

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392731 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.31(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2020.06.15(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО К α -SYN/IGF1R И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 10-2019-0071057

(74) Представитель:

(32) 2019.06.14

Бильк А.В., Поликарпов А.В.,

(33) KR

Соколова М.В., Путинцев А.И.,

(62) 202193058; 2020.06.15

Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев

(71) Заявитель:

А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.

ЭЙБИЭЛ БИО ИНК. (KR)

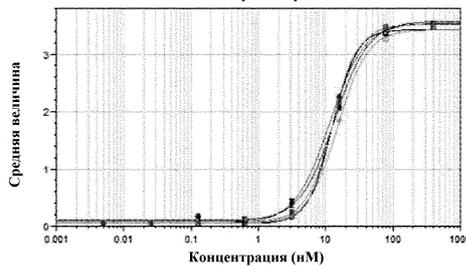
(RU)

(72) Изобретатель:

Ан Сонвон, Ан Чжинхён, Сон Бёндже,
Ким Донин, Сон Дэхе, Ом Джехён, Сон
Ён-Гю, Пак Кёнджин, Ким Джухи,
Чон Джинвон, Ли Бора, Юн Хесу (KR)

(57) Настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, которое специфически связывается с альфа-синуклеином и рецептором инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R), и применению биспецифического антитела для предупреждения, лечения и/или диагностики синуклеинопатии, которая представляет собой заболевание, ассоциированное с альфа-синуклеином или его агрегатами. Данное биспецифическое антитело способствует прохождению антитела к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающего фрагмента через гематоэнцефалический барьер и проявлению действия антитела или фрагмента в головном мозге, что продлевает период его полувыведения с поддержанием эффективности в течение длительного времени.

Стандартная кривая



4-парам. аппрокс.: $y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$:	A	B	C	D	R ²
График №1 (h11F11(-RD): средн. вел. от конц-н)	0,0493	2,44	12,5	3,43	1
График №3 (h11F11(вер.1): средн. вел. от конц-н)	0,0532	1,69	11,5	3,55	1
График №4 (h11F11(вер.2): средн. вел. от конц-н)	0,047	1,96	15,1	3,43	1
График №5 (h11F11(вер.3): средн. вел. от конц-н)	0,0958	1,71	13,4	3,58	0,999
График №6 (h11F11(вер.4): средн. вел. от конц-н)	0,0791	2,18	12,9	3,52	1

A1

202392731

202392731

A1

БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО К α -SYN/IGF1R И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу к альфа-синуклеину и рецептору инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R), фармацевтической композиции для предупреждения и/или лечения синуклеинопатий (α -синуклеинопатий), содержащей данное биспецифическое антитело, и способу детектирования агрегатов альфа-синуклеина или предоставления информации для диагностики альфа-синуклеинопатий, в том числе с применением данного биспецифического антитела.

РОДСТВЕННЫЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Альфа-синуклеин (α -синуклеин, α -syn) экспрессируется в основном в пресинаптических окончаниях нейронов и в нормальных естественных условиях представляет собой развернутый мономер. Альфа-синуклеин помогает регулировать высвобождение дофамина, который является своего рода важным нейромедиатором, регулирующим иницирование и остановку произвольных или непроизвольных движений. В частности, функционирование альфа-синуклеина важно при повышении синаптической активности и старении и является важным фактором нейродегенерации.

Однако, при патологическом состоянии альфа-синуклеин претерпевает структурные изменения в результате связывания и взаимодействия с везикулами, фосфолипидными бислоями или липидными мембранами с образованием свернутой или свернутой α -спиральной вторичной структуры. На основе такой вторичной структуры образуются агрегаты, содержащие молекулы в форме димеров и олигомеров, и/или волокна.

Эти агрегаты альфа-синуклеина, как известно, являются токсичными для клеток и представляют собой основной компонент аномальных белковых агрегатов телец Леви, которые обнаруживаются в нейронах при болезни Паркинсона (PD), деменции, обусловленной болезнью Паркинсона (PDD), множественной системной атрофии (MSA), деменции с тельцами Леви (DLB) и различных заболеваниях. Кроме того, известно, что посттрансляционные модификации альфа-синуклеина, такие как фосфорилирование или убиквитинилирование, также ассоциированы с агрегацией и нейротоксичностью альфа-синуклеина. Альфа-синуклеин, как известно, обуславливает гибель дофаминовых нейронов и вызывает воспалительные реакции в экспериментах с

животными и экспериментах с клетками и приводит к появлению у экспериментальных животных двигательных симптомов, аналогичных болезни Паркинсона. Помимо этого, известно, что агрегация альфа-синуклеина связана с этиологией группы нейродегенеративных заболеваний, называемых α -синуклеинопатиями, включая болезнь Паркинсона, деменцию, обусловленную болезнью Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, множественную системную атрофию и многие другие нейроаксональные заболевания.

В качестве способов иммунотерапии вызываемых синуклеином заболеваний предложено применение антител к альфа-синуклеину или фрагментам альфа-синуклеина, использованным для индуцирования таких антител. Однако, проникновение антител в головной мозг может быть ограничено гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ).

Кроме того, дефицит высоко специфичных переносчиков через ГЭБ привел к задержке разработки новых терапевтических и диагностических средств для лечения и диагностики заболеваний, возникающих в головного мозга, включая опухоли головного мозга и нейродегенеративные заболевания. Существует отчетливая потребность в способе доставки терапевтических и диагностических молекул в фармацевтически эффективной дозе в головной мозг без нарушения физиологии и гомеостаза ГЭБ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА

В одном из воплощений настоящего изобретения предложено антитело, содержащее антигенсвязывающий участок к альфа-синуклеину (α -Syn) и антигенсвязывающий участок к IGF1R, или способ получения данного антитела.

В другом воплощении предложены полинуклеотид, кодирующий антитело, рекомбинантный вектор, содержащий указанное выше, и рекомбинантная клетка, содержащая указанное выше.

В следующем воплощении предложена фармацевтическая композиция для предупреждения и/или лечения альфа-синуклеинопатии, содержащая биспецифическое антитело к α -Syn и IGF1R и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Предложен способ доставки в головной мозг лекарственных средств, применяемых для диагностики, лечения или предупреждения альфа-синуклеинопатий, с использованием антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению.

В одном из воплощений настоящего изобретения предложено антитело к IGF1R (рецептору инсулиноподобного фактора роста 1) или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) может специфически распознавать IGF1R без воздействия на связывание с лигандом IGF1R и вызывать транцитоз без ингибирования передачи сигнала через IGF1R.

В другом воплощении предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

В другом воплощении предложена композиция для доставки физиологически активного вещества через гематоэнцефалический барьер, содержащая антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен переносчик через гематоэнцефалический барьер, в котором антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению доставляет физиологически активное вещество, например физиологически активное вещество, действующее в головном мозге, которое проходит через гематоэнцефалический барьер в мозг с участием IGF1R.

В другом воплощении предложен белковый комплекс, доставляемый в головной мозг с прохождением через гематоэнцефалический барьер, где антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению образует конъюгат с физиологически активным веществом, например, физиологически активным веществом, действующим в головном мозге.

В другом воплощении предложен способ детектирования IGF1R в биологическом образце, включающий стадию предоставления антитела к IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению и приведения в контакт данного антитела к IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента с биологическим образцом, подлежащим детектированию на предмет экспрессии IGF1R.

В одном из воплощений предложен способ доставки физиологически активного вещества, применяемого для диагностики, лечения или предупреждения заболевания головного мозга, которое проходит через ГЭБ в головной мозг, путем использования антитела к IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению.

ТЕХНИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно.

В данном описании термин «антитело» означает полноразмерный иммуноглобулин любого изотипа или антигенсвязывающий фрагмент, который может конкурировать с полноразмерным антителом за связывание с целевым антигеном. Например, он включает в себя химерные, гуманизированные, полностью человеческие или биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Антитело само по себе является одним из видов антигенсвязывающих белков. Как правило, полноразмерное антитело содержит по меньшей мере две (2) полноразмерные тяжелые цепи и две (2) полноразмерные легкие цепи, но в некоторых случаях, антитело может содержать только тяжелые цепи. Антитела включают моноспецифические антитела, которые специфически связываются с одной мишенью, и мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела и триспецифические антитела), которые специфически связываются с несколькими мишенями.

Антитело также включает моноклональное антитело и поликлональное антитело, и моноклональное антитело может представлять собой выделенное антитело, которое специфически связывается с IGF1R, такое как человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело. Моноклональное антитело представляет собой выделенное антитело, специфически связывающееся с IGF1R, в форме антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 подтипа.

В данном описании «легкая цепь» включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность вариабельной области для обеспечения достаточной специфичности связывания с антигеном или эпитопом. Полноразмерная легкая цепь содержит вариабельную область (VL) и константную область (CL). Вариабельная область легкой цепи присутствует на N-конце полипептида легкой цепи. Типы легкой цепи включают каппа- и лямбда-цепи.

Использованный в данном описании термин «определяющие комплементарность участки (CDR)» относится к участку, который придает вариабельным областям антитела специфичность связывания с антигеном.

В данном описании «тяжелая цепь» включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность вариабельной области для обеспечения достаточной специфичности связывания с антигеном или эпитопом. Полноразмерная тяжелая цепь содержит вариабельную область (VH) и три (3) домена константной области CH1, CH2 и CH3. Домен VH присутствует на N-конце полипептида тяжелой цепи, а домены CH присутствуют на карбоксил-содержащем конце, и ближе всех к C-

концу располагается СНЗ. Тяжелая цепь присутствует в IgG (в том числе подтипах IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 и IgG4), IgA (в том числе подтипах IgA1 и IgA2) и изотипах IgM и IgE.

Антитело может быть выбрано из иммуноглобулинов всех подтипов (например, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM и т.д.). Антитело в форме IgG может иметь подтип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, например, подтип IgG1 или IgG2. Антитело IgG типа содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, и каждая тяжелая цепь и каждая легкая цепь объединены через дисульфидные связи с образованием двух димеров тяжелая цепь-легкая цепь, и такие образованные две тяжелые цепи-легкие цепи связаны через дисульфидную связь в Fc-области тяжелой цепи. Антитело в форме IgG представляет собой одно целевое антитело, направленно воздействующее на один антиген, включающее антигенсвязывающие сайты для того же антигена в обеих конструкциях тяжелая цепь-легкая цепь, или биспецифическое антитело, направленно воздействующее на два антигена, включающее антигенсвязывающие сайты для разных антигенов в конструкциях тяжелая цепь-легкая цепь.

Антитела по настоящему изобретению включают биспецифические антитела, полноразмерные антитела, миниантитела, однодоменные антитела, миметики антител (или синтетические антитела), слитые конструкции на основе антител (или конъюгаты на основе антител), их фрагменты и их комбинации, но этим не ограничиваются. Структуры различных антител дополнительно описаны в данной заявке ниже.

В настоящем изобретении, например, «вариант» полипептида, такой как антигенсвязывающий фрагмент, белок или антитело, представляет собой полипептид, в последовательности которого произведены вставка, делеция, добавление и/или замена одного или нескольких аминокислотных остатков по сравнению с другими полипептидными последовательностями, и который включает слитые полипептиды. Например, некоторые из антител имеют консервативные аминокислотные замены в одном или более остатках тяжелой или легкой цепи, варибельной области или последовательности CDR.

Термин «производное» полипептида, использованный в настоящем изобретении, означает полипептид, химически модифицированный посредством конъюгирования с другими химическими группировками и отличающийся от вариантов со вставками, делециями, добавлениями или заменами.

Антитела по настоящему изобретению можно получить и выделить из трансгенных мышей, например, описанные выше антитела, при этом мышам вводят ген, кодирующий антигенспецифические человеческие моноклональные антитела (mAb), обладающие желаемой специфичностью, используя гибридомную технологию. Такие антитела могут быть клонированы и экспрессированы с использованием соответствующих векторов и клеток хозяина, или антитела могут быть выделены из культивированных гибридомных клеток. Помимо этого, антитело может происходить из библиотеки фагового дисплея. Метод фагового дисплея представляет собой метод, который имитирует своего рода иммунный отбор путем выбора репертуара антител на поверхности нитчатого бактериофага и отбора из него фага, связанного с желаемым антигеном. Такой метод может относиться к воплощению настоящей заявки или WO1999/010494. В одном из воплощений гуманизованное антитело к IGF1R по настоящему изобретению отобрано с применением метода фагового дисплея.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может происходить либо только из одного источника, либо представлять собой химерное антитело. Химерное антитело содержит часть, происходящую из антител двух разных видов, и описывается более подробно ниже. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно получить с использованием гибридомы, метода рекомбинантной ДНК или разрезания интактного антитела ферментативным или химическим путем. Если в данном описании не указано иное, то термин «антитело» включает в себя антитела, содержащие 2 полноразмерные тяжелые цепи и 2 полноразмерные легкие цепи, и их производные, варианты, фрагменты и мутантные формы, и их примеры описаны ниже.

