641H1E7	199-213	204-211
642A10B11	389-411	400-412
642D12B4	181-195	183-188
646B7F7	199-213	205-210
712A6B10	307-321	316-323
809D9C2	199-213	203-213

809F12D8	199-213	204-208
----------	---------	---------

**Пример 6. Детекция TDP-43 в тканях головного мозга у субъектов с FTD/ALS с помощью иммуногистохимии**

Взаимодействие с целевой молекулой оценивали в иммуногистохимических экспериментах на тканях головного мозга субъектов с FTD. Ткани человеческого головного мозга с FTD получали из Нидерландского банка мозга, Нидерландского института нейробиологии, Амстердам (открытый доступ: [www.brainbank.nl](http://www.brainbank.nl)), и из банка Queen Square Brain Bank for Neurological Disorders, UCL. Весь материал был собран от доноров, от которых банком мозга было получено письменное информированное согласие на аутопсию головного мозга и использование материала и клинической информации в исследовательских целях. Иммуногистохимию проводили на замороженных срезах толщиной 10 мкм с применением меченых флуоресцентной меткой вторичных антител для детектирования. В качестве контролей применяли следующие антитела: кроличьи поликлональные антитела пан-TDP-43 (Proteintech, 10782-2-AP) для детекции патологических включений и физиологического ядерного TDP-43; кроличье моноклональное фосфо-TDP-43 p409/410 антитело (Cosmobio, T1P-PTD-P02) для детекции патологического агрегированного и фосфорилированного TDP-43 и вторичное антитело без первичного антитела (№ 1° Ab) для детекции неспецифического фона.

Все антитела по настоящему изобретению связывались с ядерным, неагрегированным, а также с агрегированным TDP-43. Некоторые антитела по настоящему изобретению предпочтительно связываются с агрегированным TDP-43 в цитоплазме при патологии типа А (фиг. 1). Подробная оценка характеристик связывания приведена в таблице 7.

**Таблица 7. Детекция TDP-43 в тканях головного мозга у субъектов с FTD**

Название антитела	ИНС-детекция агрегированного TDP-43	ИНС-детекция ядерного неагрегированного TDP-43
ACI-7069-631B2-Ab1	+++	+++
ACI-7069-633B12-Ab1	+++	+++
ACI-7069-634H10-Ab2	++	++
ACI-7069-636E5-Ab1	+/-	+++
ACI-7069-641H1-Ab2	+++	+
ACI-7069-642A10-ab1	+++	+

ACI-7069-642D12-Ab1	++	+
ACI-7069-646B7-Ab1	+++	+++
ACI-7071-712A6-Ab1	++	+
ACI-7071-809D9-Ab2	+++	+++
ACI-7071-809F12-Ab1	+++	+++

NA — данные отсутствуют; - отсутствует; +/- не ясный; + слабый; ++ средний; +++ обильный

### **Пример 7. Детекция TDP-43 в тканях головного мозга у субъектов с FTD/ALS с помощью вестерн-блоттинга**

Участок ткани головного мозга (лобную долю коры) гомогенизировали в соотношении 1:4 (мас./об.) в буфере для гомогенизации-солюбилизации (HS-буфере) при температуре 4°C с помощью гомогенизатора Precellys с применением пробилок для гомогенизации CKmix (Labgene, BER0092). Для гомогенизации использовали следующую последовательность: 3 цикла по 30 с на 5000 об./мин (с паузами 15 с между каждым циклом). Гомогенизированные образцы разделяли на аликвоты и хранили при температуре -80°C в 1,5-мл пробирках с низким связыванием белка (Axugen MCT-175-L-C).

- HS-буфер: 10 mM Tris.HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, полные ингибиторы протеазы без EDTA (Roche, 32524300) и ингибиторы фосфатазы PhosSTOP (Roche, 4906837001).

Гомогенаты головного мозга оттаивали на льду и ресуспендировали в HS-буфере с получением конечной концентрации 2% саркозила, 1 ед./мкл бензоназы и 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Затем образцы инкубировали при температуре 37°C при постоянном встряхивании на 600 об./мин на термомиксере в течение 45 минут. Надосадочные жидкости собирали в новую пробирку. Осадок ресуспендировали в 1000 мкл буфера для флотации миелина и центрифугировали при 20000 g в течение 60 минут при температуре 4°C на настольной центрифуге. Надосадочную жидкость осторожно удаляли для удаления всех плавающих липидов. Данную стадию повторяли, если не удавалось за одну стадию удалить все липиды. Затем осадок промывали посредством PBS и центрифугировали 30 минут при температуре 4°C на настольной центрифуге. Конечный осадок ресуспендировали в 200 мкл PBS и хранили при температуре -80°C. Образцы анализировали с помощью иммуноблоттинга в денатурирующих условиях.

- HS-буфер с саркозилом, бензоназой и MgCl<sub>2</sub>: 10 mM Tris.HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 4% саркозила, 1 ед./мкл бензоназы

(Novagen 70746-4), 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, полные ингибиторы протеазы без EDTA (Roche) и ингибиторы фосфатазы PhosSTOP (Roche).

- Буфер для флотации миелина: HS-буфер с 1% Triton X-100 и 30% сахарозы

Вестерн-блоттинг проводили на геле Bolt 12% Bis-Tris Plus толщиной 1,0 мм (ThermoFisher) с применением рабочего буфера MES SDS (ThermoFisher). Образцы (30 мкл/образец) загружали на гель после разведения в PBS, загрузочном буфере (1x, Licor, 928-40004), содержащем 100 мМ DTT. Белки разгоняли при постоянном напряжении 100 В в течение 1 часа. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (ThermoFisher, IB23001) с применением iBLOT (ThermoFisher, IB21001) при 20 вольтах в течение 7 минут. После переноса белка мембраны блокировали в течение 1 часа в блокирующем буфере Licor (блокирующий буфер Odyssey 927-40000), разведенном 1:3 в PBS. Мембраны инкубировали в течение ночи со следующими первичными антителами: общий TDP-43 (Proteintech, 60019-2-Ig или 10782-2-AP), pTDP-43 (Cosmobio, TTP-PTD-M01). В случае первичных антител блокирующий буфер разводили 1:1 в PBS-T (PBS с 0,4% Tween-20). После 4 промывок PBS-T (PBS с 0,1% Tween-20) мембраны инкубировали со вторичными антителами, связанными с красителем LICOR. Вторичные антитела (ослиные антитела к мышинным (каталожный номер 926-68072) или козы антитела к кроличьим (каталожный номер 926-32211) применяли в разведении 1:10000 в блокирующем буфере Licor, разведенном 1:1 с PBS-T (PBS с 0,4% Tween-20) в течение 1 часа при комнатной температуре. Мембраны снова промывали 4 раза посредством PBS-T (PBS с 0,1% Tween-20) и сканировали с помощью системы LICOR. На фиг. 2 видно, что все mAb специфически распознавали полноразмерный TDP-43. Кроме того, некоторые mAb (K, M, N) распознавали патологические паттерны болезненного состояния, такие как C-концевые фрагменты в нерастворимой фракции и высокомолекулярные агрегаты.

### **Пример 8А. Измерение avidности с помощью SPR**

Авидность связывания с растворимым или агрегированным FL TDP-43 оценивали путем определения констант диссоциации (KD) с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR; Biacore T200, GE Healthcare Life Sciences). Рекомбинантный человеческий растворимый или агрегированный FL TDP-43 иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 Series S (GE Healthcare Life Sciences) путем связывания по аминокетильным группам. Растворимый TDP-43 иммобилизовали в концентрации 5 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия (pH 4,5) со скоростью потока 5 мкл/мин в течение 420 секунд, что давало в результате уровень иммобилизации 150 RU. Агрегированный TDP-43

иммобилизировали в концентрации 50 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия (pH 4,5) со скоростью потока 5 мкл/мин в течение 840 секунд, что давало в результате уровень иммобилизации 110 RU. Биотинилированный пептид TP-73 (AK 181-190 из последовательности под SEQ ID NO: 1) иммобилизовали на сенсорном чипе Series S Sensor Chip SA (GE Healthcare Life Sciences) в концентрации 5 мкг/мл в PBS-P<sup>+</sup> со скоростью потока 5 мкл/мин в течение 30 секунд, что давало в результате уровень иммобилизации 400 RU. Для оценки значений KD очищенные антитела и контрольное антитело (2E2-D3) вводили в 3-кратных разведениях в PBS-P<sup>+</sup>, начиная с 333 нМ и с разведением до 0,15 нМ. Антитела вводили со скоростью потока 50 мкл/мин в течение 90 секунд времени контакта и 700 секунд фазы диссоциации с последующими тремя регенерациями посредством 10 мМ глицина-HCl с pH 1,7. Для оптимизированного протокола SPR антитела разводили в 3 раза, начиная с 300 нМ и с разведением до 1,2 нМ и вводили в течение 300 секунд со скоростью 30 мкл/мин с последующей диссоциацией в течение 600 секунд. Поверхность регенерировали с помощью одной инъекции 10 мМ глицина-HCl с pH 1,7. Результаты, полученные в процессе изучения кинетики связывания, сопоставляли с двумя эталонами с использованием пустой проточной кюветы и буферного цикла и оценивали с использованием глобальной модели аппроксимации 1:1 с RI. Значения авидности для 11 антител и двух Fab-фрагментов представлены в таблице 8. Антитела по настоящему изобретению связывали агрегированный TDP-43 с KD в диапазоне от 0,62 нМ до 4,64 нМ. Кроме того, у некоторых антител наблюдали предпочтительное связывание с агрегированным TDP-43 по сравнению с растворимым TDP-43. Два Fab-фрагмента связывались с растворимым TDP-43 с KD в диапазоне от 2,8 до 21,8 нМ, и у них наблюдали KD, схожую с таковой для агрегированного TDP-43. Два антитела (отмеченные \*) анализировали повторно с использованием оптимизированного протокола SPR с более длительной фазой ассоциации и диссоциации, что делало возможным более точное определение KD, особенно для антител с медленными скоростями диссоциации. Два антитела связывались с растворимым TDP-43 с KD в диапазоне от 0,22 до 3,9 нМ и с агрегированным TDP-43 с KD в диапазоне от 0,18 до 0,69 нМ. Антитело ACI-7069-642D12-Ab1 связывалось с пептидом TP-73 с KD 3,6 нМ.

**Таблица 8.** Характеристика связывания по результатам SPR

Название клона гибридомы	Растворимый TDP-43				Агрегированный TDP-43			
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (нМ)	Rmax (RU)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (нМ)	Rmax (RU)
631B2A2	1,59	7,74	486	243,4	8,61	7,10 E-	0,82	72

	E+03	E-04			E+04	05		
633B12C8	8,73 E+02	3,19 E-04	365	323,3	8,21 E+04	5,01 E- 05	0,62	74,1
Fab 633B12C8	5,51E+ 04	1,46E- 04	2,8	69,0	3,22E+0 4	2,15E- 04	6,9	102,4
633B12C8*	6,18E+ 04	1,08E- 05	0,22	107,7	8,40E+0 4	1,32E- 05	0,18	134,6
634H10H7	4,43 E+04	8,74 E-04	19,7	16	1,10 E+05	1,66 E- 04	1,51	117,9
636E5B8	1,56 E+04	6,82 E-04	43,84	23,3	1,13 E+05	2,74 E- 04	2,43	80,8
641H1E7	1,25 E+05	8,41 E-04	6,76	50,8	1,21 E+05	1,93 E- 04	1,6	128,7
642A10B11	NA	NA	NA	NA	1,26 E+06	5,85 E- 03	4,64	53,2
642D12B4	1,59 E+05	8,38 E-04	5,28	43,1	1,48 E+05	1,31 E- 04	0,88	170,2
Fab 642D12B4	1,28E+ 05	2,67E- 03	21,8	43,0	9,40E+0 4	1,76E- 03	21,8	275,9
642D12B4*	1,15E+ 05	4,50E- 04	3,9	74,3	1,49E+0 5	9,87E- 05	0,69	498,7
646B7F7	1,78 E+05	6,50 E-04	3,66	67,3	1,44 E+05	1,84 E- 04	1,28	148,3
712A6B10	1,34 E+03	5,45 E-04	406	85,7	3,48 E+04	2,36 E- 05	0,68	29,4
809D9C2	7,71 E+04	8,21 E-04	10,6	47,7	9,59 E+04	2,16 E- 04	2,25	88,4
809F12D8	9,94 E+04	1,67 E-04	1,68	70,6	9,47 E+04	7,63 E- 05	0,81	132,3

NA — нет данных, поскольку для аппроксимации доступно менее трех кривых

\* Характеристика связывания с использованием оптимизированного протокола SPR на рекомбинантно продуцируемых изотипических антителах IgG2a.