Как использовано в данном описании, «антигенсвязывающий фрагмент» включает часть антитела, которая может специфически связываться с антигеном, или полипептид, включающий эту часть. Например, антигенсвязывающий фрагмент включает часть антитела, содержащую аминокислотные остатки, которые придают специфичность и аффинность данному антителу вследствие взаимодействия с антигеном (например, эпитопом), и полипептид, включающий эту часть. Такие фрагменты содержат по меньшей мере один CDR, присутствующий в полноразмерной легкой или тяжелой цепи, и в некоторых воплощениях содержат одну тяжелую и/или легкую цепь или ее часть. Этот биологически активный фрагмент может быть получен методом рекомбинантной ДНК или может быть получен, например, в результате разрезания интактного антитела ферментативным или химическим путем.

Иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина включает Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменное антитело и одноцепочечные антитела (например, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), scFv-Fc и т.д.), но этим не ограничивается, и может происходить из любого млекопитающего, включая человека, мышь, крысу, верблюда или кролика, но этим не ограничивается. Функциональная часть антитела, такая как один или несколько CDR, описанных в данной заявке, может быть присоединена к вторичному белку или низкомолекулярному соединению ковалентной связью и может быть использована в качестве целевого терапевтического агента для конкретной мишени.

В данном описании «одноцепочечное антитело» представляет собой одну полипептидную цепь, содержащую антигенсвязывающий участок, образованную в результате соединения переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи через гибкий линкер. Например, одноцепочечное антитело может представлять собой по меньшей мере одно антитело, выбранное из группы, состоящей из scFv, в котором в форме одной цепи связаны переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи, scFv-Fc, в котором в форме одной цепи связаны переменная область тяжелой цепи, переменная область легкой цепи и Fc, и тому подобное. Одноцепочечное антитело упоминается, например, в патенте США № 5260203.

В данном описании «аффинность» или «степень аффинности» отражает силу взаимодействия между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и антигеном и может определяться свойствами антигена, такими как размер, форма и/или заряд антигена, и последовательностями CDR и/или физико-химическими свойствами (гидрофильными/гидрофобными свойствами, электростатическими свойствами и т.д.) антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Способы определения аффинности известны в данной области техники, и обычно аффинность указывают в виде константы диссоциации (K_D), но этим не ограничиваются.

В случае полноразмерных форм легкой цепи и тяжелой цепи переменная область и константная область соединены областью «J» длиной примерно 12 или более аминокислот, а тяжелая цепь также включает область «D» длиной примерно 10 или более аминокислот. Например, можно сослаться на *Fundamental Immunology*, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press. Обычно, переменные области пары легкая цепь-тяжелая цепь в антителе могут образовывать антигенсвязывающий участок.

Одно из воплощений настоящего изобретения относится к антителу, содержащему антигенсвязывающий участок для альфа-синуклеина (α -syn) и антигенсвязывающий участок для IGF1R, конкретно к биспецифическому антителу к альфа-синуклеину (α -syn) и IGF1R (далее, биспецифическому антителу к α -syn/IGF1R). Соответственно, биспецифическое антитело по настоящему изобретению может распознавать в качестве антигенов как альфа-синуклеин, так и IGF1R и связываться с ними обоими.

Биспецифическое антитело к α -syn/IGF1R по настоящему изобретению включает антитело к α -syn и его антигенсвязывающий фрагмент и может распознавать альфа-синуклеин и связываться с ним, особенно с С-концевым участком альфа-синуклеина, и таким образом может быть использовано для предупреждения, лечения и/или диагностики синуклеинопатий, которые ассоциированы с альфа-синуклеином или агрегатами альфа-синуклеина.

В данном описании «бивалентный антигенсвязывающий белок» или «бивалентное антитело» содержит два антигенсвязывающих сайта. Два антигенсвязывающих сайта, содержащиеся в таком бивалентном антителе, могут иметь одинаковую антигенную специфичность или могут относиться к биспецифическому антителу, связывающемуся с разными антигенами, соответственно. В данном описании «мультиспецифический антигенсвязывающий белок» или «мультиспецифическое антитело» направленно воздействуют на два или более антигенов или эпитопов.

В данном описании «биспецифический(ое)» антигенсвязывающий(ее) белок или антитело или «с двойной специфичностью» представляет собой гибридный(ое) антигенсвязывающий(ее) белок или антитело, имеющий(ее) 2 разных антигенсвязывающих сайта. Такое биспецифическое антитело представляет собой один из видов мультиспецифического антигенсвязывающего белка или мультиспецифического антитела, и его получение может быть осуществлено различными известными способами, например, такими, как слияние гибридомы или связывание фрагмента Fab'. Например, можно сослаться на Songsivilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 1990, 79: 315-321; Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 1992, 148: 1547-1553 и тому подобное. Два отличающихся друг от друга эпитопа, с которыми связываются два антигенсвязывающих сайта биспецифического антигенсвязывающего белка или антитела, могут быть расположены на одном или разных белках-мишенях. В одном из воплощений антитело по настоящему изобретению может быть в форме

биспецифического антитела, которое дополнительно характеризуется связыванием с носителем, используемым для доставки антитела через гематоэнцефалический барьер. Один из способов доставки лекарственных средств через гематоэнцефалический барьер включает применение таких систем доставки, как рецептор-опосредованный трансцитоз, как например, с использованием переносчика глюкозы, переносчика аминокислот, инсулинового рецептора или трансферринового рецептора в клетке.

Согласно настоящему изобретению термин «синуклеинопатии» включает в себя все нейродегенеративные расстройства, характеризующиеся наличием патологических агрегатов синуклеина. Болезнь Паркинсона, деменция, обусловленная болезнью Паркинсона (PDD), деменция с тельцами Леви (DLB), болезнь с тельцами Леви, деменция, сопровождающаяся тельцами Леви, синдром Паркинсона с деменцией, множественная системная атрофия (MSA), множественная атрофия нервной системы и нейродегенерация I типа с накоплением железа в головном мозге (NBIA I типа) сгруппированы вместе как синуклеинопатии. Кроме того, агрегаты альфа-синуклеина также были вторично обнаружены при болезни Альцгеймера (Kim et al. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2014, 6: 73).

Синуклеинопатии представляют собой разнородную группу нейродегенеративных расстройств со сходными патологическими признаками. В нейропатологическом аспекте, можно обнаружить отчетливые очаги в форме аномальных агрегатов альфа-синуклеина в отдельных группах нейронов и олигодендроцитов. Альфа-синуклеин (ранее известный как PARK1 и PARK4) представляет собой белок, содержащий 140 аминокислот, который широко экспрессируется в неокортексе, гиппокампе, зубчатой извилине, задней нейросфере, полосатом теле, таламусе и мозжечке. Экспрессия альфа-синуклеина также высока в кроветворных клетках, включая моноциты, такие как В-клетки, Т-клетки, НК-клетки и тромбоциты. Его точная роль в этих клетках неизвестна, но она связана с дифференцировкой мегакариоцитов (предшественников тромбоцитов).

В настоящем описании «заболевание, ассоциированное с агрегатами альфа-синуклеина», представляет собой группу нейродегенеративных заболеваний, называемых синуклеинопатиями, с агрегатами альфа-синуклеина в патологических очагах, включая нейроны и глию, и такими характеристиками. Эти заболевания включают болезнь Паркинсона, деменцию, обусловленную болезнью Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви, сочетанную

болезнь Альцгеймера и Паркинсона, множественную системную атрофию и многие другие нейроаксональные заболевания, но не ограничиваются этим. В одном из воплощений антитело по настоящему изобретению эффективно применяют для лечения болезни Паркинсона.

Помимо этого, биспецифическое антитело к α -syn/IGF1R по настоящему изобретению включает антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент, благодаря чему антитело к α -Syn или его антигенсвязывающий фрагмент может проникать через гематоэнцефалический барьер, чтобы проявить свое действие и продлить период полувыведения с поддержанием эффективности в течение длительного времени.

Более того, биспецифичное антитело против α -Syn / против IGF1R по настоящему изобретению связывается с IGF1R на поверхности клеток, не влияя на его связывание с лигандом, и не оказывает влияния на сигнальный путь IGF1R. Поскольку оно не ингибирует связывание IGF1R с его лигандом и передачу сигналов через IGF1R, оно может быть использовано в качестве переносчика для проникновения через гематоэнцефалический барьер.

В частности, антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению специфично распознают IGF1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1-го типа) и связываются с IGF1R, в частности с человеческим IGF1R, мышинным IGF1R, крысиным IGF1R и IGF1R обезьяны. Тем не менее, они не препятствуют связыванию лигандов IGF1R, таких как IGF-1, IGF-2 и/или инсулин, с IGF1R, не ингибируют передачу сигналов через IGF1R и могут быть использованы для трансцитоза с целью прохождения через ГЭБ. Они не обладают антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC) и, таким образом, не снижают уровни IGF1R в головном мозге даже при их многократном введении животным, благодаря чему они нетоксичны.

В частности, антитело против IGF1R по настоящему изобретению связывается с IGF1R, расположенным на поверхности эндотелиальных клеток головного мозга, образующих ГЭБ, и проходит интернализацию, проникая во внутреннюю часть клетки.

Например, антитело к IGF1R может иметь форму scFv и может быть объединено с терапевтическим антителом различными путями. Например, scFv антитела к IGF1R может быть представлен в составе биспецифического антитела, например, бивалентной формы биспецифического антитела, в котором два scFv связаны с C-концом

терапевтического антитела, например, антитела к α -syn, или моновалентной формы биспецифического антитела, в котором один scFv связан с С-концом терапевтического антитела. Оба из этих биспецифических антител могут быть интернализированы клетками, экспрессирующими IGF1R. Антитело к IGF1R обладает высокой аффинностью связывания с антигеном на поверхности клеток, что усиливает эффект интернализации и приводит к возникновению способности проходить через ГЭБ. Если антитело обладает способностью проходить через ГЭБ и препятствовать передаче сигнала посредством IGF1R, то это может вызывать побочные эффекты. Тем не менее, антитело по настоящему изобретению характеризуется как связывающей способностью, подходящей для прохождения через ГЭБ, так и отсутствием блокировки передачи сигналов через IGF1R.

Антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент обладают отличным свойством простоты их разработки. В этом аспекте, посттрансляционные модификации, такие как дезамидирование, происходящие в области CDR антитела против IGF1R и снижающие стабильность и эффективность антитела, должны быть устранены.

Альтернативно, по меньшей мере одна из аминокислот, расположенных с обеих сторон сайта дезамидирования антитела, может быть заменена, и предпочтительно, чтобы могла быть заменена аминокислота, непосредственно примыкающая к С-концевой стороне сайта дезамидирования антитела. Например, путем замены на А остатка G, расположенного вслед за Asn, локализованным в сайте дезамидирования антитела, или замены на V вместо остатка S, расположенного вслед за Asn, можно получить дезамидированные антитела, обладающие аффинностью связывания, аналогичной аффинности связывания родительского антитела к IGF1R, и одновременно имеющие превосходные стабильность и способность проникать через ГЭБ.

Кроме того, при связывании с биологически активным веществом, действующим в головном мозге, антитело против IGF1R по настоящему изобретению может улучшать его способность к проникновению через ГЭБ и эффективность по сравнению с тем же биологически активным веществом самим по себе.

Антитело к IGF1R, согласно одному из аспектов настоящего изобретения, может быть использовано в качестве биспецифического антитела, включающего в себя различные вторые терапевтические антитела. В эксперименте проникновения через *in vitro* ГЭБ-систему, имеющую происхождение от человека, было показано, что по

сравнению с одиночным антителом, состоящим только из терапевтического антитела, оно усиливает проникновение через ГЭБ в 15 раз. Антитело против IGF1R может быть связано со вторым антителом в биспецифичном антителе в моновалентной или бивалентной форме. Например, при анализе количества антитела в крови и СМЖ после однократного введения биспецифичного антитела с антителом против IGF1R в моновалентной форме или бивалентной форме нормальным крысам моновалентная форма и бивалентная форма антител против IGF1R продемонстрировали увеличение количества в крови до 5 раз и увеличение количества в СМЖ до 5 раз по сравнению с исходным антителом против IGF1R (клон 1564). Они продемонстрировали увеличение количества в СМЖ приблизительно в 3 раза и повышение проникновения в головной мозг приблизительно в 4,5 раза по сравнению с исходным антителом против IGF1R (клон 1564). Поэтому ожидается, что биспецифичное антитело, содержащее антитело против IGF1R, усовершенствованное указанным выше способом, продемонстрирует увеличение количества антитела в СМЖ приблизительно до 15 раз и повысит его способность к проникновению в головной мозг приблизительно до 23 раз по сравнению с одиночным антителом, состоящим из второго терапевтического антитела самого по себе.

Было установлено, что антитело против IGF1R по настоящему изобретению связывается с IGF1R, в частности с IGF1R млекопитающих, включая людей, обезьян, крыс и мышей, и, таким образом, может быть полезным для скрининга при разработке лекарственных средств, для клинических исследований и тому подобного.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично распознающие IGF1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1).

Подразумевают, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению «специфично связываются» со своей мишенью, такой как антиген, когда они связываются с ней с константой диссоциации (KD) 10^{-6} М или менее. Антитело специфично связывается с мишенью с высокой аффинностью, когда KD составляет 1×10^{-8} М или менее, или когда его средняя эффективная концентрация (EC_{50}) составляет 2 нМ или менее. В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с IGF1R или человеческим IGF1R с KD 1×10^{-8} или менее.

При использовании здесь термин «эпитоп» представляет собой антигенную детерминанту, интерпретируемую как означающая часть антигена, распознаваемого антителом. Согласно одному воплощению, сайт связывания антитела против IGF1R по настоящему изобретению может представлять собой внеклеточный домен белка IGF1R, например, человеческого белка IGF1R (SEQ ID NO:99). Конкретнее, сайты связывания антитела против IGF1R по настоящему изобретению, например, клон 1564 антитела к человеческому белку IGF1R, представляют собой сайт связывания 1, содержащий Y775, P776, F778, R650, S791, L798 и Glu779, сайт связывания 2, содержащий L641, H808, E809 и L813, и сайт связывания 3, содержащий V397, D435, W434, Y460 и C488 в человеческом белке IGF1R. Таким образом, эпитоп антитела к IGF1R по настоящему изобретению может представлять собой конформационный эпитоп, содержащий все или часть из этих трех сайтов связывания.

Антитело к IGF1R или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению не препятствует связыванию лигандов IGF1R, таких как IGF-1, IGF-2 и/или инсулин, с IGF1R. Конкретно, антитело к IGF1R или антигенсвязывающий фрагмент не мешает связыванию лиганда IGF1R с IGF1R, расположенным на мембране клеток, экспрессирующих IGF1R, или, ни ингибирует передачу сигнала через IGF1R, ни влияет на экспрессию IGF1R на клеточной поверхности. Таким образом, антитело к IGF1R или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно эффективно использовать для проникновения через гематоэнцефалический барьер посредством трансцитоза. Показано, что IGF1R имеет относительно высокий уровень экспрессии в головном мозге по сравнению с другими мишенями трансцитоза, которые используются в настоящее время и, как известно, экспрессируются в эндотелиальных клетках головного мозга для улучшения способности проникать через ГЭБ. В одном из воплощений настоящего изобретения, когда IGF1R сравнивают с другими мишенями, разрабатываемыми в настоящее время с целью улучшения способности терапевтических антител проникать через ГЭБ, например, с трансферриновым рецептором или инсулиновым рецептором, показано, что он имеет относительно низкий уровень экспрессии в периферической ткани, такой как печень, легкие или толстый кишечник.

IGF1R представляет собой мишень для рецептор-опосредованного трансцитоза (RTM), посредством которого можно доставлять полезные вещества через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в головной мозг. Однако, чтобы быть использованным в качестве мишени для доставки лекарственных средств с целью

проникновения через гематоэнцефалический барьер, желательным свойством связывания с IGF1R на поверхности клеток без воздействия на связывание с лигандом и на сигнальный путь через IGF1R. Таким образом, антитело к IGF1R и его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению не ингибируют связывание IGF1R со своим лигандом и передачу сигнала через IGF1R и поэтому могут быть использованы в качестве челнока для проникновения через гематоэнцефалический барьер.

Антитело к IGF1R или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению способны к трансцитозу и могут проходить через эндотелиальные клетки головного мозга. Кроме того, антитело по настоящему изобретению располагается в том же месте, что и кровеносные сосуды головного мозга мыши, когда его вводят в кровеносный сосуд мыши. Эти результаты указывают на то, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно эффективно использовать в качестве носителя лекарственного средства, который пересекает гематоэнцефалический барьер.

Таким образом, антитело к IGF1R или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению способствует прохождению биологически активного вещества, действующего в головном мозге, через гематоэнцефалический барьер. В настоящем изобретении биологический барьер относится к клеткам, тканям, мембранам или клетке, мембране или структуре, которая предотвращает эффективное прохождение, диффузию или перенос биологической молекулы. Эти биологические барьеры включают нервные клетки/ткани, соединительную ткань, мышцу, мембрану или эпителиальные клетки (например, слизистых оболочек или сосудов). Типичным примером является гематоэнцефалический барьер.

В настоящем изобретении термин «гематоэнцефалический барьер» или ГЭБ представляет собой барьер, образованный плотными контактами в эндотелиальной мембране капилляров головного мозга, который отделяет головной мозг и спинной мозг от окружающей их кровеносной системы. Этот барьер настолько сильный, что он ограничивает прохождение в головной мозг даже тех молекул, молекулярная масса которых мала и составляет приблизительно 60 Да. Гематоэнцефалический барьер головного мозга, сосудистый барьер спинного мозга и сосудистый барьер сетчатки представляют собой непрерывные капиллярные барьеры центральной нервной системы, и их обычно обозначают как ГЭБ.

В настоящем изобретении «переносчик через гематоэнцефалический барьер» может проходить через гематоэнцефалический барьер и обеспечивать доставку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению и, например, включает белок, в том числе пептид и полипептид, нуклеиновую кислоту, антитело или низкомолекулярное соединение.

Настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое(ый) специфически связывается с IGF1R, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой полипептид, белок, или антитело либо его антигенсвязывающий фрагмент включает в себя определяющий комплементарность участок тяжелой цепи и определяющий комплементарность участок легкой цепи и специфически связывается с IGF1R.

В конкретных примерах антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать:

(1) одну или более чем одну определяющую комплементарность область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, описанных в Таблице 1, или переменную область тяжелой цепи, содержащую указанную одну или более чем одну определяющую комплементарность область тяжелой цепи;

(2) одну или более чем одну определяющую комплементарность область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, описанных в Таблице 1, или переменную область легкой цепи, содержащую указанную одну или более чем одну определяющую комплементарность область легкой цепи;

комбинацию одной или более чем одной определяющей комплементарности области (CDR) тяжелой цепи и одной или более чем одной определяющей комплементарности области (CDR) легкой цепи; или

комбинацию переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи.

Кроме того, в указанных переменной области тяжелой цепи, переменной области легкой цепи или комбинации переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи переменная область тяжелой цепи может содержать один или более чем один каркасный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4, а переменная область легкой цепи может содержать один или более чем один каркасный участок легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4.

В одном из воплощений настоящего изобретения удаление аминокислот, связанных с осуществлением дезамидирования в антителе к IGF1R, может снижать риск деградации антитела, которая неблагоприятна в процессе разработки, хранения и т.д., без изменения аффинности связывания с внеклеточным доменом (ECD) IGF1R как антигена. В антителе к IGF1R положениями делетируемых аминокислот могут быть, в качестве примеров, N51D, N51Q или S52V в L-CDR2 легкой цепи и N95aK, N95aH, N95aR, N95aD или G95bA в L-CDR3 легкой цепи или N54D, N54Q или G55A в тяжелой цепи H-CDR2 антитела 1564 (IgG), 1564 (scFv) или 1564-3. Устранение процесса дезамидирования не ограничивается описанными выше клонами, а может быть применено к другим клонам в соответствии со способом, приведенным в таблице 14.

Таблица 1

CDR вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи в антителе к IGF1R

Идентификац. код (ID) клона/SEQ ID NO	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
1564 (IgG)	1	2	8	20	21	24
1564 (scFv)	1	2	8	20	21	24
1564-3	1	2	8	20	21	24
1564-DM	1	3	8	20	22	25
1564-DMP	1	3	8	20	22	25
VH5-DM	1	4	8	20	22	25
VH5-DMP	1	4	8	20	22	25
F06-DM	1	3	8	20	22	26
F06-DMP	1	3	8	20	22	26
F06 (de2)(StoP)	1	5	8	20	23	27
VH5 (de2)(StoP)	1	6	9	20	23	28
VH16 (de2)(StoP)	1	7	8	20	23	28
1564 (de2)(StoP)	1	5	8	20	23	28
VH2 (scFv)	10	11	19	20	21	24
VH2-3	10	11	19	20	21	24
VH2-DM	10	12	19	20	22	25

VH2-DMP	10	12	19	20	22	25
VH5 (scFv)	1	13	9	20	21	24
VH5-3	1	13	9	20	21	24
VH7 (scFv)	10	14	8	20	21	24
VH7-3	10	14	8	20	21	24
VH7-DM	10	15	8	20	22	25
VH7-DMP	10	15	8	20	22	25
VH9 (scFv)	1	16	8	20	21	24
VH9-3	1	16	8	20	21	24
VH9-DM	1	17	8	20	22	25
VH9-DMP	1	17	8	20	22	25
VH16 (scFv)	1	11	8	20	21	24
VH16-3	1	11	8	20	21	24
VH16-DM	1	12	8	20	22	25
VH16-DMP	1	12	8	20	22	25
VH32 (scFv)	10	18	19	20	21	24
VH32-3	10	18	19	20	21	24
VH32-DM	10	3	19	20	22	25
VH32-DMP	10	3	19	20	22	25
VH35 (scFv)	1	14	9	20	21	24
VH35-3	1	14	9	20	21	24
VH35-DM	1	15	9	20	22	25
VH35-DMP	1	15	9	20	22	25
C04 (scFv)	1	18	8	20	21	29
C04-3	1	18	8	20	21	29
C04-DM	1	3	8	20	22	30
C04-DMP	1	3	8	20	22	30
F06 (scFv)	1	18	8	20	21	31
F06-3	1	18	8	20	21	31

Таблица 2

CDR вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи в основном антителе к IGF1R

ID клона	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
F06-DMP	GFTFSSY DMS	AISYDQGN TYYADSV KG	GVLTTLM NWFYD	TGSSSNIG SNDVS	AQSNRPS	GTWAGS LHGYV
SEQ ID NO	1	3	8	20	22	26
F06 (de2)(StoP)	GFTFSSY DMS	AISYDNAN TYYADSV KG	GVLTTLM NWFYD	TGSSSNIG SNDVS	ANVNRPS	GTWAGS LNAYV
SEQ ID NO	1	5	8	20	23	27
VH16 (de2)(StoP)	GFTFSSY DMS	AISGSNAN TYYADSV KG	GVLTTLM NWFYD	TGSSSNIG SNDVS	ANVNRPS	GAWDDS LNAYV
SEQ ID NO	1	7	8	20	23	28
1564 (de2)(StoP)	GFTFSSY DMS	AISYDNAN TYYADSV KG	GVLTTLM NWFYD	TGSSSNIG SNDVS	ANVNRPS	GAWDDS LNAYV
SEQ ID NO	1	5	8	20	23	28

Антитело к IGF1R содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 10, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 2-7 и SEQ ID NO: 11-18, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 8-9 и SEQ ID NO: 19, и

вариабельная область легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 20, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 21-23, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий

аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 24-28 и SEQ ID NO: 29-31.

В одном из воплощений настоящего изобретения антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи,

переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5-7, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 8-9, и

переменная область легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 20, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 22 и 23, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 26-28.

Переменная область тяжелой цепи антитела к IGF1R по настоящему изобретению может включать H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, описанные в Таблице 1, или может дополнительно включать H-FR1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 32, H-FR2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34, H-FR3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 35, и H-FR4, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 36.

Переменная область легкой цепи антитела к IGF1R по настоящему изобретению может включать L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, описанные в Таблице 1, или может дополнительно включать L-FR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 37, L-FR2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 38, L-FR3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40, и L-FR4, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 42.

В каркасах тяжелой цепи и легкой цепи каркасный участок 1 (FR1) расположен на N-конце CDR1, каркасный участок 2 (FR2) расположен между CDR1 и CDR2, каркасный участок 3 (FR3) расположен между CDR2 и CDR3, а каркасный участок 4 (FR4) расположена на C-конце CDR3.