### **Пример 8В. Измерение аффинности с помощью SPR**

Аффинность связывания с растворимым FL TDP-43 оценивали путем определения констант диссоциации (KD) с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR; Biacore T200, GE Healthcare Life Sciences). Козье иммобилизирующее антитело к мышинным антителам иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 Series S (GE Healthcare Life Sciences) путем связывания по аминокетогруппам. Антитела иммобилизовали в концентрации 2-5 мкг/мл в PBS-P<sup>+</sup> (GE Healthcare Life Sciences) со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 120 секунд, что давало в результате уровень иммобилизации 350–1000 RU. Для оценки значений KD пептид FL TDP-43 или TP-51 (AK 352-414 из последовательности под SEQ ID NO: 1) вводили со скоростью потока 30 мкл/мин в одноциклическом исследовании кинетики в течение 300 секунд времени контакта в 3-кратных разведениях в PBS-P<sup>+</sup> от 1,2 нМ до 100 нМ. Диссоциацию регистрировали в течение 1 ч с последующей регенерацией посредством 10 мМ глицина-HCl с pH 1,7. Результаты, полученные в процессе изучения кинетики связывания, сопоставляли с двумя эталонами с использованием пустой проточной кюветы и буферного цикла и оценивали с использованием глобальной модели аппроксимации 1:1 с RI. Значения константы ассоциации (ka), константы диссоциации (kd) и аффинности (KD) для 3 антител показаны в таблице 9 как средние значения ± SD от 12 (ACI-7069-633B12-Ab1), 2 (ACI-7069-642D12-Ab1) или 3 (ACI-7071-809F12-Ab1) повторностей. Антитела ACI-7069-633B12-Ab1, ACI-7069-642D12-Ab1 и ACI-7071-809F12-Ab1 связывались с растворимым TDP-43 со значениями аффинности в диапазоне от 15 до 135 пМ, от 226 до 272 пМ и от 389 до 457 пМ соответственно. Антитело ACI-7069-633B12-Ab1 связывалось с пептидом TP-51 с аффинностью в диапазоне от 1184 до 1316 пМ.

**Таблица 9.** Значения аффинности к растворимому пептиду FL TDP-43 и TP-51 по результатам SPR

Название клона гибридомы	ACI-7069-633B12-Ab1			ACI-7069-642D12-Ab1			ACI-7071-809F12-Ab1		
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (пМ)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (пМ)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (пМ)
Среднее для растворимого TDP-43	4,39E+04	3,45E-06	75	1,10E+05	2,76E-05	249	3,20E+04	1,36E-05	423
SD для растворимого TDP-43	5,35E+03	3,03E-06	60	8,00E+03	4,40E-06	23	2,16E+03	1,88E-06	34

Среднее для TP-51	1,10E+05	1,38E-04	1250						
SD для TP-51	9,41E+03	1,72E-05	66						

### **Пример 9. Секвенирование антител**

Для секвенирования генов переменного участка использовали лизаты клональных гибридомных клеток. Мышиные гибридомы собирали и лизировали с применением лизирующего буфера, содержащего соли гуанидиния для дезактивации РНКаз. Затем геномную ДНК удаляли с помощью не содержащей РНКазы ДНКазы, а РНК очищали с помощью аффинной колонки на основе силикагеля, используя несколько промывок, и элюировали из колонки с помощью воды, не содержащей РНКаз. После экстракции РНК степень ее чистоты и концентрацию измеряли спектрофотометрическими методами. Целостность РНК оценивали на денатурирующем агарозном геле и подвергали РНК обратной транскрипции в кДНК с помощью обратной транскриптазы (RT). Перед добавлением реакционной смеси с RT РНК нагревали до 70°C в течение 10 минут для разрушения вторичных структур РНК. Продукты RT непосредственно использовали для ПЦР-амплификации. Для высокоточной ПЦР-амплификации кДНК каждый из праймеров переменного участка, соответствующих различным семействам генов, кодирующих антитела, индивидуально смешивали с праймером константного участка, в случае VH и VL отдельно в общем реакционном объеме 50 мкл. Первоначально использовали пул вырожденных праймеров (12 в случае VH и 12 в случае VL) и, в зависимости от результатов, использовали второй пул для получения ПЦР-продуктов. После реакции ПЦР-продукты анализировали с помощью гель-электрофореза на 2% агарозных гелях, окрашенных бромидом этидия. ПЦР-продукты в случае VL и VH индивидуально очищали на агарозном геле с применением трис-ацетат-EDTA (ТАЕ). Очищенные фрагменты, вырезанные из геля, секвенировали с помощью способа секвенирования с применением меченных красителем терминаторов и с использованием тех же праймеров, которые были использованы для ПЦР. Секвенирование проводили в обоих направлениях для обеспечения перекрытия на обоих концах. Последовательности анализировали с помощью множественного выравнивания последовательностей (инструментарий Clustal) и аннотировали с помощью алгоритма Kabat, как описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 91-3242 (1991). Нуклеотидные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепей (VH и VL) показаны в таблице 10. Транслированные белковые последовательности для выбранных переменных доменов

тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей и их определяющие комплементарность участки (CDR) показаны в таблице 11.

**Таблица 10. Нуклеотидные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепей (VH и VL)**

Название антитела	Код гибридомы	VH	VL
ACI-7069-631B2-Ab1	631B2A2	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTG GACCTGAACTGGTGAAGCCTGG GGCTTCAGTGAAGATATCCTGC AAGACTTCTGGATACACATTCA CTGAATACTCCATACTGGGT GAAACAGAGCCATGGAGAGAG CCTTGAGTGGATTGGAGGTATT AATCCTGACAATGGTGGTACTA GGTACAACCAGAAGTTCAAGG GCAAGGCCACATTGACTGTAGA CAAGTCCTCCAGCACAGCCTAC ATGGACCTCCGCAGCCTGACAT CTGAGGATTCTGCAGTTTATTA TTGTGCAAGAGAGTCCTGGGGC CAAGGCACCACTCTCACAGTCT CCTCT (SEQ ID NO: 18)	GATGTTGTGATGACCCAGACT CCTCACTTTGTCGGTTACC ATTGGACAACCAGCCTCCATC TCTTGCAAGTCAAGTCAGAGC CTCTTAAATAGTGATGGAAAG ACATATTTGAATTGGTTGTTA CAGAGGCCAGGCCAGTCTCCA AAGCGCCTAATCTATCTGGTG TCTAAACTGGACTCTAGAATC CCTGACAGGTTCACTGGCAGT GGATCAGGGACAGATTTTACA CTGAAAATCAGCAGAGTGGA GGCTGAGGATTTGGGAGTTTA TTATTGCTGGCAAGGTACACA TTTTCTCACACGTTTCGGTTCT GGGACCAAGCTGGAGCTGAA A (SEQ ID NO: 19)
ACI-7069-633B12-Ab1	633B12C8	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTG GACCTGAACTGGTGAAGCCTGG GGCTTCAGTGAAGATATCCTGC AAGACTTCTGGATTCACATTCA CTGAATACTCCATGCACTGGGT GAAACAGAGCCATGGAAAGAG CCTTGAGTGGATTGGAGGTATT AATCCTAACAATGGTGGTACTA GCTACAACCAGAAGTTCAAGG GCAAGGCCACATTGACTGTAGA CAAGTCCTCCAGCACAGCCTAC ATGGAGCTCCGCAGCCTAACAT	GATGTTGTGATGACCCAGACT CCTCACTTTGTCGGTTACC ATTGGACAACCAGCCTCCATC TCTTGCAAGTCAAGTCAGAGC CTCTTACATAGTGATGGAAAG ACATATTTGAATTGGTTGTTA CAGAGGCCAGGCCAGTCTCCA AAGCGCCTAATCTATCTGGTG TCTAAACTGGACTCTAGAATC CCTGACAGGTTCACTGGCAGT GGATCAGGGACAGATTTTACA CTGAAAATCAGCAGAGTGGA

		CTGAGGATTCTGCAGTCTATTA CTGTGCAAGAGAGTCCTGGGGC CAAGGCACCACTCTCACAGTCT CCTCA (SEQ ID NO:28)	GGCTGAGGATTTGGGAGTTTA TTATTGCTGGCAAGGTACACA TTTTCTCACACGTTCCGGTGCT GGGACCAAGCTGGAGCTGAA A (SEQ ID NO: 29)
<b>ACI-7069- 634H10- Ab2</b>	634H10H7	GAGG TTCAGCTGCAGCAGTCTG GGGCAGAGCTTGTGAAGCCAG GGGCCTCAGTCAGGTTGTCCTG CACAGCTTCTGGCTTCAACATT AAAGACACCTATATGCACTGGG TGAAGCAGAGGCCTGAACAGG GCCTGGAATGGATTGGAAGGAT TGATCCTGCGAATAGTAATACT AAATTTGACCCGAAGTTCCAGG GCAAGGCCACTATAACATCAGA CACATCCTCCAACACAGCCTAC CTGCAGCTCAGCAGCCTGACAT CTGAGGACACTGCCGTCTATTA CTGTGCTAGATTCTACGGTGGT AGCCACTGGTACTTCGATGTCT GGGGCGCAGGGACCACGGTCA CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 38)	GACATCAAGATGACCCAGTCT CCATCCTCCATGTATGCATCG TTGGGAGAGAGAGTCACTATC ACTTGCAAGGCGAGTCAGGA CATTAAAAGCTATTTAAGCTG GTACCAGCATAAACCATGGA AATCTCCTAAGGCCCTGATCT ATTATGCTACAAGCTTGGCAG ATGGGGTCCCATCAAGATTCA GTGGCAGTGGATCTGGGCAA GATTATTCTCTAACCATCAGC AGCCTGGAGTCTGACGATACA GCAACTTACTACTGTCTACAG CAAGGTGAGAGCCCGTACAC GTTCCGGAGGGGGACCAAGC TGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 39)
<b>ACI-7069- 636E5- Ab1</b>	636E5B8	GAGGTACATCTGGTGGAGTCTG GGGGAGACTTAGTGATGCCTGG AGGGTCCCTGAAGCTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATTCACITTTCA GTA ACTATGGCATGTCTTGGGT TCGCCAGACTCCAGACAAGAG GCTGGAGTGGGTCGCAACCATT AGTAGTGGTGGTAAATATATCA ACTACTTAGACAGTTTGAAGGG GCGATTACCATCTCCAGAGAC AATGCCAAGAACACCCTATACC TGCAAATGAGCAGTCTGAAGTC TGAGGATACAGCCATGTATTAC TGTGCAA AAGACTACGGTAGTG	CAACTTGTGCTCACTCAGTCA TCTTCAGCCTCTTTCTCCCTGG GAGCCTCAGCAAAACTCACGT GCACCTTGAGTAGTCAGCACA GTACGTACACCATTGAATGGT ATCAGCAACAGCCACTCAAGC CTCCTAAGTATGTGATGGAGC TTAAGAAAGATGGAAGCCAC AGCACAGGTGATGGGATTCCT GATCGCTTCTCTGGATCCAGC TCTGGTGCTGATCGCTACCTT AGCATTTCCAACATCCAGCCT GAAGATGAAGCAATATACAT CTGTGGTGTGGGTGATACAAT

		GCTGGGCCTGGTTTGCTTACTG GGGCCAAGGGACTCTGGTCACT GTCTCTGCA (SEQ ID NO: 48)	TAAGGAACAATTTGTGTATGT TTTCGGCGGTGGAACCAAGGT CACTGTCCTA (SEQ ID NO: 49)
<b>ACI-7069- 641H1- Ab2</b>	641H1E7	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCA GGACCTGGCCTGGTGGCGCCCT CACAGAGCCTGTCCATCACTTG TACTGTCTCTGGGTTTTTCATTAA CCAACATATGGTGTACACTGGGT TCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGT CTGGAGTGGCTGGGACTAATGT GGGCTGGTGGGAAGCACAATT ATAATTCGGCTCTCATGTCCAG ACTGAGCATCAGCAAAGACAA CTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTA AAAATGAACAGTCTGCAAACCTG ATGACACAGCCATGTACTACTG TGTCATCTATAGGACGGGGTTT GCTTACTGGGGCCAAGGGACTC TGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 68)	GATGTTTTGATGACCCAAACT CCACTCTCCCTGCCTGTCAGT CTTGAGATCAAGCCTCCATC TCTTGAGATCTAGTCAGAGC ATTGTACATACTATTGGAAAC ACCTATTTAGAATGGTACCTG CAGAAACCAGGCCAGTCTCCA AAGCTCCTGATCTACAAAGTT TCCAACCGGTTTTCTGGGGTC CCAGACAGGTTCACTGGCAGT GGATCAGGGACAGATTTTACA CTCAAGATCAGCAGAGTGGA GGCTGAGGATCTGGGAGTTTA TTACTGCTTTCAAGGTTTACA TGTTCCATTCACTTTTCGGCTCG GGGACAAAGTTGGAAATAAA A (SEQ ID NO: 69)
<b>ACI-7069- 642A10- ab1</b>	642A10B11	CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTG GGGCTGAACTGGTGAAGCCTGG GGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGC AAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CCAAGTACTGGATGCACTGGGT GAAGCAGAGGCCTGGACAAGG CCTTGAGTGGATTGGAGAGATT AATCCTAGCAACGGTCGTA ACTACAATGAGAAGTTCAAGA GCAAGGCCACACTGACTGTAGA CAAATCCTCCAGCACAGCCTAC ATGCAACTCAGCAGCCTGACAT CTGAGGACTCTGCGGTCTATTA CTGTGCAAGATATATGGACTAC TGGGGTCAAGGAACCTCAGTCA CCGTCTCCTCA	GATGTTGTGATGACCCAGACT CCACTCACTTTGTCGGTTACC ATTGGACAACCAGCCTCCATC TCTTGCAAGTCAAGTCAGAGC CTCTTTGATCGTGATGGAAAG ACATATTTGAATTGGTTGTTA CAGAGGCCAGGCCAGTCTCCA AAGCGCCTAATCTATCTGGTG TCTAAACTGGACTCTGGAGTC CCTGACAGGTTCACTGGCAGT GGATCAGGGACAGATTTTACA CTGAAAATCAGCAGAGTGGA GGCTGAGGATTTGGGAGTTTA TTATTGCTGGCAAGGTACACA TTTTCCGTGGACGTTTCGGTGG AGGCACCAAGCTGGAAATCA