Конкретно, каркасные последовательности в вариабельной области тяжелой цепи антитела 1564 (IgG) включают аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 32, 33, 35 и 36, а последовательности из клонов, отличающихся от антитела 1564 (IgG) в Таблице 1, включают аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 32, 34, 35 и 36.

Конкретно, каркасные последовательности в вариабельной области легкой цепи антител к IGF1R по настоящему изобретению показаны в Таблице 3.

Таблица 3

Каркасные последовательности в вариабельной области легкой цепи антител к IGF1R

ID клона	L-FR1 SEQ ID NO	L-FR2 SEQ ID NO	L-FR3 SEQ ID NO	LFR4 SEQ ID NO
1564 (IgG)	37	38	39	41
1564 (scFv)	37	38	40	42
1564-3	37	38	39	42
1564-DM	37	38	40	42
1564-DMP	37	38	39	42
VH05-DM	37	38	40	42
VH05-DMP	37	38	39	42
F06-DM	37	38	40	42
F06-DMP	37	38	39	42
F06(de2)(StoP)	37	38	39	42
VH5(de2)(StoP)	37	38	39	42
VH16(de2Stop)	37	38	39	42
1564(de2)(StoP)	37	38	39	42
VH2 (scFv)	37	38	40	42
VH2-3	37	38	39	42
VH2-DM	37	38	40	42
VH2-DMP	37	38	39	42

VH5 (scFv)	37	38	40	42
VH5-3	37	38	39	42
VH7 (scFv)	37	38	40	42
VH7-3	37	38	39	42
VH7-DM	37	38	40	42
VH7-DMP	37	38	39	42
VH9 (scFv)	37	38	40	42
VH9-3	37	38	39	42
VH9-DM	37	38	40	42
VH9-DMP	37	38	39	42
VH16 (scFv)	37	38	40	42
VH16-3	37	38	39	42
VH16-DM	37	38	40	42
VH16-DMP	37	38	39	42
VH32 (scFv)	37	38	40	42
VH32-3	37	38	39	42
VH32-DM	37	38	40	42
VH32-DMP	37	38	39	42
VH35 (scFv)	37	38	40	42
VH35-3	37	38	39	42
VH35-DM	37	38	40	42
VH35-DMP	37	38	39	42
C04 (scFv)	37	38	40	42
C04-3	37	38	39	42
C04-DM	37	38	40	42
C04-DMP	37	38	39	42
F06 (scFv)	37	38	40	42
F06-3	37	38	39	42

Антитело к IGF1R по настоящему изобретению может представлять собой антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, и различные переменные области тяжелой и легкой цепи, приведенные в данной заявке, в качестве примера описаны в Таблицах 4 и 5. Переменные области

тяжелой цепи и переменные области легкой цепи, описанные в приведенных ниже Таблицах 4 и 5, можно свободно комбинировать для получения антител различных типов. Каждая из этих переменных областей может быть соединена с константными участками тяжелой и легкой цепи с образованием каждой тяжелой цепи и каждой легкой цепи интактного антитела.

Таблица 4

Переменные области тяжелой цепи и переменные области легкой цепи антител к IGF1R

ID клона/SEQ ID NO	VH	VL	ID клона/SEQ ID NO	VH	VL
1564 (IgG)	43	88	VH9 (scFv)	66	111
1564 (scFv)	44	89	VH9-3	67	112
1564-3	45	90	VH9-DM	68	113
1564-DM	46	91	VH9-DMP	69	114
1564-DMP	47	92	VH16 (scFv)	70	115
VH05-DM	48	93	VH16-3	71	116
VH05-DMP	49	94	VH16-DM	72	117
F06-DM	50	95	VH16-DMP	73	118
F06-DMP	51	96	VH32 (scFv)	74	119
F06(de2)(StoP)	52	97	VH32-3	75	120
VH5(de2)(StoP)	53	98	VH32-DM	76	121
VH16(de2Stop)	54	99	VH32-DMP	77	122
1564(de2)(StoP)	55	100	VH35 (scFv)	78	123
VH2 (scFv)	56	101	VH35-3	79	124
VH2-3	57	102	VH35-DM	80	125
VH2-DM	58	103	VH35-DMP	81	126
VH2-DMP	59	104	C04 (scFv)	82	127
VH5 (scFv)	60	105	C04-3	83	128
VH5-3	61	106	C04-DM	84	129
VH7 (scFv)	62	107	C04-DMP	85	130
VH7-3	63	108	F06 (scFv)	86	131
VH7-DM	64	109	F06-3	87	132
VH7-DMP	65	110	**	**	**

Таблица 5

Вариабельные области тяжелой цепи и вариабельные области легкой цепи в основных антителах к IGF1R

ID клона	VH	VL
F06-DMP	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLE WVSAISYDQGNTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGVLTTL MNWFDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 51)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGS SSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLIY AQSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCGTWAGSLHGY VFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 96)
F06 (de2)(StoP)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLE WVSAISYDNANTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGVLTTL MNWFDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 52)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGS SSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLIY ANVNRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCGTWAGSLNA YVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 97)
VH16 (de2)(Stop)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLE WVSAISGSNANTYYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKGVLTTL MNWFDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 54)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGS SSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLIY ANVNRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCGAWDDSLNA YVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 99)
1564 (de2)(StoP)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLE WVSAISYDNANTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGVLTTL MNWFDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 55)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGS SSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLIY ANVNRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCGAWDDSLNA YVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 100)

Вариабельная область тяжелой цепи антитела к IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может включать одно, выбранное из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей от SEQ ID NO: 43 до SEQ ID NO: 87. Вариабельная область легкой цепи антитела к IGF1R или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может включать одно, выбранное из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 88-132. Примеры вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи описаны в приведенных выше Таблицах 4 и 5.

Антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент специфически распознает и связывается с по меньшей мере одной из аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Y775, P776, F778, R650, S791, L798, Glu779, L641, H808, E809, L813, V397, D435, W434, Y460 и C488 в человеческом IGF1R, имеющем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 174. Конкретно, антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может связываться с по меньшей мере чем-либо одним, выбранным из сайта связывания от сайта связывания 1 до сайта связывания 3 в белке IGF1R человека, включающем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 174. Сайт связывания 1 содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Y775, P776, F778, R650, S791, L798 и Glu779, сайт связывания 2 содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из L641, H808, E809 и L813, а сайт связывания 3 содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V397, D435, W434, Y460 и C488.

Каждую из вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи, описанных в Таблицах 4 и 5, можно использовать в качестве отдельных доменных антител, их можно свободно комбинировать друг с другом с образованием различных антител, и их соединяют в форме одной цепи для получения одноцепочечных антител, таких как scFv.

В настоящем описании «доменное антитело» представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи. В одном воплощении две или более VH-области связаны ковалентной связью посредством пептидного линкера с образованием бивалентного доменного антитела. Две VH-области

этого бивалентного доменного антитела могут быть направлены на один и тот же антиген или на разные антигены.

Антигенсвязывающие фрагменты антител к IGF1R по настоящему изобретению могут представлять собой фрагменты, выбранные из группы, состоящей из scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab', F(ab')₂, миниантитела и диатела, в том числе фрагменты антител, содержащие один или несколько определяющих комплементарность участков.

Среди антигенсвязывающих фрагментов, Fab включает переменную область легкой цепи, переменную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи и первую константную область (CH1) тяжелой цепи и имеет один сайт связывания антигена. Fab' имеет шарнирную область в составе Fab, содержащую один или более чем один цистеиновый остаток, на С-конце домена CH1 тяжелой цепи. F(ab')₂-антитело получают связыванием двух Fab' с образованием дисульфидной связи между цистеиновыми остатками шарнирных областей Fab'.

Fv представляет собой минимальный фрагмент антитела, имеющий только переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, и включает одноцепочечные переменные фрагменты (scFv) и двуцепочечные переменные фрагменты (Fv). В двуцепочечном Fv переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи могут быть связаны нековалентными связями. В одноцепочечном Fv переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи связаны ковалентно, напрямую или через пептидный линкер, или связаны напрямую на С-конце с образованием структуры, подобной димеру scFv (di-scFv), такой как двуцепочечный Fv. В настоящем изобретении одноцепочечный Fv представляет собой единую полипептидную цепь антигенсвязывающей области, где переменные области тяжелой и легкой цепи связаны напрямую или через линкер, и может представлять собой по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из scFv, имеющего одну цепь, связанную с переменной областью тяжелой цепи и переменной областью легкой цепи, формы структуры, подобной димеру scFv (di-scFv), scFv-Fc, где переменная область тяжелой цепи, переменная область легкой цепи и Fc связаны в форме единой цепи, и тому подобного.

Пептидный линкер может быть таким, как описано выше, и его длина может составлять, например, от 1 до 100, в частности, от 2 до 50 аминокислот или от 5 до 25 аминокислот, и пептидный линкер может иметь различную длину в пределах, которые не влияют на функционирование антитела. В состав пептидного линкера могут входить

аминокислоты разных типов, и он может состоять из одной или нескольких аминокислот, выбранных из группы, состоящей, например, из Gly, Ser и Leu, и конкретные примеры включают остатки Gly и Ser или остатки Leu и Ser. В конкретном примере пептидным линкером может быть (G4S)_n, где n представляет собой число повторов (G4S), равное целому числу от 1 до 10, например, от 2 до 5, особенно 3 или 4. Примером пептидного линкера может быть состоящий из аминокислот пептид с SEQ ID NO: 133 или 134.

SEQ ID NO 133: GGGGSGGGGSGGGGS.

SEQ ID NO 134: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS.

Одноцепочечный Fv (scFv) может быть получен слиянием ДНК, кодирующей пептидный линкер, между ДНК, кодирующими полипептиды двух переменных доменов (VL и VH). Полученный полипептид может образовывать антигенсвязывающие мономеры или мультимеры (например, димеры, тримеры или тетрамеры), в зависимости от длины гибкого линкера между двумя переменными доменами, с формированием их пространственной структуры. При комбинировании полипептидов, содержащих разные VL и VH, могут быть получены мультимерные scFv, связывающиеся с разными эпитопами.

Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием протеолитических ферментов (например, рестрикционное расщепление полноразмерного антитела папаином с получением Fab и расщепление пепсином с получением F(ab')₂-фрагмента) или с применением генетической рекомбинантной технологии.

Одноцепочечные антитела, раскрытые в настоящем описании, включают, без ограничения, scFv, содержащие комбинации доменов переменных областей тяжелой и легкой цепи или комбинации переменных доменов легкой и тяжелой цепи, содержащие CDR.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела к IGF1R может быть объединен с использованием или без использования линкера, такого как пептидный линкер. Кроме того, части тяжелой и легкой цепи в антигенсвязывающем фрагменте, такие как переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи во фрагменте scFv, также могут быть соединены с использованием или без использования пептидного линкера. Пептидный линкер может быть таким, как описано выше.

В случае биспецифического антитела к IGF1R и его антигенсвязывающие фрагменты могут осуществлять функцию доставки второго

антитела или антигенсвязывающего фрагмента, направленного на другие антигены или эпитопы, с которыми они связываются, через гематоэнцефалический барьер в головной мозг. Вторым антителом может быть антитело, которое проявляет эффективность в головном мозге, но конкретно этим не ограничивается, им может быть антитело к альфа-синуклеину или его связывающий фрагмент по настоящему изобретению.

Антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут иметь общую конкретную область или последовательность с другим вторым антителом. Например, антитело к IGF1R может иметь общую со вторым антителом константную область или Fc-область антитела либо антигенсвязывающего фрагмента.

Помимо этого, структура биспецифического антитела в настоящем изобретении включает бивалентную форму биспецифического антитела, в которой scFv фрагмент антитела к IGF1R связан с каждым из Fc двух тяжелых цепей полноразмерного иммуноглобулина, например, на концах тяжелой цепи напрямую или посредством линкера, и моновалентную форму биспецифического антитела, в которой scFv фрагмент антитела к IGF1R связан только с одним концом этих двух тяжелых цепей полноразмерного иммуноглобулина напрямую или посредством линкера, но моновалентное двойное антитело предпочтительно.

Конкретно, в одном воплощении настоящего изобретения есть случай, когда период полувыведения клона моновалентной формы лучше, чем у клона бивалентной формы, а структура клона моновалентной формы представляет собой форму, где доменное антитело (scFv) против IGF1R связано только с концом одной тяжелой цепи интактного иммуноглобулина через линкер. Конкретно, антитело представляет собой гетеродимер, полученный методом «выступ во впадину» (Knob-In-Hole), содержащий две разные тяжелые цепи интактного иммуноглобулина, где одна тяжелая цепь имеет доменное антитело (scFv) против IGF1R, связанное с ее C-концом, а другая тяжелая цепь не имеет доменного антитела на ее C-конце.

В случае биспецифического антитела второе антитело, которое соединено с антителом к IGF1R или его антигенсвязывающим фрагментом, может представлять собой человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело или выделенное антитело, специфически связывающееся с IGF1R. Второе антитело включает, но не ограничивается этим, полноразмерные антитела, биспецифические антитела, миниантитела, однодоменные антитела, миметики антител (или синтетические

антитела), слитые конструкции на основе антител (или конъюгаты на основе антител) и их фрагменты. В биспецифическом антителе примером второго антитела, которое соединено с антителом к IGF1R или его антигенсвязывающим фрагментом, может быть антитело к α syn или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

Далее, настоящее изобретение касается антитела к α syn и его антигенсвязывающего фрагмента.

Альфа-синуклеин, который может распознаваться антителом, предложенным в данной заявке, может быть выбран из альфа-синуклеинов млекопитающих, таких как альфа-синуклеин человека, альфа-синуклеин обезьяны (например, альфа-синуклеин макака-резуса), альфа-синуклеин мыши, альфа-синуклеин крысы и тому подобные. Например, альфа-синуклеин человека может представлять собой альфа-синуклеин (ID согласно NCBI (Национальный центр биотехнологической информации): NP_000336), но этим не ограничивается. Если в данном описании не указано иное, то альфа-синуклеин может относиться к альфа-синуклеину человека, и антитела или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в данной заявке, обладают свойством специфически связываться не только с альфа-синуклеином человека, но также и с альфа-синуклеином обезьяны (например, макака-резуса), альфа-синуклеином крысы и/или альфа-синуклеином мыши.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может связываться с С-концевым участком альфа-синуклеина, конкретно, с С-концевым участком, содержащим пептид, состоящий по меньшей мере из 11 или 12 следующих одна за другой аминокислот, включая остатки с 110-ого по 120-ый или остатки с 111-ого по 122-ый в SEQ ID NO: 173 альфа-синуклеина человека. Подтверждено, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может распознавать антигенраспознаваемый участок и связываться с агрегатом альфа-синуклеина с высокой аффинностью связывания.

В настоящем описании «специфичное связывание с альфа-синуклеином или агрегатами альфа-синуклеина» означает, что аффинность связывания с белком альфа-синуклеина или агрегатами альфа-синуклеина относительно высока по сравнению с другими антигенами и, например, может составлять от $0,1 \times 10^{-10}$ М до 2×10^{-10} М или от $0,05 \times 10^{-10}$ М до $0,3 \times 10^{-9}$ М в отношении агрегатов альфа-синуклеина, конкретно, фибрилл, протофибрилл и олигомеров амилоида, в особенности фибрилл амилоида, как

измерено, без ограничения, анализом Octet или анализом методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), но этим не ограничиваются.

Гуманизированные антитела к альфа-синуклеину, включающие в себя легкую цепь и тяжелую цепь, согласно одному из воплощений настоящего изобретения, в качестве примеров, hu11F11 (вер.2) и hu11F11_ABL2-4, проявляют высокую активность в отношении стимуляции поглощения фагоцитами по сравнению с химерными антителами к альфа-синуклеину. По сравнению с химерным антителом к альфа-синуклеину, hu11F11 (вер.1), hu11F11 (вер.2), hu11F11 (вер.3), hu11F11 (вер.4) и ABL2-4 показывают высокую активность в отношении ингибирования связывания фибрилл с мембраной нервных клеток по сравнению с химерным антителом к альфа-синуклеину. Hu11F11 (вер.2), hu11F11 (вер.4) и ABL2-4 обладают высокой активностью в отношении ингибирования распространения альфа-синуклеина, секретлируемого клетками, сверхэкспрессирующими альфа-синуклеин, в другие нервные клетки по сравнению с химерным антителом к альфа-синуклеину и демонстрируют аффинность связывания с агрегатом альфа-синуклеина, например, аналогичную или превосходящую таковую химерного антитела к альфа-синуклеину в анализе с применением клеток.

Антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению может ингибировать перенос агрегатов альфа-синуклеина, секретированных из нервной клетки в нервную систему субъекта, в другие нормальные клетки во внеклеточном пространстве и инфицирование нервных клеток (ингибировать передачу агрегатов от клетки к клетке) и обладает способностью стимулировать фагоцитарное действие микроглии на агрегаты альфа-синуклеина во внеклеточном пространстве. Агрегаты альфа-синуклеина распространяются от одной клетки к другой клетке подобно прионам, и альфа-синуклеин, в особенности агрегаты альфа-синуклеина, распространяется по головному мозгу, приводя к синуклеинопатиям в нормальных клетках. Поэтому агрегаты альфа-синуклеина токсичны для нейронов головного мозга, и хорошо известно, что они приводят к гибели нейронов головного мозга (нейродегенерации) и нейровоспалению. Соответственно, по мере распространения агрегатов альфа-синуклеина в различные части головного мозга гибель клеток головного мозга и нейровоспалительные реакции становятся более выраженными, приводя к гибели клеток головного мозга, расстройствам поведения и когнитивным расстройствам, которые отмечают при прогрессировании синуклеинопатий, таких как болезнь Паркинсона.

Соответственно, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению может предотвращать явление распространения агрегатов альфа-синуклеина в различные области головного мозга, ингибируя передачу альфа-синуклеина или агрегатов альфа-синуклеина между нервными клетками, и снижать уровень агрегатов альфа-синуклеина, являющихся важной причиной синуклеинопатий, уменьшая количество или устраняя сами агрегаты альфа-синуклеина во внеклеточной области нервных клеток нервной системы субъекта и стимулируя фагоцитарную активность микроглии, что приводит к снижению интенсивности гибели нервных клеток головного мозга и нейровоспалительных реакций, и, кроме того, ожидается, что оно будет улучшать, облегчать или предотвращать симптомы и прогрессирование синуклеинопатий, таких как болезнь Паркинсона.

Помимо этого, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению превосходно осуществляет обе из двух функций: (1) ингибирование перемещения альфа-синуклеина или агрегата альфа-синуклеина между нервными клетками (см. результат анализа с применением клеток, описанный в данной заявке) и (2) снижение уровня агрегатов альфа-синуклеина в нервной системе головного мозга благодаря усиленному фагоцитозу микроглиальными клетками. В частности, поскольку антитела к альфа-синуклеину, которые в настоящее время находятся на стадии клинических испытаний или информация о которых опубликована в научной статье, обладают одной из этих двух активностей (1) и (2), это позволяет предположить, что антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению имеет преимущество в предотвращении или лечении синуклеинопатий по сравнению с известными антителами к альфа-синуклеину. Следовательно, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению обладает более высокой эффективностью в отношении снижения уровня и устранения агрегатов альфа-синуклеина и ингибирования действия агрегатов альфа-синуклеина как этиологического фактора, и, таким образом, более эффективно в случае синуклеинопатий или связанного с ними симптоматического заболевания (например, расстройства когнитивных функций).

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, имеющие высокую аффинность в отношении агрегатов альфа-синуклеина, могут уменьшать образование агрегатов альфа-синуклеина, снижая посредством этого концентрацию агрегатов в головном мозге. Кроме того, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению с высокой аффинностью в

отношении агрегатов альфа-синуклеина могут уменьшать образование агрегатов альфа-синуклеина вне центральной нервной системы и, в конечном счете, изменять состояние равновесия между формами альфа-синуклеина, разграниченными ГЭБ, приводя посредством этого к снижению концентрации агрегатов альфа-синуклеина в центральной нервной системе.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может ингибировать образование агрегатов путем удаления мономеров или устранять как мономеры, так и агрегаты.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, специфично связывающиеся с белками альфа-синуклеина или агрегатами альфа-синуклеина, могут не являться продуктами, встречающимися в природе (они могут быть продуктами, не встречающимися в природе, например, продуктами химического синтеза или рекомбинантного метода). Методики рекомбинации хорошо известны в области техники.

Антитело к альфа-синуклеину или биспецифическое антитело, ключающее в себя антитело к альфа-синуклеину, можно использовать для предупреждения или лечения α -синуклеинопатии, и α -синуклеинопатия может включать болезнь Паркинсона (PD), деменцию, обусловленную болезнью Паркинсона (PDD), деменцию с тельцами Леви, (DLB), вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBV)), сочетанную болезнь Альцгеймера и Паркинсона или множественную системную атрофию (MSA), но этим не ограничивается.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывается с альфа-синуклеином или его агрегатом, по настоящему изобретению включает в себя переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3; и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

В одном из воплощений антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать следующие последовательности CDR:

CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135,

CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136 или SEQ ID NO: 137,

CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3) включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138,

CDR1 легкой цепи (L-CDR1), включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139,

CDR2 легкой цепи (L-CDR2), включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, и

CDR3 легкой цепи (L-CDR3), включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141.

Аминокислотные последовательности от CDR1 до CDR3 тяжелой цепи и аминокислотные последовательности от CDR1 до CDR3 легкой цепи суммированы в Таблицах 6 и 7. В легких цепях hu11F11-VLv3 4с и hu11F11-VL4, показанных в Таблице 7, аминокислотные последовательности от CDR1 до CDR3 легкой цепи являются одинаковыми, а последовательности каркасных участков являются разными.

Таблица 6

Аминокислотные последовательности от CDR1 до CDR3 тяжелой цепи антител к α -syn

Клон	SEQ ID	VH_CDR1	SEQ ID	VH_CDR2	SEQ ID	VH_CDR3
Hu11F11-VH-v1	135	GFTFSDFYM E	136	ASRNKANDYTTEYSAS VKG	138	DAHGKPF AY
Hu11F11-VH-v2	135	GFTFSDFYM E	136	ASRNKANDYTTEYSAS VKG	138	DAHGKPF AY
Hu11F11-VH-v3	135	GFTFSDFYM E	136	ASRNKANDYTTEYSAS VKG	138	DAHGKPF AY
Hu11F11-VH-v4	135	GFTFSDFYM E	136	ASRNKANDYTTEYSAS VKG	138	DAHGKPF AY
Hu11F11-VH2	135	GFTFSDFYM E	137	AIRNKANDYTTEYAAS VKG	138	DAHGKPF AY

Таблица 7

Аминокислотные последовательности от CDR1 до CDR3 легкой цепи антител к α -syn

Клон	SEQ ID NO	VL_CDR1	SEQ ID NO	VL_CDR2	SEQ ID NO	VL_CDR3
Hu11F11-VL _{v3} 4c	139	KSSQSLLYSSNQKN YLA	140	WASTRE S	141	QQYYSSYPW T
Hu11F11-VL4	139	KSSQSLLYSSNQKN YLA	140	WASTRE S	141	QQYYSSYPW T

Различные варибельные области тяжелой и легкой цепи, описанные в данной заявке, могут быть соединены с константными областями тяжелой и легкой цепи с образованием каждой тяжелой цепи и легкой цепи интактного антитела. Помимо этого, каждая из последовательностей тяжелой и легкой цепи, созданной таким путем, также может быть скомбинирована с образованием структуры полноразмерного антитела.

Например, антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей от SEQ ID NO: 142 до SEQ ID NO: 146, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей от SEQ ID NO: 147 до SEQ ID NO: 148, и типичные последовательности варибельных областей тяжелой цепи и варибельных областей легкой цепи показаны в приведенной ниже Таблице 8.

Таблица 8

Варибельная область тяжелой цепи и варибельная область легкой цепи антитела против α -syn

Клон	Цепь	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
Hu11F11-VH-v1	VH	142	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFY MEWVRQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSAS VKGRFTISRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCA RDAHGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v2	VH	143	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFY MEWVRQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSAS

			VKGRFTVSRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYC ARDAHGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v3	VH	144	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFY MEWVRQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSAS VKGRFTISRDTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCA RDAHGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v4	VH	145	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFY MEWVRQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSAS VKGRFTVSRDTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYC ARDAHGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH2	VH	146	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFY MEWVRQAPGKGLEWIAAIRNKANDYTTEYAAS VKGRFTISRDTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYC ARDAHGKPFAYWGQGLVTVSS
Hu11F11-VLv3 4c	VL	147	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSN QKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDVAVYYCQQYYSS YPWTFGGGKLEIK
Hu11F11-VL4	VL	148	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYSSNQ KNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSSYPW TFGQGTKVEIK

Помимо этого, в Таблице 9 описаны типичные антитела, полученные в результате комбинирования вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по одному из воплощений.