		(SEQ ID NO: 78)	AA (SEQ ID NO: 79)
<b>ACI-7069-642D12-Ab1</b>	642D12B4	GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTG GGGCAGAGCTTGTGAAGCCGG GGGCCTCAGTCAGGTTGTCTTG CACAGCTTCTGGCTTCAACATT AAAGACCCCTATATGCACTGGG TCAGGCAGAGGCCTAACAGG GCCTGGAGTGGATTGGAAGGAT TGATCCTGCGGATGGTAATACT AAATATGACCCGAAGTTCCAGG GCAAGGCCACTTTAACAGCAGA CACATCCTCCAATGTAGCCTAC CTGCACCTCAGCAGCCTGACAT CTGAGGACACTGCCGTCTATTA CTGTGCTAGATTCTACGGTAGT AGCCACTGGTATTTTCGATGTGT GGGGCGCAGGGACCACGGTCA CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 88)	GACATCAAGATGACCCAGTCT CCATCCTCCATGTATGCATCG TTGGGAGAGAGAGTCACTATC ACTTGCAAGGCGAGTCAGGA CATTAAAAGGTATTTAAGCTG GTACCAGCAGAAACCATGGA AATCTCCTAAGATCCTGATCT ATTATGCAACAAGCTTGGCAG ATGGGGTCCCATCAAGATTCA GTGGCACTGGATCTGGACAAG ATTATTCTCTAACCATCAGCA GCCTGGAGTCTGACGATGTAG CAACTTACTACTGTCTACAGC AAGGTGAGAGCCCGTACACG TTCGGAGGGGGGACCAAGCT GGAAATAAAA (SEQ ID NO: 89)
<b>ACI-7069-646B7-Ab1</b>	646B7F7	CAGGTGCAACTGAAGGAGTCA GGACCTGGCCTGGTGGCGCCCT CACAGAGCCTGTCCATCACTTG TACTGTCTCTGGATTTTCATTAA CCAACTTTGGTGTACACTGGGT TCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGT CTGGAGTGGCTGGGAATAATGT GGGCTGGTGGGAAGCACAAATT ATAATTCGGCTCTCATGTCCAG ACTGAGCATCAGCAAAGACAA CTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTA AAAATGAACAGTCTCCAAACTG ATGACACAGCCATGTACTACTG TGTCATCTATAAGACGGGGTTT GCTTACTGGGGCCAAGGGACTC TGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 108)	GATGTTTTGATGACCCAAACT CCACTCTCCCTGCCTGTCAGT CTTGGAGATCAAGCCTCCATC TCTTGCAGATCTAGTCAGAGC ATTGTACATGCTATTGGAAAC ACCTATTTAGAATGGTACCTG CAGAAACCAGGCCAGTCTCCA AAGCTCCTGATCTACAAAGTT TCCAACCGTTTTTCTGGGGTC CCAGACAGGTTTCAGTGGCAGT GGATCAGGGACAGATTTTACA CTCAAGATCAGCAGAGTGGA GGCTGAGGATCTGGGAGTTTA TACTGCTTTCAAGGTTTACA TGTTCCATTCACGTTCCGGCTC GGGGACAAAGTTGGAATAAA AA (SEQ ID NO: 109)

<b>ACI-7071-712A6-Ab1</b>	712A6B10	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTG GAGCTGAGCTGGTGAAACCCG GGACATCAGTGAAGCTGTCCTG TAAGGCTTCTGCCTACACCTTC ACTGAATATACTATACTACTGGA TAAAGCAGAAATCTGGACAGG GTCTTGAGTGGATTGGGTGGTT TCACCCTGAAAATGATAATATA AAGTACAATGAGAATTTCAAGG ACAAGGCCACATTGACTGCGGA CAGATCCTCCAGCACAGTCTAT ATGGAACCTTAGTAGATTGACAT CTGAAGACTCTGCGGTCTATTT CTGTGCAGGGACGTCAGGCTAC GGAGACTACTGGGGCCAAGGC ACCACTCTCACAGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 128)	GATGTTGTGATGACCCAGATT CCTACTACTTTGTCGATTACC ATTGGACAACCAGCCTCCATC TCTTGCAAGTCAAGTCAGAGC CTCTTACCTAGTGATGGAAAG ACATATTTGAATTGGTTGTTA CAGAGGCCAGGCCAGTCTCCA AAGCGCCTAATCTATCTGGTG TCTAAACTGGACTCTGGAGTC CCTGACAGGTTCACTGGCAGT GGATCAGGGACAGATTTTACA CTGAAAATCAGCAGAGTGGA GGCTGACGATTTGGGAGTTTA TTATTGCTGGCAAGGTACACA TTTTCTCTACGTTCCGGTGCT GGGACCAAGCTGGAAGTCAA A (SEQ ID NO: 129)
<b>ACI-7071-809D9-Ab2</b>	809D9C2	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTG GGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGG GGTCTCAGTGAAGATTTCTGC AAGGGTTCTGGCTACAAATTCA CTGATTATTCTATGCACTGGGT GAAACAGAGTCATACAAAGAG TCTAGAGTGGATTGGAGTTATT AGTACTTACTATGGTGATACTA CCTACAACCAGAAATCAAGGG CAAGGCCACAATCACTGTAGAC AAATCCTCCAGCACAGCCTATA TGGAACCTGCCAGACTGACATC TGAGGATTCTGCCATCTATTAC TGTGCAACGTACGGTAACTTCC CGGCCTCATTTTCTTACTGGGG CCAAGGGACTCTGGTCACTGTC TCTGCA (SEQ ID NO: 148)	GATATTGTGATGACTCAGGCT GCACCCTCTATACCTGTCACT CCTGGAGAGTCAGTATCCATC TCCTGCAGGTCTAGTAAGAGT CTCCTGCATAGTAATGGCAAC ACTTACTTGTATTGGTTCCTGC AGAGGCCAGGCCAGTCTCCTC AGCTCCTGATATATCGGATGT CCAACCTTGCCTCAGGAGTCC CAGACAGGTTCACTGGCAGTG GGTCAGGAACTGCTTTTACAC TGAGAATCAGTAGAGTGGAG GCTGAGGATGTGGGTGTTTAT TACTGTATGCAACATCTAGAA TATCCATTACGTTCCGGCTCG GGGACAAAGTTGGAAATAAA A (SEQ ID NO: 149)
<b>ACI-7071-809F12-</b>	809F12D8	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCA GGACCTGGCCTGGTGGCGCCCT	GATGTTTTGATGACCCAAACT CCTACTCTCCCTGCCTGTCAGT

<b>Ab1</b>		CACAGAGCCTGTCCATCACTTG CACTGTCTCTGGGTTTTTCGTAA ACAGAAATGGTGTACAGTGGGT TCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGT CTGGAGTGGCTGGGAGTAATAT GGCCTGGCGGAAGCACAAATT GTAATTCGGCTCTCATGTCCAG ACTGAGCATCAGCAAAGACAA CTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTA AAAATGAACAGTCTGCACACTG ATGACACAGGCATATATTA TGCCAGAGTAGGGGGTAACTAC GTGTGGGACTATAATAACTACG CCTGGGGCCAAGGGACTCTGGT CACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 158)	CTTGGAGATCAGGCCTCCATC TCTTGCAGATCTAGTCAGAAC ATTGTACATAGTATTGGAAAC ACCTATTTAGAGTGGTACCTG CAGAAACCAGGCCAGTCTCCA AAGCTCCTGATCTACAAAGTT TCCAACCGATTTTCTGGGGTC CCAGACAGGTTTCAGTGGCAGT GGATCAGGGACAGATTTTACA CTCAAGATCAGCAGAGTGGA GGCTGAGGATCTGGGAGTTTA TACTGCTTTCAAGGTTTACA TGTTCGTACACGTTCCGGAGG GGGGACCAAGCTAGAAATAA GA (SEQ ID NO: 159)
------------	--	---	--

**Таблица 11.** Аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепей (VH и VL) и их CDR

Название антитела	Код гибридомы	VH	CDR 1 VH	CDR 2 VH	CDR3 VH	VL	CDR 1 VL	CDR2 VL	CDR3 VL
ACI-7069-631B2-Ab1	631B2A2	EVQLQQSG PELVKPGA SVKISCKTS GYTFTEYSI HWVKQSH GESLEWIG GINPDNGG TRYNQKFK GKATLTVD KSSSTAYM DLRSLTSE DSAVYYCA RESWGQGT TLTVSS	EYSI H (SEQ ID NO: 11)	GIN PDN GGT RYN QKF KG (SEQ ID NO: 12)	ES	DVVMTQ TPLTLVS TIGQPASI SCKSSQS LLNSDGK TYLNWL LQRPQGS PKRLIYL VSKLDSR IPDRFTGS GSGTDF LKISRVE AEDLGV YYCWQG	KSS QSL LNS DGK TYL N (SEQ ID NO: 15)	LVS KLD S (SEQ ID NO: 16)	WQG THFP HT (SEQ ID NO: 17)



		(SEQ ID NO: 10)				THFPHTF GSGTKLE LK (SEQ ID NO: 14)			
ACI- 7069- 633B12- Ab1	633B12C8	EVQLQQSG PELVKPGA SVKISCKTS GFTFTEYS MHWVKQS HGKSLEWI GGINPNNG GTSYNQKF KGKATLTV DKSSSTAY MELRSLTS EDSAVYYC ARESWGQ GTTLTVSS (SEQ ID NO: 20)	EYS MH (SEQ ID NO: 21)	GIN PNN GGT SYN QKF KG (SEQ ID NO: 22)	ES	DVVMQTQ TPLTLSV TIGQPASI SCKSSQS LLHSDGK TYLNWL LQRPGQS PKRLIYL VSKLDSR IPDRFTGS GSGTDFT LKISRVE AEDLGV YYCWQG THFPHTF GAGTKLE LK (SEQ ID NO: 24)	KSS QSL LHS DGK TYL N (SEQ ID NO: 25)	LVS KLD S (SEQ ID NO: 16)	WQG THFP HT (SEQ ID NO: 27)
ACI- 7069- 634H10- Ab2	634H10H7	EVQLQQSG AELVKPGA SVRLSCTA SGFNIKDT YMHVVKQ RPEQGLEW IGRIDPANS NTKFDPKF QGKATITS DTSSNTAY LQLSSLTSE DTAVYYCA RFYGGSHW YFDVWGA	DTY MH (SEQ ID NO: 31)	RIDP ANS NTK FDP KFQ G (SEQ ID NO: 32)	FYG GSH WYF DV (SEQ ID NO: 33)	DIKMTQS PSSMYAS LGERVTI TCKASQD IKSYLSW YQHKPW KSPKALI YYATSLA DGVPSRF SGSGSGQ DYSLTISS LESDDTA TYYCLQQ GESPYTF	KAS QDI KSY LS (SEQ ID NO: 35)	YAT SLA D (SEQ ID NO: 36)	LQQ GESP YT (SEQ ID NO: 37)

		GTTVTVSS (SEQ ID NO: 30)				GGGTKLE IK (SEQ ID NO: 34)			
ACI- 7069- 636E5- Ab1	636E5B8	EVHLVESG GDLVMPG GSLKLSCA ASGFTFSN YGMSWVR QTPDKRLE WVATISSG GKYINYLD SLKGRFTIS RDNAKNTL YLQMSSLK SEDTAMYY CAKDYGSG WAWFAYW GQGTLVTV SA (SEQ ID NO: 40)	NYG MS (SEQ ID NO: 41)	TISS GGK YIN YLD SLK G (SEQ ID NO: 42)	DYG SGW AWF AY (SEQ ID NO: 43)	QLVLTQS SSASFSL GASAKLT CTLSSQH STYTIEW YQQQPLK PPKYVME LKKDGS STGDGIP DRFSGSS SGADRYL SISNIQPE DEAIYIC GVGDTIK EQFVYVF GGGTKV TVL (SEQ ID NO: 44)	TLSS QHS TYTI E (SEQ ID NO: 45)	GSH STG D (SEQ ID NO: 46)	GVG DTIK EQF VYV (SEQ ID NO: 47)
ACI- 7069- 641H1- Ab2	641H1E7	QVQLKESG PGLVAPSQ SLSITCTVS GFSLTNYG VHWVRQPP GKGLEWL GLMWAGG STNYNSAL MSRLSISKD NSKSQVFL KMNSLQTD DTAMYCY VIYRTGFA YWGQGT VTVSA	NYG VH (SEQ ID NO: 61)	LM WA GGG TNY NSA LMS (SEQ ID NO: 62)	YRT GFA Y (SEQ ID NO: 63)	DVLMTQ TPLSLPVS LGDQASI SCRSSQSI VHTIGNT YLEWYL QKPGQSP KLLIYKV SNRFSGV PDRFSGS GSGTDFT LKISRVE AEDLGV YYCFQGS HVPFTFG	RSS QSIV HTI GNT YLE (SEQ ID NO: 65)	KVS NRF S (SEQ ID NO: 66)	FQG SHV PFT (SEQ ID NO: 67)