Таблица 9

Типичные антитела против α -syn по настоящему изобретению

ID клона	Вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи каждого клона	SEQ ID NO
hu11F11 (вер.1)	Hu11F11-VH-v1	142
	Hu11F11-VLv3 4c	147
hu11F11 (вер.2)	Hu11F11-VH-v2	143

	Hu11F11-VLv3 4c	147
hu11F11 (вер.3)	Hu11F11-VH-v3	144
	Hu11F11-VLv3 4c	147
hu11F11 (вер.4)	Hu11F11-VH-v4	145
	Hu11F11-VLv3 4c	147
hu11F11(H2L4)	Hu11F11-VH2	146
	Hu11F11-VL4	148

В другом воплощении антитело к альфа-синуклеину может состоять только из легкой цепи или тяжелой цепи, описанных выше. В другом воплощении антитело к альфа-синуклеину может состоять только из вариабельной области легкой цепи или вариабельной области тяжелой цепи.

В следующем воплощении вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи, описанные выше в Таблице 8, могут быть скомбинированы с образованием различных антител или могут быть соединены в одноцепочечной форме с образованием одноцепочечного антитела, такого как scFv.

Антитела, описанные в данной заявке, могут иметь общие участки или последовательности с другими антителами, описанными в данной заявке. В одном из воплощений общей может быть константная область антитела или антигенсвязывающий фрагмент. В других воплощениях они могут иметь общую Fc-область.

Оно может содержать тяжелую цепь, в том числе вариабельную область тяжелой цепи, и легкую цепь, в том числе вариабельную область легкой цепи. Конкретно, вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи могут быть соединены с константной областью тяжелой цепи и константной областью легкой цепи, и последовательности тяжелой цепи и легкой цепи также могут быть объединены с образованием структуры интактного антитела.

Последовательности константной области, которые могут быть скомбинированы с вариабельной областью по настоящему изобретению, являются типичными, и константная область может быть соответствующим образом выбрана из константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи иммуноглобулина (например, иммуноглобулина человека). Например, константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область тяжелой цепи IgG1, константную область тяжелой цепи IgG3 или константную область тяжелой цепи IgG4, а константная область

легкой цепи может представлять собой константную область легкой каппа-цепи или константную область легкой лямбда-цепи, но этим не ограничиваясь.

В качестве типичного антитела, содержащего переменную область и константную область антитела к α -суп или антигенсвязывающего фрагмента по одному из воплощений, антитело к альфа-синуклеину из клона hu11F11 (вер.2) может представлять собой антитело, включающее в себя тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150.

Антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению можно использовать как таковое в качестве терапевтического антитела, но можно использовать в виде биспецифического антитела в комбинации с другими антителами, способными доставлять его в головной мозг, проходя через гематоэнцефалический барьер. Примером антитела, способного доставлять его в головной мозг путем прохождения через гематоэнцефалический барьер, может быть антитело к IGF1R и его антигенсвязывающий фрагмент. Антитело к IGF1R и его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут участвовать в образовании биспецифического антитела, могут включать любое из описанных выше антител к IGF1R и любой из его антигенсвязывающих фрагментов. Например, антитело к IGF1R может представлять собой полноразмерное антитело или антигенсвязывающий фрагмент и может представлять собой что-либо, выбранное из группы, состоящей из доменного антитела, scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' и F(ab')₂.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела к IGF1R может быть присоединен через линкер, например пептидный линкер, или без него. Кроме того, область тяжелой цепи и область легкой цепи в антигенсвязывающем фрагменте, например, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи в scFv фрагменте, могут быть соединены через пептидный линкер или без него. Пептидный линкер может быть таким, как описано выше.

Антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно использовать в случае приготовления комбинаций тяжелых цепей для получения биспецифических антител, и примеры тяжелых цепей антител к альфа-синуклеину, использованные в случае приготовления комбинации тяжелых цепей для биспецифического антитела, ассоциированы с антителом к альфа-синуклеину hu11F11 (вер.2) и включают антитело hu11F11 (вер.2) (IgG), имеющее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149, и hu11F11 (вер.2) (IgG) с

мутацией, приводящей к образованию впадины (hole-мутацией) в Fc-области, имеющее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151.

Примеры тяжелых цепей антител к альфа-синуклеину, использованные в случае приготовления комбинаций тяжелых цепей для получения биспецифических антител, включая описанное выше антитело к альфа-синуклеину hu11F11 (вер.2), показаны ниже в Таблице 10, а последовательности тяжелых цепей показаны в SEQ ID NO: 151-SEQ ID NO: 172, но этим не ограничиваются. Кроме того, в приведенной ниже Таблице 10 показаны конкретные компоненты клона биспецифических антител, где объединены комбинация тяжелых цепей, в которой используется тяжелая цепь антитела к альфа-синуклеину, и легкая цепь. Биспецифические антитела, представленные ниже, описаны в качестве примеров, и их конструкция ясна из описания комбинации тяжелых цепей биспецифического антитела, даже если нет указания на SEQ ID NO. Типичные биспецифические антитела конкретно показаны в приведенной ниже Таблице 10.

Таблица 10

ИД клона биспецифического антитела	Легкая цепь биспецифич. антитела	Комбинация тяжелых цепей биспецифического антитела	SEQ ID	Описание компонентов в комбинации тяжелых цепей биспецифического антитела
hu11F11(вер.2)-1564 (scFv) моновалентное	hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(вер.2)-1564-2 моновалентное (HC 1, с hole-мутацией)	158	hu11F11(вер.2) (IgG) с hole-мутацией в Fc, (G4S)3, 1564 (scFv) VL, (G4S)4, 1564 (scFv) VH
		hu11F11(вер.2)-1564 моновалентное (HC 2, с мутацией, приводящей к образованию	152	hu11F11(вер.2) (IgG) с knob-мутацией

		«выступа» (knob-мутацией))		
hu11F11(вер.2)- VH5 бивалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2)- VH5 бивалентное (HC)	*	hu11F11(вер.2) (IgG),
				(G4S)3,
				VH5 VL,
				(G4S)4, VH5 VH
hu11F11(вер.2)- VH16 бивалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2)- VH16 бивалентное (HC)	*	hu11F11(вер.2) (IgG),
				(G4S)3,
				VH16 VL,
				(G4S)4, VH16 VH
hu11F11(вер.2)- F06-DM моновалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2) (M428L)-F06-DM моновалентное (HC 1, с hole-мутацией)	165	hu11F11(вер.2) (IgG),
				M428L, hole-мутация,
		hu11F11(вер.2) (M428L)-F06 моновалентное (HC 2, с knob-мутацией)	155	(G4S)3, F06-DMP VL,
				(G4S)4, F06-DMP VH
hu11F11(вер.2)- F06-DMP моновалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2) - F06-DMP моновалентное (HC 1, с hole-мутацией)	*	hu11F11(вер.2) (IgG),
				hole-мутация,
		hu11F11(вер.2)-F06 моновалентное (HC 2, с knob-мутацией)	*	(G4S)3, F06-DMP VL,
				(G4S)4, F06-DMP VH
				hu11F11(вер.2) (IgG), knob-мутация

hu11F11(вер.2) (M428L)-F06-DMP моновалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2) (M428L)-F06-DMP моновалентное (HC 1, с hole-мутацией)	164	hu11F11(вер.2) (IgG), M428L, hole-мутация, (G4S)3, F06-DMP VL, (G4S)4, F06-DMP VH
		hu11F11(вер.2) (M428L)-F06 моновалентное (HC 2, с knob-мутацией)	155	hu11F11(вер.2) (IgG), мутация M428L, knob- мутация
hu11F11(вер.2) (M428L)-F06-DM моновалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2) (M428L)-F06-DM моновалентное (HC 1, с hole-мутацией)	165	hu11F11(вер.2) (IgG), M428L, hole-мутация, (G4S)3, F06-DM VL, (G4S)4, F06-DM VH
		hu11F11(вер.2) (M428L)-F06 моновалентное, дезамидированное, S→P (HC 2, с knob- мутацией)	155	hu11F11(вер.2) (IgG), мутация M428L, knob- мутация
hu11F11(вер.2)- F06(de2)(StoP) моновалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2)- F06(de2)(StoP)- моновалентное, дезамидированное, S→P (HC 1, с hole- мутацией)	166	hu11F11(вер.2) (IgG) hole-мутация (G4S)3 F06(de2)(StoP) VL (G4S)4 F06(de2)(StoP) VH
		hu11F11(вер.2)- F06(de2)(StoP)- (de2) моновалентное,	152	hu11F11(вер.2) (IgG), knob-мутация

		дезамидированное, S→P (HC 2, с knob- мутацией)		
hu11F11(вер.2)- VH5(de2)(StoP) бивалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2)- VH5(de2)(StoP) дезамидированное, S→P бивалентное (HC)	167	hu11F11(вер.2) (IgG)
				(G4S)3,
				VH5(de2)(StoP)VL
				(G4S)4
				VH5(de2)(StoP)VH
hu11F11(вер.2)- VH16(de2)(StoP) бивалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2)- VH16(de2)(StoP) дезамидированное, S→P бивалентное (HC)	168	hu11F11(вер.2) (IgG)
				(G4S)3,
				VH16(de2)(StoP)VL
				(G4S)4
				VH16(de2)(StoP)VH
hu11F11(вер.2) (M428L)- F06(de2)(StoP) моновалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2) (M428L)- F06(de2)(StoP)- моновалентное, дезамидированное, S→P (HC 1, с hole- мутацией)	169	hu11F11(вер.2) (IgG) с мутацией M428L, с hole-мутацией
				(G4S)3
				F06(de2)(StoP) VL
				(G4S)4
				F06(de2)(StoP) VH
		hu11F11(вер.2) (M428L)- F06(de2)(StoP)- (de2) моновалентное, дезамидированное, S→P (HC 2, с knob- мутацией)	155	hu11F11(вер.2) (IgG), мутация M428L, knob- мутация
hu11F11(вер.2)- F06(de2)(StoP) бивалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2)- F06(de2)(StoP) дезамидированное,	*	hu11F11(вер.2) (IgG)
				(G4S)3,
				F06(de2)(StoP)VL
				(G4S)4

		S→P бивалентное (HC)		F06(de2)(StoP)VH
hu11F11 (вер.2)(M428L)- F06(de2)(StoP) бивалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2) (M428L)- F06(de2)(StoP) дезамидированное, S→P бивалентное (HC)	*	hu11F11(вер.2) (IgG) с мутацией M428L (G4S)3, F06(de2)(StoP)VL (G4S)4 F06(de2)(StoP)VH
hu11F11(вер.2)- 1564 (de2)(StoP) моновалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2)- 1564(de2)(StoP)- моновалентное, дезамидированное, S→P (HC1, с hole- мутацией) hu11F11(вер.2)- 1564(de2)(StoP)- (de2) моновалентное, дезамидированное, S→P (HC2, с knob- мутацией)	*	hu11F11(вер.2) (IgG) с hole-мутацией (G4S)3 1564(de2)(StoP) VL (G4S)4 1564(de2)(StoP) VH hu11F11(вер.2) (IgG) с knob-мутацией
hu11F11(вер.2) (M428L)- VH5(de2)(StoP) бивалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2) (M428L)- VH5(de2)(StoP) дезамидированное, S→P бивалентное (HC)	170	hu11F11(вер.2) (IgG) с мутацией M428L (G4S)3, VH5(de2)(StoP)VL (G4S)4 VH5(de2)(StoP)VH
hu11F11(вер.2) (M428L)- VH16(de2)(StoP), бивалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2) (M428L)- VH16(de2)(StoP) дезамидированное,	171	hu11F11(вер.2) (IgG) с мутацией M428L (G4S)3, VH16(de2)(StoP)VL (G4S)4

		S→P бивалентное (HC)		VH16(de2)(StoP)VH
hu11F11(вер.2) (M428L)- 1564(de2)(StoP), моновалентное	hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(вер.2) (M428L)- 1564(de2)(StoP)- моновалентное, дезамидированное, S→P (HC 1, с hole- мутацией)	172	hu11F11(вер.2) (IgG) с мутацией M428L, с hole-мутацией
				(G4S)3
				1564(de2)(StoP) VL
				(G4S)4
		hu11F11(вер.2) (M428L)- 1564(de2)(StoP)- (de2) моновалентное, дезамидированное, S→P (HC 2, с knob- мутацией)	155	hu11F11(вер.2) (M428L), с knob- мутацией

Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения альфа-синуклеин-опосредованного заболевания, содержащая антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическое антитело, содержащее указанное выше, по настоящему изобретению, содержит антитело к альфа-синуклеину или биспецифические антитела в фармацевтически эффективном количестве.

Как использовано в данном описании, «лечение» может относиться к любому действию, связанному с облегчением или устранением заболевания, или симптома, или патологического состояния, включая снижение интенсивности, облегчение, ослабление или устранение заболевания или симптома заболевания, делающему симптом заболевания или патологическое состояние более переносимым, снижающему степень обострения симптома заболевания или патологического состояния и так далее. Термин «субъект» или «пациент» включает в себя человека или являющегося человеком пациента.

Предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, солюбилизатор, эмульгатор, консервант и/или адъювант. В качестве примеров

настоящее изобретение включает способ лечения пациента с заболеванием, ассоциированным с альфа-синуклеином, посредством введения фармацевтической композиции. Фармацевтические композиции, используемые для введения *in vivo*, обычно предложены в виде стерильных препаратов. После приготовления фармацевтической композиции фармацевтическую композицию можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого, кристаллического либо обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие композиции можно хранить в готовой к применению форме или в форме, которую повторно разводят непосредственно перед введением (например, в лиофилизированной форме).

Способом введения фармацевтической композиции может быть известный способ, например, пероральный; инъекция внутривенным, внутривнутрибрюшинным, внутримозговым (интрапаренхиматозным), интравентрикулярным, внутримышечным, интраокулярным, интраартериальным, внутривенным путями или инъекция в область поражения и использование систем с длительным высвобождением; или можно применять имплантируемые устройства. В некоторых воплощениях композицию можно вводить непрерывно посредством болюсной инъекции или посредством инфузии либо с использованием имплантируемого устройства.

Антитело к альфа-синуклеину или его антигенсвязывающий фрагмент либо биспецифическое антитело, содержащее указанное выше, по настоящему изобретению, описанные в данной заявке, могут быть использованы для диагностических задач с целью детектирования, диагностики или мониторинга заболеваний и/или симптомов, ассоциированных с альфа-синуклеином. Обычно, в случае диагностического применения антитела могут быть помечены детектируемой меткой.

Эффекты изобретения

Антитело, полученное в одном из воплощений настоящего изобретения, специфически связывается с IGF1R с аффинностью связывания, оптимизированной для трансцитоза клетками эндотелия сосудов головного мозга, и используется для доставки антител, которые имеют ограниченную терапевтическую эффективность вследствие низкой способности проникновения через гематоэнцефалический барьер, с целью лечения дегенеративных заболеваний головного мозга и рака головного мозга. В частности, антитело, описанное в настоящем изобретении, не влияет на связывание с такими лигандами, как IGF-1, IGF-2 и инсулин, который является его гомологом к IGF1R, и не ингибирует передачу сигнала через IGF1R, и поэтому находит применение

в плане проникновения через гематоэнцефалический барьер. Антитело, описанное в данной заявке, может эффективно устранять или стимулировать деградацию агрегатов альфа-синуклеина и может ингибировать перенос альфа-синуклеина между клетками, благодаря чему оно может быть с пользой применено в лечении заболеваний, относящихся к накоплению агрегатов альфа-синуклеина. Антитело к альфа-синуклеину или биспецифическое антитело, содержащее указанное выше, по настоящему изобретению, можно использовать в виде фармацевтической композиции для предупреждения или лечения α -синуклеинопатии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 представлен результат иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA) для измерения аффинности химерного антитела к α -syn и гуманизированного антитела 11F11, полученных в примере настоящего изобретения.

На Фиг. 2a-2c представлены результаты ВІАсоге анализов на предмет предпочтительной специфичности связывания и аффинности химерного антитела к α -syn и гуманизированного антитела 11F11, полученных в примере настоящего изобретения, в отношении агрегатов альфа-синуклеина.

На Фиг. 3a и 3b представлены данные по связыванию антитела к IGF1R, полученного в примере настоящего изобретения, с белком IGF1R.

На Фиг. 4a, 4b и 4c представлены данные по связыванию антитела к IGF1R, полученного в примере настоящего изобретения, с IGF1R-экспрессирующими клеточными линиями. Ab – антитело, MFI – среднюю интенсивность флуоресценции.

На Фиг. 5a, 5b и 5c показаны данные по интернализации антитела к IGF1R, полученного в примере настоящего изобретения, в IGF1R-экспрессирующие клеточные линии, и его судьба в этих клетках.

Фиг. 6a, 6b и 6c представляют собой данные, показывающие, что антитело к IGF1R, полученное в примере настоящего изобретения, не влияет на IGF1R-опосредованную передачу сигнала, индуцированную IGF1 или инсулином.

На Фиг. 7a, 7b, 7c, 7d, 7e и 7f показано, что антитело к IGF1R и биспецифическое антитело, содержащее антитело к IGF1R и терапевтическое антитело, проникают через ГЭБ *in vivo* лучше, чем само по себе терапевтическое антитело. CSF – спинномозговая жидкость.

На Фиг. 8 представлен результат, показывающий положение дезамидирования в антителе к IGF1R.

На Фиг. 9 представлен результат эпитопного картирования антитела к IGF1R.

На Фиг. 10a и 10b представлены результаты ELISA по измерению способности биспецифического антитела, полученного в примере настоящего изобретения, связываться с каждым из антигенов.

На Фиг. 10c и 10d представлены результаты ELISA для сравнения аффинности связывания химерного антитела и гуманизированного антитела с каждым из антигенов.

На Фиг. 10e представлен результат оценки активности фагоцитоза микроглиями в отношении биспецифического антитела, полученного в примере настоящего изобретения.

На Фиг. от 11a до 11e представлены результаты оценки эффективности биспецифического антитела, полученного в примере настоящего изобретения, по сравнению с моноспецифическим антителом в животной модели на мышах.

На Фиг. 12 представлен результат, показывающий увеличение периода полувыведения и улучшение проникновения через ГЭБ в результате конструирования Fc в биспецифическом антителе, полученном в примере настоящего изобретения.

На Фиг. 13 представлен результат оценки способности уменьшать уровень α -суп в животной модели на мышах применительно к биспецифическому антителу, полученному в примере настоящего изобретения.

На Фиг. 14a, 14b и 14c представлены результаты сравнительного анализа с использованием ELISA по антигенсвязывающей способности дезамидированного антитела к IGF1R антитела, полученного в примерах настоящего изобретения, и контрольных антител, соответственно.

На Фиг. 15a-15c представлены результаты анализа методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) способности дезамидированного биспецифического антитела, полученного в примере настоящего изобретения, специфически связываться с IGF1R. Ab – антитело.

На Фиг. 16 представлен результат сравнительного анализа способности дезамидированного биспецифического антитела, полученного в примерах настоящего изобретения, и контрольных антител проникать через ГЭБ *in vivo*. CSF – спинномозговая жидкость.

На Фиг. 17 представлен результат сравнительного анализа способности дезамидированного биспецифического антитела, полученного в примерах настоящего изобретения, и контрольных антител проникать через ГЭБ *in vivo*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на следующие далее примеры, но подразумевается, что объем настоящего изобретения не ограничивается приведенными ниже примерами.

Пример 1. Получение мышинового антитела к альфа-синуклеину

1-1. Иммунизация и получение гибридом

Полноразмерный мономер альфа-синуклеина (140 остатков) или мономер с отщепленными в количестве 21 с С-конца остатками (длиной 119 остатков) помещали в термосмеситель при 37°C, подвергали агрегации со встряхиванием при 1050 об./мин в течение 14 суток и обрабатывали ультразвуком. Каждый образец фибрилл α -syn, состоящий из 140 остатков и 119 остатков, в концентрации 1 мг/мл смешивали с адьювантом в соотношении 1:1 (об.:об.). Аминокислотная последовательность альфа-синуклеина Homo sapiens представлена в SEQ ID NO: 173.

Затем 200 мкл приготовленной смеси вводили подкожной инъекцией самкам мышей BALB/c в возрасте от 5 до 7 недель. Через 2 недели подкожной инъекцией вводили еще 200 мкл приготовленной смеси для усиления продуцирования антител. Через одну неделю после введения бустер-дозы отбирали кровь и методом ELISA с использованием введенного антигена осуществляли определение титра антител после иммунизации. Вслед за этим осуществляли введение третьей бустер-дозы посредством подкожной инъекции только одного антигена.

Извлекали селезенку иммунизированной мыши и из селезенки получали клетки селезенки. Клетки селезенки суспендировали в не содержащей сыворотки среде (SFM) для гибридом (Thermo Fisher Scientific, USA), дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS). Для получения гибридом смешивали клетки селезенки и клетки миеломы SP2/0-Ag14 мыши в среде SFM для гибридом без сыворотки и после этого центрифугировали для удаления среды. Затем к полученному осадку клеток после центрифугирования добавляли полиэтиленгликоль (ПЭГ) и инкубировали при 37°C в течение 1 минуты, чтобы вызвать слияние клеток.

1-2. Клонирование одной клетки и очистка антител

Через 2 недели, в течение которых происходило слияние, наличие клеток, слитых с продуцирующими антитела В-клетками мыши, подтверждали методом ELISA с использованием введенного мыши антигена и среды для культивирования клеток. Затем выполняли клонирование одной клетки с использованием гибридомы для отбора 16

гибридом, продуцирующим моноклональные антитела. Клоны 9B11 (IgG1-каппа) получали, используя в качестве антигена агрегат полноразмерного (140 остатков) α -Syn, а клоны 3A9 и 11F11 (IgG2b-каппа и IgG2b-каппа, соответственно) получали, используя в качестве антигенов агрегаты α -Syn с отщепленными в количестве 21 с С-конца остатками.

Для очистки антител каждую гибридому культивировали в среде 1640 от Мемориального института Розуэлла Парка (RPMI), содержащей 10% FBS. Для получения антител культуральную среду заменяли на не содержащую сыворотки среду (SFM) и культивировали в течение примерно 4 суток. Супернатант после культивирования клеток отделяли, центрифугировали, фильтровали, используя фильтр с размером пор 0,22 мкм, и очищали на колонке с иммобилизованным белком G для выделения антител IgG1-типа и на колонке с иммобилизованным белком A для выделения остальных антител.

1-3. Определение последовательности вариабельной области

Последовательности вариабельной области и CDR определяли со ссылкой на описание Ahn et al., Mol. Cells, 2004, 18(2): 237-241. Гибридомы культивировали и центрифугировали для выделения только клеток. Из выделенных гибридом выделяли РНК, добавляя триазол, и использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК.

Пример 2. Получение (химерных) антител к альфа-синуклеину

2-1. Клонирование и экспрессия антител

С использованием нуклеотидных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антитела, полученного после гуманизации, синтезировали короткий нуклеотидный фрагмент gblock (m.biotech) и клонировали в вектор для культивирования в клетках животных (pcDNA3.4). Фрагмент gblock синтезировали путем введения последовательности, перекрывающей последовательность вариабельной области на 20 пар оснований (п.о.) до и после нее, и часть вектора pcDNA3.4, за исключением вариабельной области, амплифицировали с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и клонировали методом сборки по Гибсону.

Для проведения трансфекции и экспрессии клонированного антитела приготовленный вектор использовали вместе с набором Maxi-prep (Qiagen), чтобы получить большое количество плазмидной ДНК, и затем водили в клетки следующим образом. За день до проведения трансфекции концентрацию клеток ExpiCHO™ (Gibco,

№ по каталогу A29127) подводили до значения от 3×10^6 до 4×10^6 жизнеспособных клеток/мл в среде для экспрессии ExpiCHO™ (Gibco, № по каталогу A29100-01) и культивировали при 8% CO₂, 37°C и 120 об./мин в течение 1 суток. В день проведения трансфекции ДНК готовили клетки, которые были выращены до концентрации от 7×10^6 до 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл и имели уровни выживаемости 95% или более, путем разбавления с использованием порции свежей среды до 6×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

Для осуществления трансфекции родительских клеток готовили комплекс ExpiFectamine™ CHO (клеток яичников китайского хомячка) и плазмидной ДНК, используя набор для трансфекции ExpiFectamine™ CHO (Gibco, № по каталогу A29129). Реагенты ДНК и ExpiFectamine™ CHO готовили в соответствующих концентрациях путем разведения холодной средой OptiPRO™ SFM® (Gibco, № по каталогу 12309019), соответствующим образом использовали для инокулирования и перемешивали с выдерживанием при комнатной температуре в течение 5 минут. Данный продукт инокулировали в родительские клетки и после трансфекции проводили культивирование. На следующие сутки после проведения трансфекции трансфицированные клетки инокулировали, используя усилитель и питательные вещества, включенные в набор для трансфекции ExpiFectamine™ CHO, и через 5 суток дополнительно инокулировали, используя питательные вещества, после чего инкубировали в течение 10 суток при 8% CO₂, 37°C и 120 об./мин для получения трансфицированных клеток.