		(SEQ ID NO: 60)				SGTKLEI K (SEQ ID NO: 64)			
ACI- 7069- 642A10- ab1	642A10B1 1	QVQLQQPG AELVKPGA SVKLSCKA SGYTFTKY WMHWVK QRPQGGL WIGEINPSN GRTNVNEK FKSKATLT VDKSSSTA YMQLSSTL SEDSAVYY CARYMDY WGQGTSVT VSS (SEQ ID NO: 70)	KY WM H (SEQ ID NO: 71)	EINP SNG RTN YNE KFK S (SEQ ID NO: 72)	YMD Y (SEQ ID NO: 73)	DVVMQTQ TPLTSLV TIGQPASI SCKSSQS LFDRDGK TYLNWL LQRPQGS PKRLIYL VSKLDSG VPDRFTG SGSGTDF TLKISRV EAEDLGV YYCWQG THFPWTF GGGTKLE IK (SEQ ID NO: 74)	KSS QSL FDR DGK TYL N (SEQ ID NO: 75)	LVS KLD S (SEQ ID NO: 16)	WQG THFP WT (SEQ ID NO: 77)
ACI- 7069- 642D12- Ab1	642D12B4	EVQLQQSG AELVKPGA SVRLSCTA SGFNIKDPY MHWVRQR PKQGLEWI GRIDPADG NTKYDPKF QGKATLTA DTSSNVAY LHLSSLTSE DTAVYYCA RFYGSSHW YFDVWGA GTTVTVSS	DPY MH (SEQ ID NO: 81)	RIDP ADG NTK YDP KFQ G (SEQ ID NO: 82)	FYG SSH WYF DV (SEQ ID NO: 83)	DIKMTQS PSSMYAS LGERVTI TCKASQD IKRYLSW YQQKPW KSPKILY YATSLAD GVPSRFS GTGSGQD YSLTISSL ESDDVAT YYCLQQ GESPYTF GGGTKLE	KAS QDI KRY LS (SEQ ID NO: 85)	YAT SLA D (SEQ ID NO: 86)	LQQ GESP YT (SEQ ID NO: 87)

		(SEQ ID NO: 80)				IK (SEQ ID NO: 84)			
ACI- 7069- 646B7- Ab1	646B7F7	QVQLKESG PGLVAPSQ SLSITCTVS GFSLTNFG VHWVRQPP GKGLEWL GIMWAGGS TNYNSALM SRLSISKDN SKSQVFLK MNSLQTDD TAMYCVI YKTGFAY WGQGTLV TVSA (SEQ ID NO: 100)	NFG VH (SEQ ID NO: 101)	IMW AGG STN YNS ALM S (SEQ ID NO: 102)	YKT GFA Y (SEQ ID NO: 103)	DVLMQTQ TPLSLPVS LGDQASI SCRSSQSI VHAIGNT YLEWYL QKPGQSP KLLIYKV SNRFSGV PDRFSGS GSGTDFT LKISRVE AEDLGV YYCFQGS HVPFTFG SGTKLEI K (SEQ ID NO: 104)	RSS QSIV HAI GNT YLE (SEQ ID NO: 105)	KVS NRF S (SEQ ID NO: 106)	FQG SHV PFT (SEQ ID NO: 107)
ACI- 7071- 712A6- Ab1	712A6B10	QVQLQQSG AELVKPGT SVKLSCKA SAYTFTEY TIHWIKQK SGQGLEWI GWFHPEND NIKYNENF KDKATLTA DRSSSTVY MELSRLTS EDSAVYFC AGTSGYGD YWGQGTT LTVSS (SEQ ID NO:	EYTI H (SEQ ID NO: 121)	WFH PEN DNI KYN ENF KD (SEQ ID NO: 122)	TSG YGD Y (SEQ ID NO: 123)	DVVMTQI PLTLSITI GQPASIS CKSSQSL LPSDGKT YLNWLL QRPGQSP KRLIYLV SKLDSGV PDRFTGS GSGTDFT LKISRVE ADDLGV YYCWQG THFPPTF GAGTKLE	KSS QSL LPS DGK TYL N (SEQ ID NO: 125)	LVS KLD S (SEQ ID NO: 16)	WQG THFP PT (SEQ ID NO: 127)

		120)				LK (SEQ ID NO: 124)			
ACI- 7071- 809D9- Ab2	809D9C2	QVQLQQSG AELVRPGV SVKISCKGS GYKFTDYS MHWVKQS HTKSLEWI GVISTYYG DTTYNQKF KGKATITV DKSSSTAY MELARLTS EDSAIYYC ATYGNFPA SFSYWGQG TLVTVSA (SEQ ID NO: 140)	DYS MH (SEQ ID NO: 141)	VIST YYG DTT YNQ KFK G (SEQ ID NO: 142)	YGN FPAS FSY (SEQ ID NO: 143)	DIVMTQA APSIPVTP GESVSISC RSSKSL HSNGNTY LYWFLQ RPGQSPQ LLIYRMS NLASGVP DRFSGSG SGTAFTL RISRVEA EDVGVY YCMQHL EYPFTFG SGTKLEI K (SEQ ID NO: 144)	RSS KSL LHS NGN TYL Y (SEQ ID NO: 145)	RMS NLA S (SEQ ID NO: 146)	MQH LEY PFT (SEQ ID NO: 147)
ACI- 7071- 809F12- Ab1	809F12D8	QVQLKESG PGLVAPSQ SLSITCTVS GFSLNRNG VQWVRQPP GKGLEWL GVIWPGGS TNCNSALM SRLSISKDN SKSQVFLK MNSLHTDD TGIYYCAR VGGNYVW DYNNYAW GQGTLVTV SA	RNG VQ (SEQ ID NO: 151)	VIW PGG STN CNS ALM S (SEQ ID NO: 152)	VGG NYV WDY NNY A (SEQ ID NO: 153)	DVLMTQ TPLSLPVS LGDQASI SCRSSQNI VHSIGNT YLEWYL QKPGQSP KLLIYKV SNRFSGV PDRFSGS GSGTDFT LKISRVE AEDLGV YYCFQGS HVPYTFG GGTKLEI	RSS QNI VHSI GNT YLE (SEQ ID NO: 155)	KVS NRF S (SEQ ID NO: 156)	FQG SHV PYT (SEQ ID NO: 157)

		(SEQ ID NO: 150)				R (SEQ ID NO: 154)			
--	--	---------------------	--	--	--	--------------------------	--	--	--

**Пример 10. In vivo эффективность ACI-7069-633B12-Ab1 (вариант IgG2a) на трансгенной мышинной модели протеинопатий TDP-43**

Для оценки эффективности ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a) в условиях *in vivo* тестировали способность ACI-7069-633B12-Ab1 (вариант IgG2a) уменьшать патологию TDP-43 у NEFH-tTA x hTDP-43 $\Delta$ NLS двугенных мышей (rNLS8, Walker et al. 2015). Мышам rNLS8 еженедельно вводили ACI-7069-633B12-Ab1 (вариант IgG2a) (n=30) или наполнитель (n=30) и в конце приема доз анализировали молекулярные патологические маркеры, такие как фосфорилированный и/или общий нерастворимый TDP-43.

#### 10.1 Животные

Перед началом исследования всем животным давали акклиматизироваться к окружающей среде, их обследовали, давали привыкнуть к персоналу и взвешивали для того, чтобы убедиться, что у них надлежащее состояние здоровья, и для минимизации неспецифического стресса, связанного с экспериментальными манипуляциями. Мышей держали на корме, содержащем доксициклин (200 мг/кг), во время размножения и до 8-недельного возраста. В возрасте 8 недель корм заменяли на корм, не содержащий доксициклин (DOX), для обеспечения экспрессии трансгена. На протяжении всего исследования циклы день/ночь (12/12), комнатную температуру (20-23°C) и относительную влажность (около 50%) поддерживали постоянными. В ходе исследования доступ к корму и воде был предоставлен без ограничений. Когда у мышей начали проявляться трудности с движением, корм заменяли на влажный корм и гидрогель на полу клетки. Все поведенческие тесты проводили во время дневной фазы цикла животного.

#### 10.2. Введение соединения

В день инъекции готовили свежие ACI-7069-633B12-Ab1 (вариант IgG2a) (60 мг/кг) и наполнить и вводили их внутривентриально в соответствии с еженедельной схемой приема доз на протяжении всего исследования.

#### 10.3. Сбор мозгов

Мозги разделяли на два полушария. Левое полушарие рассекали для сбора областей коры головного мозга. Слои коры головного мозга мышей и остальную ткань головного мозга подвергали мгновенной заморозке для дальнейших биохимических анализов. Оставшиеся правые полушария фиксировали погружением непосредственно после перфузии на 3 часа при комнатной температуре и собирали в свежеприготовленный 1x PBS, содержащий 4% параформальдегида (PFA).

#### 10.4. Иммуногистохимия

Фиксированные погружением правые полушария головного мозга нарезали сагиттальным срезом по единому систематическому случайному протоколу на криотоме Leica CM1950 с толщиной сечения 10 микрон. Систематические случайные наборы сагиттальных срезов (7 срезов с уровнями 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 11 головного мозга) на мышь подвергали иммуноокрашиванию по TDP-43 и фосфорилированному TDP-43. Осуществляли окрашивание Iba1 для оценки количества и морфологии микроглии в головном мозге. Связывание антител визуализировали с помощью меченных флуоресцентной меткой вторичных антител. Стандартные отрицательные контроли включали срезы головного мозга дикого типа, а также срезы от трансгенных животных без применения первичных антител.

#### 10.5. Визуализация и определение иммунореактивности

Заключенные в среду гистологические срезы целиком визуализировали на слайд-сканере Axio.Scan Z1 под управлением программного обеспечения ZEN при 10-кратном увеличении с использованием LED (Colibri2) освещения и чувствительной монохроматической камеры Orca Flash 4.0. Размер головного мозга определяли с помощью отдельного установления контура представляющих интерес участков в коре головного мозга и дорсальной области полосатого тела. Для всех маркеров определяли объектную плотность (OD) (в количестве объектов на  $\text{мм}^2$ ), отмечали процент площади и OD относительно размера представляющего интерес участка на втором контуре, исключая любые тканевые артефакты (складки ткани и т. д.).

#### 10.6. Приготовление образцов белков из коры головного мозга

Ткани оттаивали на льду, а затем обрабатывали ультразвуком в 5X об./масса аналитическом буфере для радиоиммунопреципитации (RIPA, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL CA630, 5 mM EDTA, 0,5% дезоксихолата натрия и 0,1% SDS, pH 8,0), содержащем 1 mM PMSF и коктейль ингибиторов протеаз/фосфатаз (Roche Applied

Science). Образцы центрифугировали при температуре 4°C, 100000 g, в течение 30 минут и надосадочную жидкость считали растворимой фракцией. Осадок промывали путем обработки ультразвуком с RIPA, и надосадочную жидкость отбрасывали. Нерастворимый в RIPA осадок обрабатывали ультразвуком в 2X об./масса мочевином буфере (7 М мочевины, 2 М тиомочевины, 4% CHAPS и 30 мМ Tris, pH 8,5) и центрифугировали при температуре 22°C, 100000 g, в течение 30 минут. Данную надосадочную жидкость считали нерастворимой в RIPA/растворимой в мочеvine фракцией. Концентрации белка в растворимых в RIPA фракциях определяли с помощью анализа белка с применением BCA (Pierce).

#### 10.7. Количественное определение нерастворимого TDP-43

Общие уровни TDP-43 в нерастворимой в RIPA фракции анализировали с помощью коммерческого набора AlphaLISA для анализа человеческого TDP-43 (Perkin Elmer, AL387HV).

#### 10.8. Статистический анализ

Данные ИНС и AlphaLISA представлены как среднее  $\pm$  SEM. Статистические различия между наполнителем и животными, обработанными посредством ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a), анализировали с помощью t-критериев Уэлча и обозначали звездочками над соответствующими столбцами (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Выбросы в результатах гистологических измерений исключали либо из-за выброса Граббса в группе или на уровне (отдельные измерения), либо по техническим причинам (артефакты изображения, складки тканей и т. д.).

#### 10.9. Результаты

Обработка посредством ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a) снижала уровень фосфорилированного TDP-43 и нерастворимого TDP-43 у мышей gNLS8

Сверхэкспрессия репрессируемой DOX-формы K82A/R83A/K84A мутантного человеческого TDP-43 (hTDP-43 $\Delta$ NLS) приводила к заметному накоплению и агрегации TDP-43 в цитоплазме нейронов в мышинной модели gNLS8. Патологическим признаком данной модели являются отложения нерастворимых и фосфорилированных включений TDP-43 (pTDP-43). Данные небольшие сферические цитоплазматические включения присутствовали исключительно у трансгенных животных и полностью отсутствовали у мышей дикого типа или моногенных трансгенных по tTA контрольных мышей. Более того, pTDP-43 зачастую отсутствовал в течение 1-й недели отсутствия DOX и



накапливался с резким прогрессированием в ходе 3-4 недель после удаления DOX (Walker et al., 2015). Обработка посредством ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a) приводила к статистически значимому уменьшению плотности фосфорилированного TDP-43 как в полосатом теле, так и в коре головного мозга (фиг. 3А-В) по сравнению с обработанными наполнителем мышами, что свидетельствовало о его функциональной эффективности в уменьшении патологии, связанной с TDP-43. Для количественной оценки были выбраны полосатое тело и кора головного мозга из-за высокого уровня экспрессии трансгена в этих участках.

10.10. Обработка посредством ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a) снижала уровень нерастворимого TDP-43 у мышей rNLS8

Для подтверждения уменьшения патологии, связанной с TDP-43, наблюдаемой в результатов иммуногистохимических анализов, производили количественную оценку количества общего нерастворимого/агрегированного TDP-43 в головном мозге после биохимического фракционирования. Нерастворимые в RIPA фракции получали из коры левого полушария головного мозга, содержащей нерастворимый/агрегированный TDP-43. Значительное снижение количества нерастворимого TDP-43 наблюдали у мышей, получавших обработку посредством ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a), по сравнению с таковым у животных, получавших наполнитель (фиг. 3С). Данное уменьшение молекулярной патологии, связанной с TDP-43, согласовывалось с результатами, наблюдаемыми с помощью иммуногистохимических анализов, подтверждая эффективность обработки посредством ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a). Насколько нам известно, это первый раз, когда введение периферических антител ослабляло формирование патологии, связанной с TDP-43, на *in vivo* модели протеинопатии TDP-43.

10.11. Обработка посредством ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a) у мышей rNLS8 увеличивала иммунореактивную площадь микроглии

Функциональное восстановление у мышей rNLS8 после супрессии экспрессии трансгена включала увеличение активности микроглии. Площадь тела микроглиальных клеток увеличивалась на данной фазе, что приводило к устранению патологии, связанной с TDP-43, и функциональному восстановлению двигательных недостатков, что указывало на терапевтическую парадигму у мышинной модели rNLS8 (Spiller K.J et al., Nature Neuroscience, 2018).

Для оценки механизма действия ACI-7069-633B12-Ab1 в уменьшении патологии, связанной с TDP-43, у мышей rNLS8, оценивали его влияние на активацию микроглии. Окрашивание Iba1 осуществляли иммуногистохимическим методом для количественной оценки количества и состояния микроглии в коре головного мозга мышей. У мышей rNLS8 был обнаружен микроглиоз на терминальной стадии (5 недель после прекращения Dox). Обработка посредством ACI-7069-633B12-Ab1 значительно увеличивала положительную иммунореактивную площадь Iba1 в коре головного мозга по сравнению с контролем, обработанным наполнителем (фиг. 5A). Данное увеличение могло быть результатом либо увеличения количества микроглиальных клеток, либо изменений морфологии микроглии. Для этого сначала оценивали плотность положительных по Iba1 клеток в коре головного мозга. Обработка посредством ACI-7069-633B12-Ab1 не оказывала влияния на плотность микроглиальных клеток, представленную количеством клеток, по сравнению с контролем, обработанным наполнителем.

Затем оценивали влияние ACI-7069-633B12-Ab1 на морфологию микроглии. Для установления корреляции увеличения иммунореактивной площади Iba1 с изменениями в состояниях активации микроглии, представленную морфологией, микроглии классифицировали на три состояния в зависимости от их размера и морфологии (большая гипертрофированная, небольшая разветвленная и разветвленная в состоянии покоя). Значимое увеличение среднего размера клеток наблюдали в случае крупной гипертрофированной микроглии при обработке посредством ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a) по сравнению с контролем, обработанным наполнителем (фиг. 5B). В двух остальных классах микроглии, которые представляли собой менее активированные состояния, значимых различий обнаружено не было (фиг. 5C-D). Результаты данного анализа свидетельствовали, что увеличение общей положительной по Iba1 иммунореактивной области, наблюдаемое в группе, обработанной посредством ACI-7069-633B12-Ab1, было результатом изменений морфологии, отражаемых в увеличении размера микроглиальных клеток и состояния активации. Это свидетельствовало, что ACI-7069-633B12-Ab1 (вариант IgG2a) уменьшало патологию, связанную с TDP-43, на данной животной модели, по меньшей мере отчасти, путем рекрутинга и активации микроглии.

**Пример 11. *In vitro* функциональность ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a) в анализе агрегации рекомбинантного TDP-43**

Для оценки функциональности ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a) *in vitro* тестировали способность ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a) ингибировать агрегацию TDP-43. FL TDP-43 сливали на C-конце с мальтозосвязывающим белком

(MBP), который был разделен сайтом расщепления протеазами из вируса гравировки табака (TEV) и получен рекомбинантными методами. Агрегацию 2,5 мкМ слитого белка TDP-43-TEV-MBP в 30 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4, в присутствии 2,5 мкМ ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a) или изотипического контроля, который не связывался с TDP-43, индуцировали добавлением протеазы TEV (AcTEV, Invitrogen) и оптическую плотность отслеживали в 96-луночном микропланшете (Greiner) на 600 нм в течение 30 часов. В ходе оценки конечные точки нормализовали к изотипическому контролю и рассчитывали процент агрегированного TDP-43 для ACI-7069-633B12-Ab1. Антитело ACI-7069-633B12-Ab1 значимо ингибировало агрегацию TDP-43 на 98% по сравнению с изотипическим контролем (фиг. 4).

**Пример 12. Детекция и количественное определение TDP-43 в биожидкостях с ACI-7069-633B12-Ab1 (вариантом IgG2a) и ACI-7071-809F12-Ab1 (вариантом IgG2a)**

Способ: Разрабатывали иммуноанализ AlphaLISA на основе микрогранул PerkinElmer с применением ACI-7069-633B12-Ab1 (варианта IgG2a) и ACI-7071-809F12-Ab1 (варианта IgG2a). В случае образцов CSF в экспериментах по пиковому выделению производили линейность разведения. Затем измеряли концентрацию TDP-43 в разведенных образцах спинномозговой жидкости. Образцы готовили в белом 384-луночном микропланшете Optiplate™ и измеряли эмиссию на 615 нм как необработанное количество импульсов в AlphaLISA.

Результаты: в данном иммуноанализе количественно оценивали общий TDP-43 в образцах спинномозговой жидкости (CSF) от здоровых контрольных пациентов и пациентов с FTLD-TDP (семантической деменцией, C9orf72 или GRN) (фиг. 6). По результатам относительной количественной оценки среди различных пациентов в отношении TDP-43 в образцах спинномозговой жидкости от пациентов с FTLD-TDP с мутацией *GRN* наблюдали значимо более высокие уровни TDP-43 по сравнению со здоровыми контролями в трех независимых экспериментах (фиг. 6). По результатам относительной количественной оценки среди различных пациентов в отношении TDP-43 в образцах спинномозговой жидкости от пациентов с FTLD-TDP с мутацией *C9orf72* и семантической деменцией также наблюдали более высокие уровни TDP-43 по сравнению со здоровыми контролями в трех независимых экспериментах (фиг. 6).

**Пример 13. Связывание с патологическим TDP-43, оцениваемое по иммунному истощению в экстрактах головного мозга с FTD**

Для оценки эффективности антител в специфическом связывании агрегатов TDP-43 в нативном состоянии проводили эксперименты по иммуноистощению в экстрактах мозга с обогащенным уровнем патологического TDP-43.

Способ: нерастворимые фракции из посмертного мозга с FTD типа А (FTD-A) получали так, как описано в примере 7. Иммуноистощение осуществляли с применением магнитных микроносителей Dynabeads™, с белком G (Thermoscientific 10003D). После ресуспендирования в пробирке 130 мкл микроносителей переносили в 1,5-мл пробирку с низким связыванием. Микрогранулы дважды промывали посредством PBS с добавлением 0,05% Tween-20 с применением магнита для удаления надосадочной жидкости. Микрогранулы разделяли поровну в трех разных пробирках с низким связыванием. Антитела (ACI-7069-633B12-Ab1 (изотип IgG2a), ACI-7069-642D12-Ab1 (изотип IgG2a), контроль в форме мышиного IgG2a) разводили до 100 мкг/мл и добавляли по 100 мкл в каждую пробирку после удаления надосадочной жидкости (с помощью магнита). Смесь антител и микроносителей инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Комплекс микроносителей и антител промывали один раз посредством 500 мкл PBS-0,05% Tween-20 и один раз посредством PBS, затем ресуспендировали в 250 мкл PBS. Микроносители с антителами разделяли на две новые пробирки (120 мкл на пробирку). Нерастворимые фракции оттаивали на льду и обрабатывали ультразвуком в течение 30 секунд при амплитуде 30 на льду. После удаления надосадочной жидкости в каждую пробирку, содержащую микроносители с антителами, добавляли тридцать микрограмм материала головного мозга и инкубировали при температуре 4°C в течение ночи при непрерывном перемешивании вращением. Пробирки помещали на магнит и собирали надосадочную жидкость в виде иммуноистощенной фракции. Исходный материал и иммуноистощенный материал дополнительно анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Вестерн-блоттинг проводили так, как описано в примере 7. На дорожку загружали по двадцать мкл образцов. Иммуноблоттинг проводили с применением следующих антител: к общему TDP-43 (ACI-7069-633B12-Ab1, связанный с DyLight680), pTDP-43 (Biolegend, 829901), применяли в разведении 1:2000 и 1:1000 соответственно. Козье вторичное антитело к крысиным антителам (каталожный номер 925-32219) применяли в разведении 1:10000.

Результаты: ACI-7069-633B12-Ab1 и ACI-7069-642D12-Ab1 были способны специфически связывать и истощать TDP-43 и pTDP-43 из нерастворимых в саркозиле фракций, полученных из ткани головного мозга с FTD типа А, по сравнению с антителом

изотипического контроля (фиг. 7). Эти данные подтверждали свойство этих антител связываться с целями у пациентов-людей.

### **Литературные источники**

Arai et al., TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351 (2006) 602–611.

Buratti and Baralle, Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels, *FEBS Journal* 277 (2010) 2268–2281.

Brettschneider J et al., Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies, *Nature Rev. Neuroscience*, 2015, 109.

Brettschneider et al., Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis, *Ann Neurol.* 2013 July; 74(1): 20–38.

Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Val. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254.

Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)

Clynes et al., Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma *Proc. Nat'l Acad. sci. USA* 95:652-656 (1998)

Cohen et al., An acetylation switch controls TDP-43 function and aggregation propensity, *Nat Commun.* 6: 5845, 2015.

Cragg, M.S. et al., Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts, *Blood* 101:1045-1052 (2003)

Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents, *Blood* 103:2738-2743 (2004).

Cunningham and Wells, High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis, (1989) *Science*, 244: 1081-1085.

Duncan & Winter, The binding site for C1q on IgG, *Nature* 322:738-40 (1988)

Edelman, G.M. et al., The Covalent Structure of an Entire gammaG Immunoglobulin Molecule, *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969)

Feiler et al., TDP-43 is intercellularly transmitted across axon Terminals, *J. Cell Biol.* Vol. 211 No. 4 897–911.

Feneberg et al., Towards a TDP-43-Based Biomarker for ALS and FTL, *Molecular Neurobiology*, 2018; 55(10): 7789–7801.

Gazzano-Santoro et al., Engineered Antibodies with Increased Activity to Recruit Complement, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)

Gerngross, Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

Gerhardt et al., *Methods for General and Molecular Bacteriology*, ASM Press (1994).

Golemis, *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002).

Graham et al., Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J. Gen. Viral.* 36:59 (1977)

Guyer et al., Immunoglobulin binding by mouse intestinal epithelial cell receptors, *J. Immunol.* 117:587 (1976).

Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988).

Harlow and Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1999).

Hasegawa et al., Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, (2008) *Annals of Neurology* Vol 64 No 1, 60–70.

Hasegawa et al., Prion-like mechanisms and potential therapeutic targets in neurodegenerative disorders, *Pharmacol Ther.* 2017 Apr; 172:22-33.

Hellstrom, I. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986).

Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499- 1502 (1985).

Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).

Howard and Bethell. (2000) *Basic Methods in Antibody Production and Characterization*, Crc. Pr. Inc.

Idusogie et al., *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Ishii et al., Formation and spreading of TDP-43 aggregates in cultured neuronal and glial cells demonstrated by time-lapse imaging, *PLoS ONE* 12(6): e0179375, 2017.

Jones et al., Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, *Nature* 321 (1986), 522-525.

KA et al., TDP-43 is a key player in the clinical features associated with Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol.* 2014; 127(6): 811-824.

KA et al., Staging TDP-43 pathology in Alzheimer's disease *Acta Neuropathol.* 2014; 127(3): 441–450.

Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005).

Kanda Y. et al., *Bioteehnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006).

Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit. NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services (1991).

Kirn et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994).

Kohler, *Nature* 256 (1975), 495.

Khor, *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology Abstract* (1997), 847.

Lagier-Tourenne et al., TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration, *Human Molecular Genetics*, 2010, Vol. 19, Review Issue 1 R46-R64.

Lagier-Tourenne and Cleveland, Rethinking ALS: the FUS about TDP-43, *Cell* 136, 2009, 1001-1004.

Le Ber, Genetics of frontotemporal lobar degeneration: an up-date and diagnosis algorithm, *Revue Neurologique* 169 (2013) 811-819.

Lefkovits, *Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*; Academic Press (1997).

LoBuglio, *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology Abstract* (1997), 1562 .

Li et al., Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Mackenzie and Neumann, Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies, *J. Neurochem.* (2016) 138 (Suppl. 1), 54-70.

Mather, Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)

Mather et al., Culture of testicular cells in hormone-supplemented serum-free medium, *Annals N. Y Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)

McAleese et al., TDP-43 pathology in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and ageing, *Brain Pathol.* 2017 Jul; 27(4): 472-479.

Morris, *Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology* vol. 66(1996) (Humana Press, Totowa, NJ).

Nonaka et al., Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains, *Cell Reports* 4 (2013), 124–134.

Neumann et al., Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, *Science* 314, (2006), 130-133.

Neumann et al., Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies, *Acta Neuropathol.* (2009) 117: 137–149.

Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006).

Plückthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, N.Y. (1994), 269-315.

Porta S. et al., Patient-derived frontotemporal lobar degeneration brain extracts induce formation and spreading of TDP-43 pathology in vivo *Nat. Comm.*, 2018

Okazaki et al., Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and FcγRIIIa. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004).

Presta LG., Antibody engineering, *Curr Op Struct Biol* 2 (1992), 593-596.

Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)

Reichmann, Reshaping human antibodies for therapy, *Nature* 332 (1998), 323-327.

Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)

Ripka et al., Two Chinese hamster ovary glycosylation mutants affected in the conversion of GDP-mannose to GDP-fucose. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986).

Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition (1989) and 3rd edition (2001).

Shepherd and Dean (2000), *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach*, Oxford University Press

Shields et al., High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the FcγR, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

Spiller K.J et al., Microglia-mediated recovery from ALS-relevant motor neuron degeneration in a mouse model of TDP-43 proteinopathy, *Nature Neuroscience*, 2018

Ticozzi et al., Protein Aggregation and Defective RNA Metabolism as Mechanisms for Motor Neuron Damage, 9(3): 285 - 296 *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2010, 9(3), 285-296.

Urlaub et al., Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)

Verhoeyen et al., Reshaping human antibodies: Grafting an antilysozyme activity., *Science* 239 (1988), 1534-1536.

Walker et al., Neuropathologically mixed Alzheimer's and Lewy body disease: burden of pathological protein aggregates differs between clinical phenotypes, *Acta Neuropathol* (2015) 129:729–748

Wang et al., TDP-43: an emerging new player in neurodegenerative diseases *Trends in Molecular Medicine* Vol. 14 No. 11, 2008, 479-485.

Warraich et al., TDP-43: a DNA and RNA binding protein with roles in neurodegenerative diseases, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (2010)



1606–1609. Wright et al., Effect of glycosylation on antibody function. *TIBTECH* 15:26-32 (1997).

Yamane-Ohnuki et al., Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: An ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004).

Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Val. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Связывающая TDP-43 молекула, которая связывает неправильно свернутый агрегированный TDP-43 и неагрегированный физиологический TDP-43.
2. Связывающая TDP-43 молекула по п. 1, которая связывает неправильно свернутый агрегированный человеческий TDP-43 и неагрегированный физиологический человеческий TDP-43.
3. Связывающая TDP-43 молекула по п. 1 или п. 2, которая обладает одной или более, вплоть до всех из следующих характеристик:
  - a) ингибирует агрегацию белка TDP-43 или его фрагментов,
  - b) блокирует межклеточное распространение TDP-43,
  - c) разрушает агрегаты TDP-43; и
  - d) блокирует заправки TDP-43.
4. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая уменьшает патологию, связанную с TDP-43, в условиях *in vivo*.
5. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая снижает уровни агрегированного TDP-43 и/или фосфорилированного TDP-43 в условиях *in vivo*.
6. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая связывается с эпитопом в пределах аминокислотных остатков 181-195, 199-213, 307-321, 352-366, 389-411, 397-411 или 140-200 человеческого TDP-43 (SEQ ID NO: 1) или с эквивалентным эпитопом в отличном от человеческого TDP-43.
7. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая связывается с эпитопом в пределах аминокислотных остатков 183-188, 203-213, 204-208, 204-211, 205-210, 316-323, 358-361, 400- 405, 400-406 или 400-412 человеческого TDP-43 (SEQ ID NO: 1) или с эквивалентным эпитопом в отличном от человеческого TDP-43.
8. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая связывается с эпитопом в пределах аминокислотных остатков 400-405, 400-406 или 400-412 человеческого TDP-43 (SEQ ID NO: 1) или с эквивалентным эпитопом в отличном от человеческого TDP-43.
9. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
10. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая содержит:





16; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 127; или

j) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 141; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 142; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 143; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 146; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 147; или

k) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 151; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 152; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 153; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 155; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 156; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157.

11. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая содержит:

a. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 10, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 14, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14; или

b. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 20, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 20; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 24, или переменный участок легкой

цепи (VL), имеющий по меньшей мере 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; или

c. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 30, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 34, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34; или

d. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 40, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 40; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 44; или

e. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 60, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 64, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 64; или

f. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 70, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 70; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 74, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 99%

идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 74; или

g. вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 80, или вариабельный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 80; и вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 84, или вариабельный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 84; или

h. вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 100, или вариабельный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 100; и вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 104, или вариабельный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 104; или

i. вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 120, или вариабельный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 120; и вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 124, или вариабельный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 124; или

j. вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 140, или вариабельный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 140; и вариабельный участок легкой

цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 144; или

k. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 150, или переменный участок тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 150; и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 154, или переменный участок легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 154.

12. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая содержит:

- a. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 10, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 14; или
- b. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 20, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 24; или
- c. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 30, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 34; или
- d. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 40, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 44; или
- e. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 60, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 64; или
- f. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 70, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 74; или
- g. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 80, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 84; или
- h. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий



последовательность под SEQ ID NO: 100, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 104; или

- i. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 120, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 124; или
- j. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 140, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 144; или
- k. переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 150, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 154.

13. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая содержит VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность ES (Glu-Ser); VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27.

14. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая содержит переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 20, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 24.

15. Связывающая TDP-43 молекула по любому из пп. 1-12, которая содержит VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 81; VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82; и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 83; VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 85; VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 86; и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 87.

16. Связывающая TDP-43 молекула по любому из пп. 1-12 или п. 15, которая содержит переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 80, и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий последовательность под SEQ ID NO: 84

17. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

18. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая представляет собой мышинное, химерное, гуманизированное или человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

19. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов, которая представляет собой антитело IgA, IgD, IgE, IgM, IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 или IgG4 или его антигенсвязывающий фрагмент.

20. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов для применения в терапии и/или диагностике человека или ветеринарной терапии и/или диагностике.

21. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов для применения в терапии и/или диагностике человека или ветеринарной терапии и/или диагностике, причем связывающая TDP-43 молекула является диагностическим или терапевтическим инструментом.

22. Связывающая TDP-43 молекула по любому из пп. 1-19 для применения в исследованиях, в частности, в качестве аналитического инструмента или эталонной молекулы.

23. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов для применения при предупреждении, облегчении, лечении и/или диагностике заболеваний, расстройств и/или нарушений, связанных с TDP-43.

24. Связывающая TDP-43 молекула по любому из предыдущих пунктов для применения при предупреждении, облегчении, лечении и/или диагностике протеинопатии TDP-43.

25. Связывающая TDP-43 молекула для применения по п. 21 для применения в качестве диагностического инструмента для отслеживания протеинопатии TDP-43.

26. Связывающая TDP-43 молекула для применения по любому из пп. 23-25, причем заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, или протеинопатия TDP-43 представляют собой лобно-височную деменцию (FTD, такую как спорадическая или семейная с или без заболевания двигательных нейронов (MND), с мутацией програнулина (GRN), с мутациями C9orf72, с мутацией TARDBP, с мутацией валозин-содержащего белка (VCP), связанная с хромосомой 9p, кортикобазальная дегенерация, лобно-височная лобарная дегенерация (FTLD) с убиквитин-положительными включениями TDP-43 (FTLD-TDP), болезнь аргирофильного зерна, болезнь Пика, семантический вариант первичной прогрессирующей афазии (svPPA), поведенческий вариант FTD (bvFTD), не затрагивающий беглость речи вариант прогрессирующей афазии (pfvPPA) и др.), боковой амиотрофический склероз (ALS, такой как спорадический ALS, с

мутацией TARDBP, с мутацией ангиогенина (ANG)), болезнь Александра (AxD), связанную с TDP-43 возрастную энцефалопатию с преимущественным поражением лимбической системы (LATE), хроническую травматическую энцефалопатию, синдром Перри, болезнь Альцгеймера (AD, в том числе спорадические и семейные формы AD), синдром Дауна, семейную британскую деменцию, полиглутаминовые заболевания (болезнь Хантингтона и спинально-церебеллярную атаксию 3-го типа (SCA3; также известную как болезнь Мачадо-Джозефа)), деменцию с гиппокампальным склерозом и миопатии (спорадический миозит с тельцами включения, миопатию с тельцами включения с мутацией валозин-содержащего белка (VCP; также называемую болезнью Педжета костей и лобно-височной деменцией), окулофарингеальную мышечную дистрофию с окаймленными вакуолями, миофибриллярные миопатии с мутациями в гене миотилина (MYOT) или с мутациями в гене, кодирующем десмин (DES)), травму головного мозга (TBI), деменцию с тельцами Леви (DLB) или болезнь Паркинсона (PD).

27. Связывающая TDP-43 молекула для применения по п. 26, причем заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, или протеинопатия TDP-43 представляют собой лобно-височную деменцию (FTD), боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона (PD), хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ) или связанную с TDP-43 возрастную энцефалопатию с преимущественным поражением лимбической системы (LATE).

28. Связывающая TDP-43 молекула для применения по п. 26 или п. 27, причем заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, или протеинопатия TDP-43 представляют собой боковой амиотрофический склероз (ALS).

29. Связывающая TDP-43 молекула для применения по п. 26 или п. 27, причем заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, или протеинопатия TDP-43 представляют собой болезнь Альцгеймера (AD).

30. Связывающая TDP-43 молекула для применения по п. 26 или п. 27, причем заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, или протеинопатия TDP-43 представляют собой лобно-височную деменцию (FTD).

31. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающую TDP-43 молекулу по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

32. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая связывающую TDP-43 молекулу по любому из предыдущих пунктов.

33. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, изложенную как:

- a. последовательность, кодирующая переменный участок тяжелой цепи (VH), под SEQ ID NO: 18 и последовательность, кодирующая переменный участок легкой цепи (VL), под SEQ ID NO: 19; или
  - b. последовательность, кодирующая переменный участок тяжелой цепи (VH), под SEQ ID NO: 28 и последовательность, кодирующая переменный участок легкой цепи (VL), под SEQ ID NO: 29; или
  - c. последовательность, кодирующая переменный участок тяжелой цепи (VH), под SEQ ID NO: 38 и последовательность, кодирующая переменный участок легкой цепи (VL), под SEQ ID NO: 39; или
  - d. последовательность, кодирующая переменный участок тяжелой цепи (VH), под SEQ ID NO: 48 и последовательность, кодирующая переменный участок легкой цепи (VL), под SEQ ID NO: 49; или
  - e. последовательность, кодирующая переменный участок тяжелой цепи (VH), под SEQ ID NO: 68 и последовательность, кодирующая переменный участок легкой цепи (VL), под SEQ ID NO: 69; или
  - f. последовательность, кодирующая переменный участок тяжелой цепи (VH), под SEQ ID NO: 78 и последовательность, кодирующая переменный участок легкой цепи (VL), под SEQ ID NO: 79; или
  - g. последовательность, кодирующая переменный участок тяжелой цепи (VH), под SEQ ID NO: 88 и последовательность, кодирующая переменный участок легкой цепи (VL), под SEQ ID NO: 89; или
  - h. последовательность, кодирующая переменный участок тяжелой цепи (VH), под SEQ ID NO: 108 и последовательность, кодирующая переменный участок легкой цепи (VL), под SEQ ID NO: 109, или
  - i. последовательность, кодирующая переменный участок тяжелой цепи (VH), под SEQ ID NO: 128 и последовательность, кодирующая переменный участок легкой цепи (VL), под SEQ ID NO: 129; или
  - j. последовательность, кодирующая переменный участок тяжелой цепи (VH), под SEQ ID NO: 148 и последовательность, кодирующая переменный участок легкой цепи (VL), под SEQ ID NO: 149; или
  - k. последовательность, кодирующая переменный участок тяжелой цепи (VH), под SEQ ID NO: 158 и последовательность, кодирующая переменный участок легкой цепи (VL), под SEQ ID NO: 159.
34. Рекомбинантный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 32 или

35. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 32 или п. 33 и/или вектор по п. 34.
36. Клетка-хозяин, которая экспрессирует связывающую TDP-43 молекулу по любому из пп. 1-30.
37. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 32 или п. 33.
38. Бесклеточная система экспрессии, содержащая вектор экспрессии по п. 37.
39. Способ получения связывающей TDP-43 молекулы, в частности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предусматривающий следующие стадии:
- а) культивирование клетки-хозяина по п. 35 или п. 36 или бесклеточной системы экспрессии по п. 38 в условиях, подходящих для получения связывающей молекулы, в частности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и
  - б) выделение связывающей молекулы, в частности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.
40. Способ количественной оценки TDP-43 в образце, полученном от субъекта, при этом способ предусматривает приведение образца в контакт со связывающей TDP-43 молекулой по любому из пп. 1-30 и сравнение уровней TDP-43 в образце с уровнями в контрольном образце или контрольных образцах.
41. Способ диагностики заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или протеинопатии TDP-43, предусматривающий осуществление способа по п. 40, причем более высокие уровни TDP-43 в образце по сравнению с контрольным уровнем, основанным на здоровых субъектах, указывают на наличие заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или протеинопатии TDP-43.
42. Способ диагностики заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или протеинопатии TDP-43, предусматривающий осуществление способа по п. 40 или п. 41, причем схожие или более высокие уровни TDP-43 в образце по сравнению с пораженным заболеванием контролем указывают на наличие заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или протеинопатии TDP-43.
43. Способ классификации заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или классификации протеинопатии TDP-43, предусматривающий:
- а. осуществление способа по п. 41 и/или п. 42,
  - б. необязательно выявление мутаций в образце, в том числе без ограничения мутации програнулина (GRN), мутаций C9orf72, мутации TARDBP, с мутацией валозин-содержащего белка (VCP), мутации TARDBP, мутации ангиогенина

(ANG), мутации в валозин-содержащем белке (VCP), мутации в гене миотилина (MYOT) или мутаций в гене, кодирующем десмин (DES), и с. классификацию заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или протеинопатии TDP-43.

44. Способ классификации заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или классификации протеинопатии TDP-43, предусматривающий:

а. осуществление способа по п. 42 на образце, полученном от субъекта с заболеванием, расстройством и/или нарушением, связанным с TDP-43, или с протеинопатией TDP-43, причем сравнение с пораженным заболеванием контролем основано на множестве контрольных образцов от субъектов с различными типами или подтипами заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или с протеинопатией TDP-43; и

б. классификацию заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или протеинопатии TDP-43 по результатам сравнения.

45. Способ отслеживания заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или отслеживания протеинопатии TDP-43 в двух или более временных точках с применением образцов от субъекта, при этом способ предусматривает приведение образцов в контакт со связывающей TDP-43 молекулой по любому из пп. 1-30, причем более высокие уровни TDP-43 в более позднем образце по сравнению с одним или более более ранними образцами указывают на прогрессировании заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или протеинопатии TDP-43.

46. Способ отслеживания заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или отслеживания протеинопатии TDP-43 в двух или более временных точках с применением образцов от субъекта, при этом способ предусматривает приведение образцов в контакт со связывающей TDP-43 молекулой по любому из пп. 1-30, причем более низкие уровни TDP-43 в более позднем образце по сравнению с одним или более более ранними образцами указывают на регрессию заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или протеинопатии TDP-43.

47. Способ отслеживания лечения заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или отслеживания лечения протеинопатии TDP-43 в двух или более временных точках с применением образцов от субъекта, проходящего лечение конкретной терапией, при этом способ предусматривает приведение образцов в контакт со связывающей TDP-43 молекулой по любому из пп. 1-30, причем более низкие уровни TDP-43 в более позднем образце по сравнению с одним или более более ранними образцами указывают на успешное лечение заболевания, расстройства и/или нарушения,

связанных с TDP-43, или протеинопатии TDP-43.

48. Способ по любому из пп. 45-47, причем первая временная точка предшествует лечению с помощью терапии, а вторая временная точка приходится на период после лечения с помощью терапии.

49. Способ выбора терапии для лечения заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или выбора терапии для лечения протеинопатии TDP-43, при этом способ предусматривает приведение образцов, взятых до и после лечения терапией, в контакт со связывающей TDP-43 молекулой по любому из пп. 1-30, причем более низкие уровни TDP-43 в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, указывают на успешное лечение заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или протеинопатии TDP-43, и таким образом производят выбор терапии для лечения.

50. Способ по п. 49, причем терапия предусматривает применение связывающей TDP-43 молекулы по любому из пп. 1-30 или фармацевтической композиции по п. 31.

51. Способ по любому из пп. 40-50, причем образец представляет собой образец крови, CSF, ISF или мочи.

52. Способ по любому из пп. 40-51, причем заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, или протеинопатия TDP-43 представляют собой лобно-височную деменцию (FTD, такую как спорадическая или семейная с или без заболевания двигательных нейронов (MND), с мутацией програнулина (GRN), с мутациями C9orf72, с мутацией TARDBP, с мутацией валозин-содержащего белка (VCP), связанная с хромосомой 9p, кортикобазальная дегенерация, лобно-височная лобарная дегенерация (FTLD) с убиквитин-положительными включениями TDP-43 (FTLD-TDP), болезнь аргирофильного зерна, болезнь Пика, семантический вариант первичной прогрессирующей афазии (svPPA), поведенческий вариант FTD (bvFTD), не затрагивающий беглость речи вариант прогрессирующей афазии (nvPPA) и др.), боковой амиотрофический склероз (ALS, такой как спорадический ALS, с мутацией TARDBP, с мутацией ангиогенина (ANG)), болезнь Александра (AxD), связанную с TDP-43 возрастную энцефалопатию с преимущественным поражением лимбической системы (LATE), хроническую травматическую энцефалопатию, синдром Перри, болезнь Альцгеймера (AD, в том числе спорадические и семейные формы AD), синдром Дауна, семейную британскую деменцию, полиглутаминовые заболевания (болезнь Хантингтона и спинально-церебеллярную атаксию 3-го типа (SCA3; также известную как болезнь Мачадо-Джозефа)), деменцию с гиппокампальным склерозом и миопатии (спорадический миозит с тельцами включения, миопатию с тельцами включения с мутацией валозин-

содержащего белка (VCP; также называемую болезнью Педжета костей и лобно-височной деменцией), окулофарингеальную мышечную дистрофию с окаймленными вакуолями, миофибриллярные миопатии с мутациями в гене миотилина (MYOT) или с мутациями в гене, кодирующем десмин (DES)), травму головного мозга (ТВИ), деменцию с тельцами Леви (DLB) или болезнь Паркинсона (PD).

53. Способ по п. 52, причем заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, или протеинопатия TDP-43 включают лобно-височную деменцию (FTD), боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Альцгеймера. (AD), болезнь Паркинсона (PD), хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ) или связанную с TDP-43 возрастную энцефалопатию с преимущественным поражением лимбической системы (LATE).

54. Способ по п. 52, причем заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, или протеинопатия TDP-43 представляют собой боковой амиотрофический склероз (ALS).

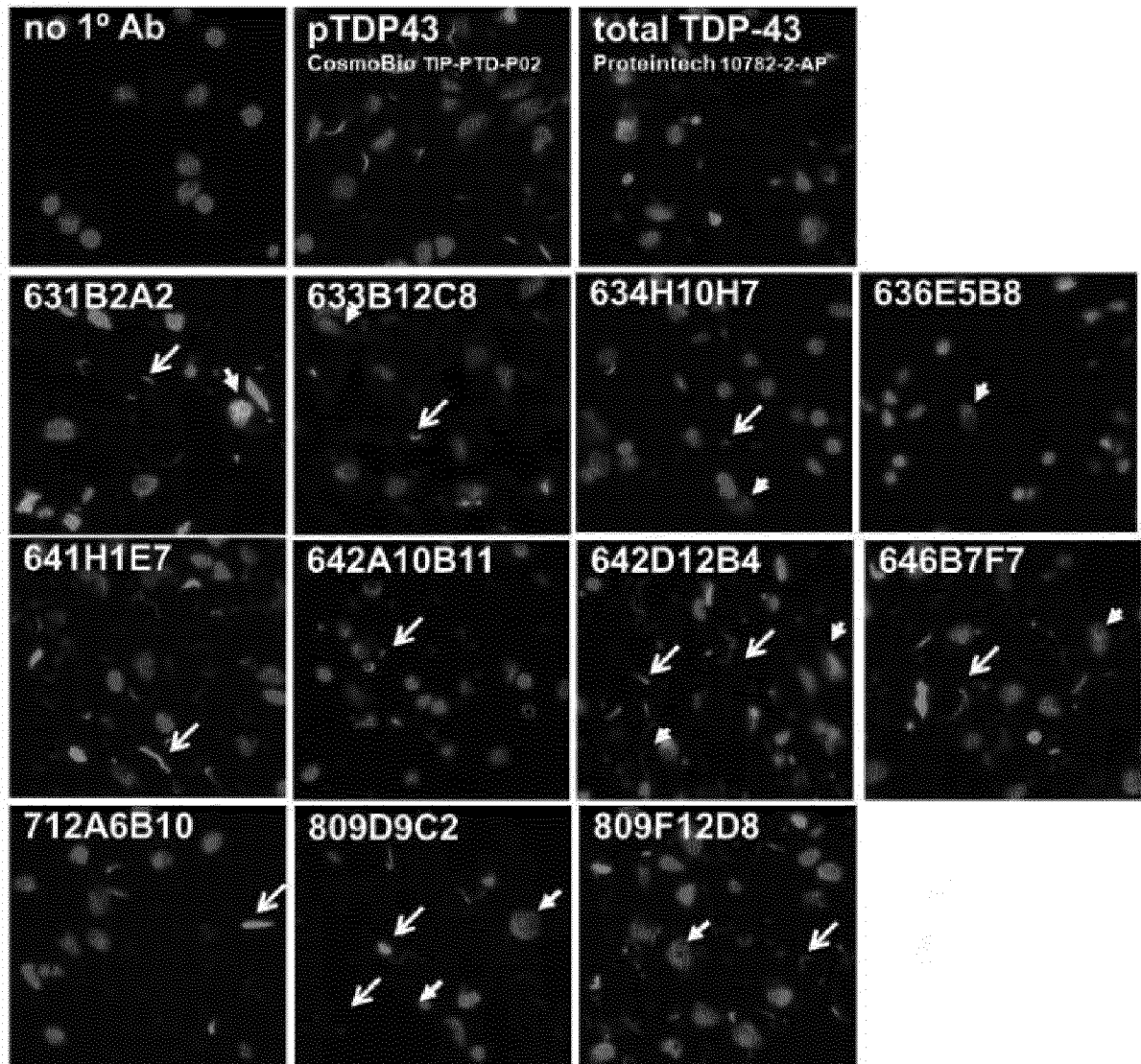
55. Способ по п. 52, причем заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, или протеинопатия TDP-43 представляют собой болезнь Альцгеймера (AD).

56. Способ по п. 52, причем заболевание, расстройство и/или нарушение, связанные с TDP-43, или протеинопатия TDP-43 представляют собой лобно-височную деменцию (FTD).

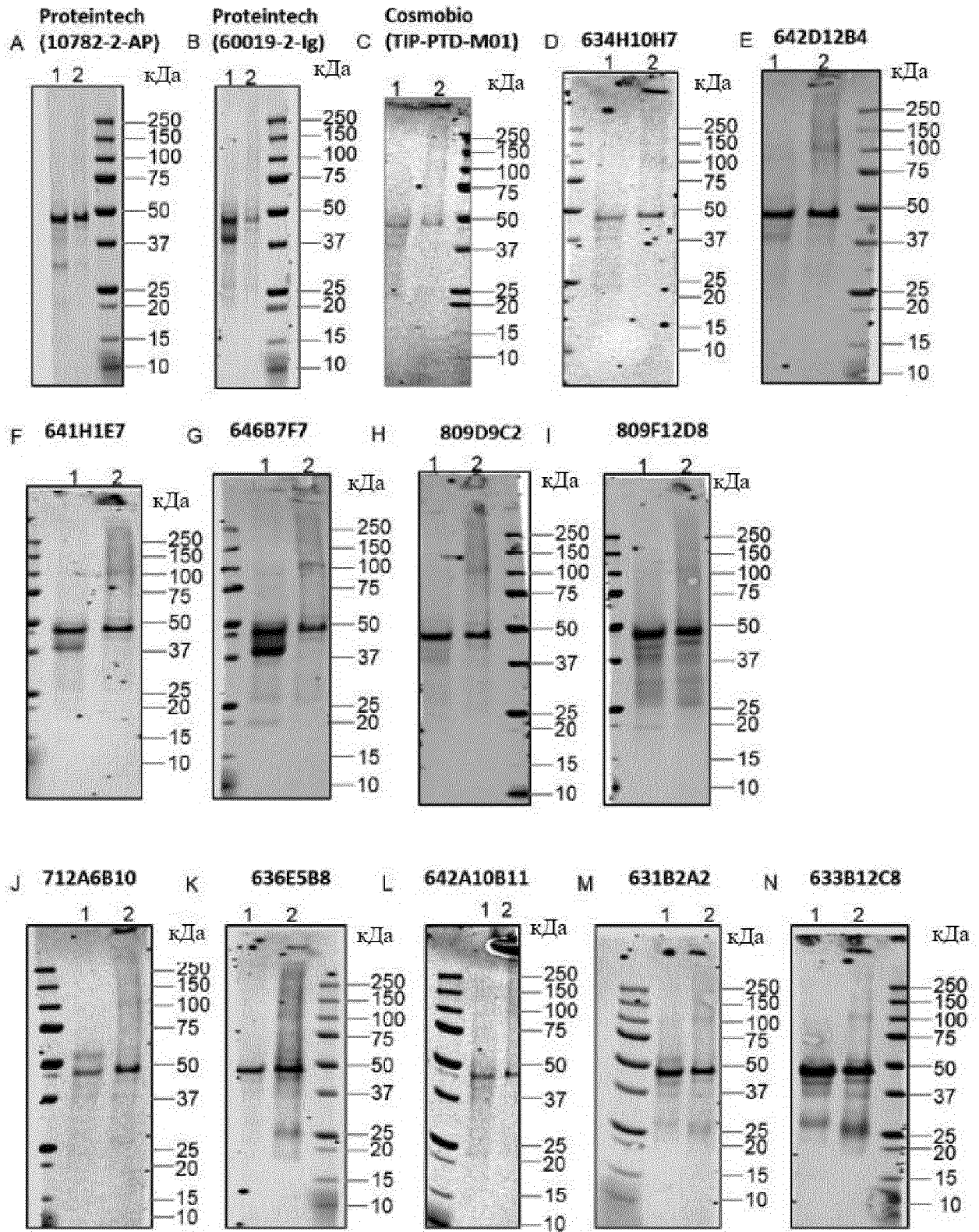
57. Набор для диагностики заболевания, расстройства и/или нарушения, связанных с TDP-43, или протеинопатии TDP-43 или для применения в способе по любому из пп. 40-56, содержащий связывающую TDP-43 молекулу по любому один из пп. 1-30.



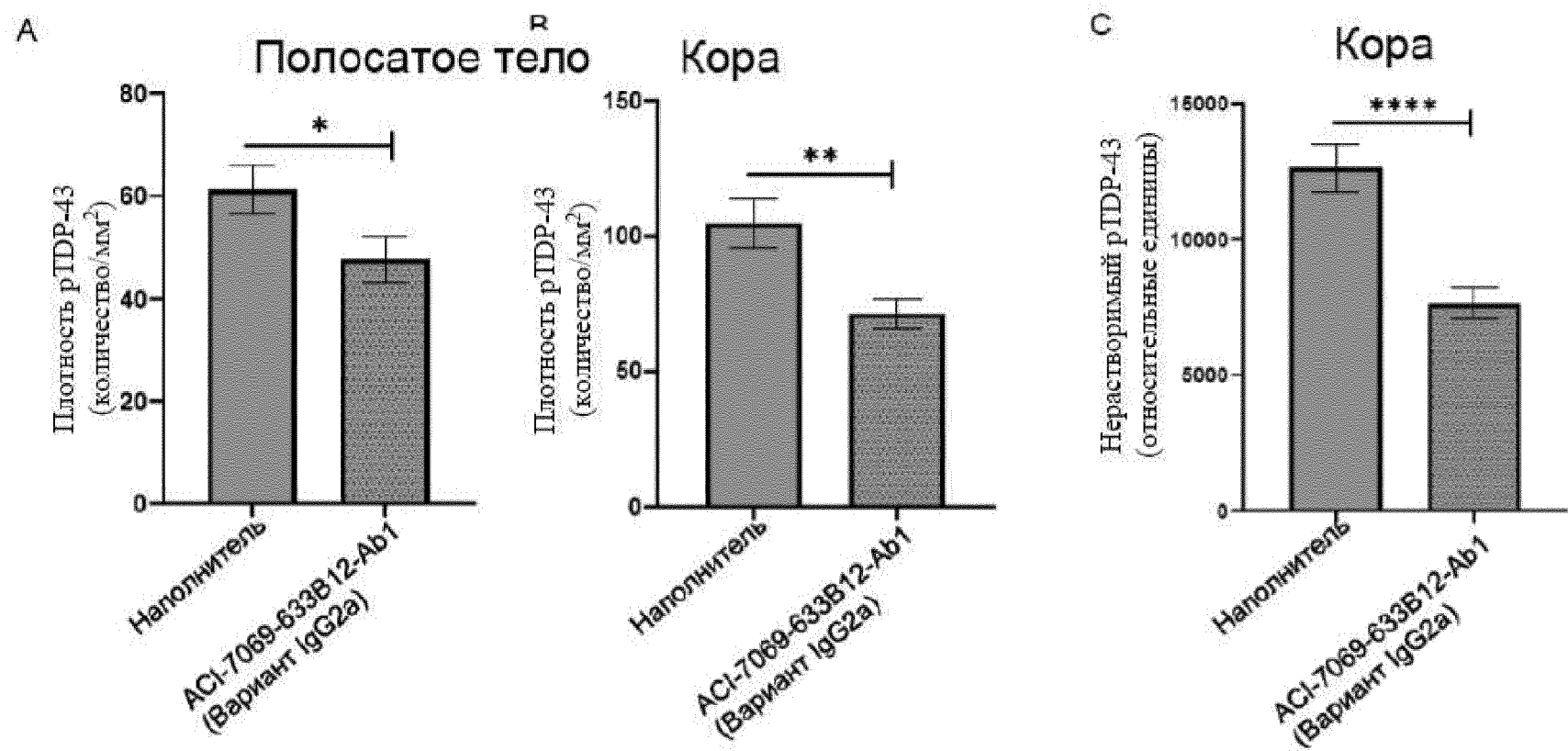
Фиг. 1



Фиг. 2

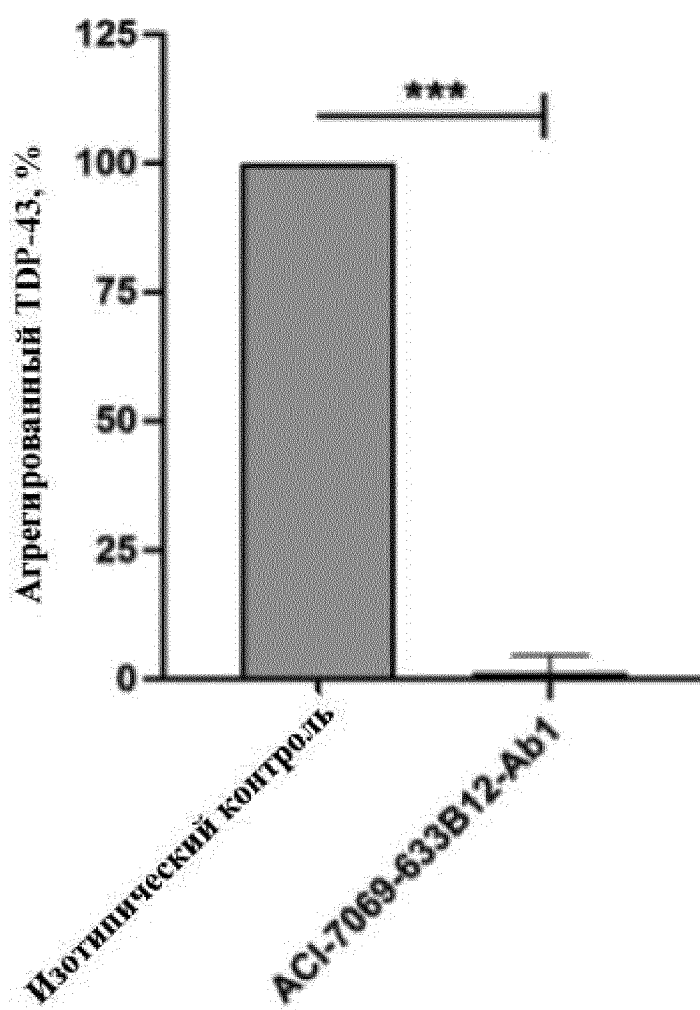


Фиг. 3



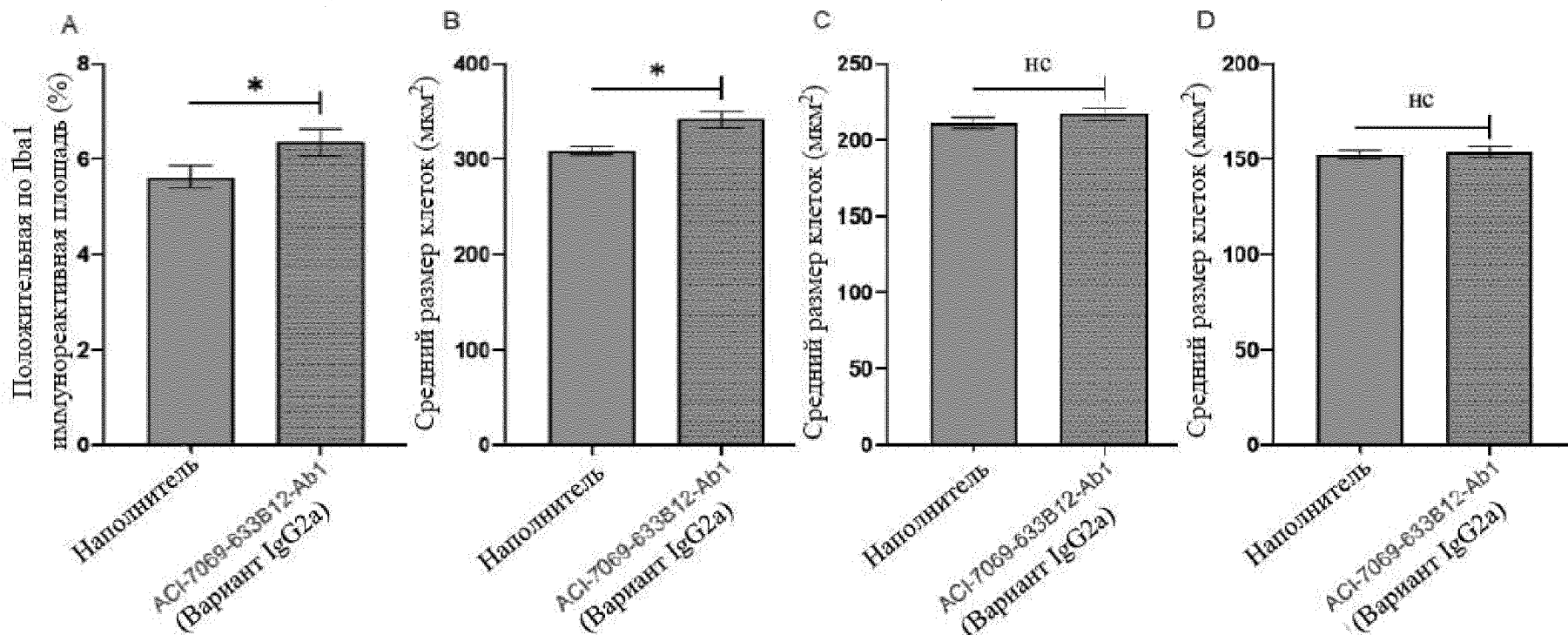
**Фиг. 4**

Нормализованная к изотипическому контролю агрегация, %



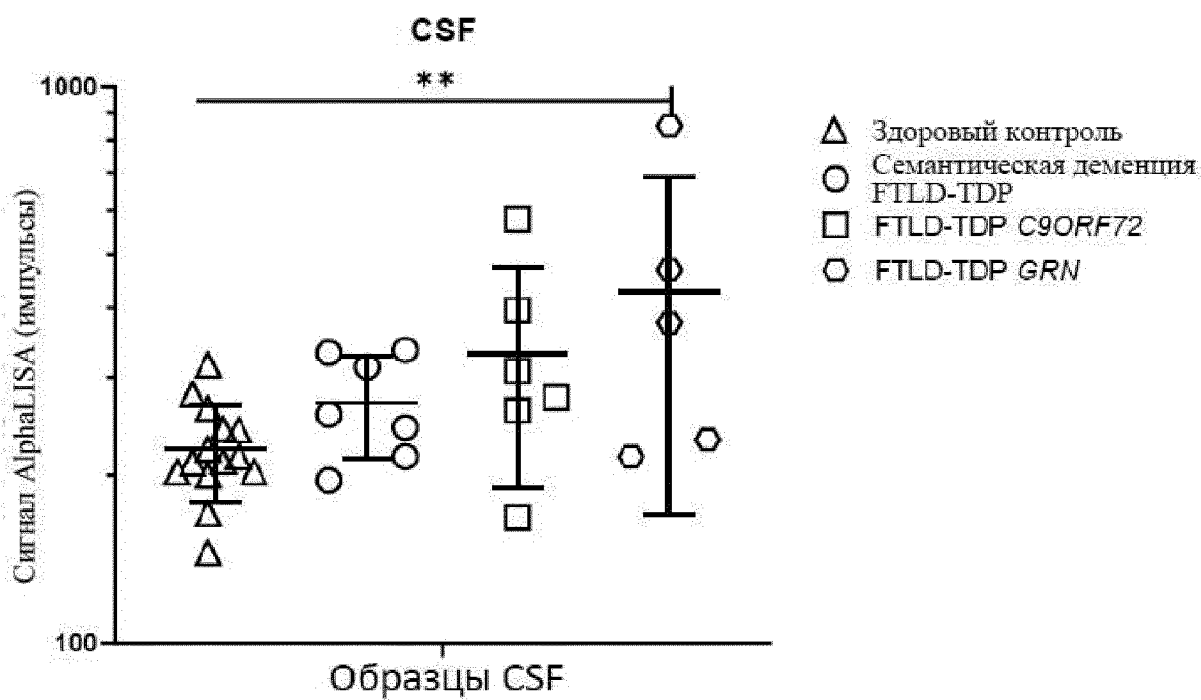
Фиг. 5

Количественная оценка окрашивания Iba1 иммуногистохимическим методом в коре головного мозга

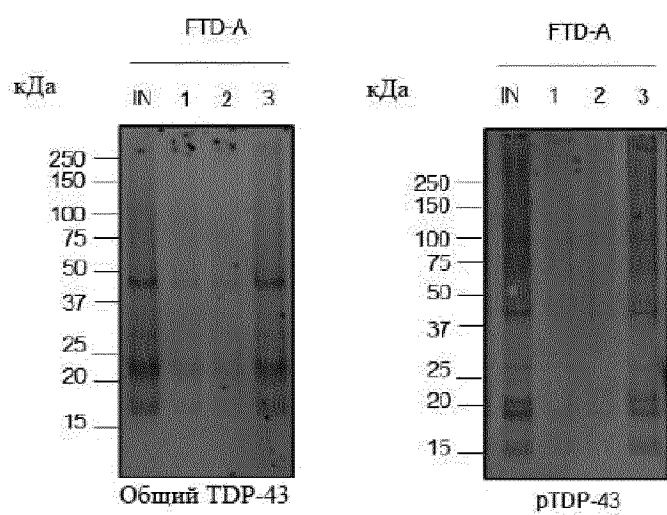


Фиг. 6

Количественная оценка TDP-43 в CSF



Фиг. 7



IN: ввод экстракта головного мозга с FTD  
Иммуноистощенные экстракты головного  
мозга с:

- 1: ACI-7069-633B12-Ab1 (вариант IgG2a)
- 2: ACI-7069-642D12-Ab1 (вариант IgG2a)
- 3: Изотипический контроль IgG2a