Чтобы получить культуральный раствор, культуральную среду переносили в стакан для центрифугирования и центрифугировали при 4°C и 6500 об./мин в течение 30 минут, после чего фильтровали с использованием фильтра с размером пор 0,2 мкм, получая культуральную среду с удаленными суспендированными твердыми веществами, и затем эту культуральную среду использовали для последующей очистки.

2-2. Очистка и секвенирование антитела

Культуральную среду очищали, используя колонку HiTrap MabSelectSure (GE Healthcare, 11-0034-94). После уравнивания уравнивающим буфером (50 мМ трис-НСl, рН 7,2; 100 мМ NaCl) извлеченную культуральную среду загружали на колонку. После завершения нанесения, среду промывали 50 мМ раствором цитрата натрия (рН 5,0) и затем элюировали, используя 50 мМ раствор цитрата натрия (рН 3,4). К элюату добавляли 1 М раствор трис-НСl с рН 9,0 для нейтрализации до рН 6,0. Затем

в элюате проводили замену буфера, концентрировали с использованием PBS (забуференного фосфатом физиологического раствора, pH 7,4) и хранили при 4°C до последующего применения.

При необходимости дополнительной очистки вторую очистку проводили, учитывая размер элюированного образца, посредством пропускания первоначально очищенного продукта через уравновешенную 1xPBS буфером колонку HiLoad 26/600 Superdex 200. Аминокислотную последовательность очищенного антитела анализировали с использованием масс-спектрометрии и подтверждали ее соответствие варибельной области происходящего из мыши моноклонального антитела.

Для получения химерного антитела на основе IgG1 человека часть остова варибельной области IgG1-изотипа человека заменяли варибельными областями антител 3A9, 9B11 и 11F11, идентифицированными указанным выше способом. Среди полученных химерных антител особенно антитело ch11F11 представляет собой антитело в форме IgG и содержит комбинацию последовательности варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 175 (ch11F11-VH). Выделенная жирным шрифтом часть в Таблице 11 соответствует участкам CDR.

Таблица 11

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
ch11F11-VH	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWV RQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSR DTSQSILYLQMNALRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWG QGTLVTVSA	175
ch11F11-VL	DIVMTQSPSSLAIVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNOKN YLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSG TDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEI K	176

Пример 3. Получение гуманизированного антитела

3-1. Получение фаговой библиотеки

Конструировали минибibliothekу, в которой последовательность мыши или человека была введена в каждый остаток CDR при одновременном связывании каркасного участка человека с CDR1, CDR2 и CDR3 химерного антитела.

Компетентными клетками полученной минибιβлиотеки инокулировали среду 2xYT («двукратный дрожжевой экстракт-триптон») (17 г триптона (CONDA, 1612.00), 10 г дрожжевого экстракта (CONDA, 1702.00) и 5 г NaCl (Sigma, S7653)), содержащую хлорамфеникол (34 мкг/мл; Sigma, C0857), 2% глюкозы (Sigma, G5400) и 5 мМ MgCl₂ (Sigma, C0857), при 30°C в течение 3 часов до значения оптической плотности при длине волны 600 нм (OD₆₀₀), равного 0,5-0,7. Затем клетки инфицировали хелперным фагом и культивировали в среде 2xYT, содержащей хлорамфеникол (34 мкг/мл), 5 мМ MgCl₂, канамицин (70 мкг/мл; Sigma, K1876) и 1 мМ изопропилтиогалактозид (IPTG; ELPISBIO, IPTG025), при 30°C в течение 6 часов, чтобы вызвать упаковку фага. Культуральный раствор центрифугировали при 4500 об./мин при 4°C в течение 15 минут. В супернатант добавляли ПЭГ 6000 (4%; Fluka, 81253) и NaCl (3%; Sigma, S7653) и инкубировали в течение 1 часа на льду. Продукт центрифугировали при 8000 об./мин в течение 20 минут при 4°C, затем осадок после центрифугирования суспендировали в PBS и еще раз центрифугировали при 4°C и 12000 об./мин в течение 10 минут, получая супернатант, содержащий фаговую бιβлиотеку. Полученный супернатант хранили при 4°C до последующего применения.

3-2. Пэннинг с использованием фагового дисплея

Для отбора антител, которые связываются с агрегатами альфа-синуклеина предпочтительнее, чем с мономерами, проводили пэннинг, используя агрегаты полноразмерного альфа-синуклеина, полученные в примере 1, и в общей сложности осуществляли три раунда пэннинга так, как приведено ниже.

Бычий сывороточный альбумин (BSA) в концентрации 3% добавляли к клеткам в пробирке для тестирования при 4°C в течение ночи, в эту же тестируемую пробирку добавляли раствор агрегатов и мономеров рекомбинантного альфа-синуклеина (10 мкг/мл) в PBS в иммунопробирке (Maxisorp 444202) и поверхность, на которой не адсорбировались агрегаты и мономеры альфа-синуклеина, защищали. После опорожнения пробирки для тестирования фаговую бιβлиотеку антител размером 10¹² колониеобразующих единиц (КОЕ), диспергированную в 3%-ном растворе BSA, помещали в иммунопробирку, в которой были адсорбированы агрегаты и мономеры альфа-синуклеина, и проводили взаимодействие в течение 1 часа (отрицательный отбор). Далее фаги, не связавшиеся с агрегатами и мономерами альфа-синуклеина, извлекали, и в течение 2 часов проводили взаимодействие при комнатной температуре с адсорбированными агрегатами и мономерами альфа-синуклеина. Забуференный

фосфатом физиологический раствор (с 0,05% твина 20) использовали для извлечения 100 мкМ раствора триэтиламина, который извлекали, используя раствор PBS-T. Клетки *E. coli* выдерживали при 37°C в течение 1 часа и инфицированные *E. coli* высевали на агаризованной 2xYT среде и культивировали при 37°C в течение ночи (pH 7,4), они были инфицированы ER2537. На следующий день культивированные *E. coli* суспендировали в 4 мл культурального раствора в 2xYT, содержащего карбенициллин, добавляли глицерин (15%) и часть хранили при -80°C, а остальную часть использовали для получения фагов для следующих экспериментов. Путем повторения этого процесса в общей сложности за 3 раунда, пул фагов, специфичных к антигену альфа-синуклеину, амплифицировали и концентрировали. По мере продвижения по раундам число промывок с использованием PBS-T увеличивали для амплификации и концентрирования антигенспецифичных фагов.

3-3. Скрининг отдельных клонов

Для сортировки моноклональных антител, специфически связывающихся с агрегатами альфа-синуклеина, из пула фагов, полученного в результате пэннинга, проводили описанный ниже эксперимент.

Чтобы изолировать моноклоны из концентрированного пула после окрашивания пула фагов на агаризованной среде Лурия-Бертани (LB) с тетрациклином/карбенициллином и культивирования, выделяли единичную колонию. Затем, после инокулирования моноклонами 96-луночного планшета с глубокими лунками, в случае которого в одну лунку помещали по 400 мкл среды 2xYT с тетрациклином/карбенициллином и выращивание проводили в течение ночи, по 10 мкл культурального раствора помещали в новый 96-луночный планшет с глубокими лунками, в случае которого в одну лунку помещали по 390 мкл среды 2xYT с тетрациклином/карбенициллином и культивировали при 37°C в течение 4 часов. В культуральный раствор помещали IPTG (1 мМ) и культивирование проводили при 30°C в течение ночи. После культивирования в течение ночи культуральный раствор центрифугировали для отбора супернатанта.

Далее с использованием метода ELISA отбирали клоны, экспрессирующие растворимый моноклон scFv, который связывается с агрегатом альфа-синуклеина. Конкретно, отобранное в примере 1-1 антитело 7B7 помещали в 96-луночный планшет (иммунопланшеты Nunc, NUNC, USA) и использовали для покрытия поверхности при 4°C в течение ночи. В каждую лунку добавляли 3%-ный BSA в количестве 200 мкл, после

чего осуществляли блокирование при 37°C в течение 2 часов. Затем загружали агрегаты и мономеры альфа-синуклеина в количестве 100 нг/лунка, проводили взаимодействие при 37°C в течение 2 часов и пять раз промывали по 300 мкл PBS-T. Полученный супернатант отдельного клона смешивали с 3%-ным раствором BSA в объемном соотношении 1:1 (об.:об.) и 100 мкл этого раствора загружали в планшет для связывания с агрегатом и мономером, далее проводили взаимодействие при 37°C в течение 2 часов. Клетки пять раз промывали по 300 мкл PBS-T и инкубировали при 37°C в течение 1 часа с конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) антителом к гемагглютину (HA), затем пять раз промывали PBS-T. После добавления 100 мкл ТМВ (тетраметилбензидина; Sigma, T0440) реакцию останавливали, добавляя 50 мкл 1 н. раствора H₂SO₄ для измерения поглощения при 450 нм. Клоны с поглощением 0,5 или выше считали положительными в отношении реакции связывания, а клоны, неспецифически связывающиеся с BSA, исключали.

Участки CDR в клонах, обнаруженных в библиотеке, анализировали *in silico*, и одновременно клоны, вызывающие серьезные проблемы со связыванием с каркасным участком, или клоны, не имеющие Т-клеточного эпитопа, В-клеточного эпитопа и эпитопа главного комплекса гистосовместимости II типа (МНСII) в каркасных частях, отличных от CDR, были отобраны.

После этого переменные области отобранных клонов, замещенные на переменные области остова антитела человека IgG1-изотипа, чтобы получить гуманизованное антитело с остовом IgG1. Конкретно, hu11F11 (H2L4) представляет собой антитело IgG-типа с комбинацией hu11F11-VH2 SEQ ID NO: 146 и hu11F11-VL4 SEQ ID NO: 148; hu11F11 (вер.1) представляет собой антитело IgG-типа с комбинацией hu11F11-VH-v1 SEQ ID NO: 142 и hu11F11-VLv3 4с SEQ ID NO: 147; hu11F11 (вер.3) представляет собой антитело IgG-типа с комбинацией hu11F11-VH-v3 SEQ ID NO: 144 и hu11F11-VLv3 4с SEQ ID NO: 147; а hu11F11 (вер.4) представляет собой антитело IgG-типа с комбинацией hu11F11-VH-v4 SEQ ID NO: 145 и hu11F11-VLv3 4с SEQ ID NO: 147.

Пример 4. Анализ антител к альфа-синуклеину посредством ELISA

Для количественного анализа аффинности связывания химерного антитела (ch11F11), полученного в примере 2, и гуманизованных антител (hu11F11), полученных в примере 3, проводили сэндвич-ELISA.

Конкретно, каждое антитело разбавляли 1/10 до концентраций в диапазоне от 0,04 до 400 нМ и использовали для покрытия поверхности лунок 96-луночного планшета, и каждую лунку обрабатывали агрегатами в концентрации 2000 нг/мл. После промывки 1xPBS осуществляли обработку конъюгированным с биотином захватывающим антителом и конъюгированным с HRP стрептавидином, после чего проводили реакцию с ТМВ в качестве субстрата и измеряли соответствующее этому поглощение. Результаты показаны на Фиг. 1.

Как показано на Фиг. 1, было подтверждено, что гуманизированные антитела по настоящему изобретению, в частности, гуманизированное антитело, происходящее из химерного 11F11 (гуманизированное антитело 11F11), демонстрировали аффинность связывания, эквивалентную таковой у клона химерных 11F11. Гуманизированные антитела, особенно варианты, происходящие из 11F11, такие как hu11F11 (вер.1), имеющие комбинацию hu11F11-VH-v1 и hu11F11-VLv3 4с, hu11F11 (вер.2), имеющие комбинацию hu11F11-VH-v2 и hu11F11-VLv3 4с, hu11F11 (вер.3), имеющие комбинацию hu11F11-VH-v3 и hu11F11-VLv3 4с, и hu11F11 (вер.4), имеющие комбинацию hu11F11-VH-v4 и hu11F11-VLv3 4с, демонстрировали аффинность связывания, эквивалентную клону химерных 11F11. Значения их EC_{50} составляли от 11,5 до 15,1 нМ, что было схоже со значением EC_{50} 12,5 нМ в случае химерного 11F11.

Пример 5. Анализ с применением VIAcore в случае антитела к альфа-синуклеину

Многие химерные антитела, полученные в примере 2, и гуманизированные антитела из примера 3 количественно анализировали с учетом аффинности связывания многих гуманизированных антител.

Применяли устройство T200 (GE Healthcare, S/N: 1565888). Белок А использовали в качестве чипа (GE Healthcare, № по каталогу 29-1275-56). 10 мМ раствор глицина-HCl pH 1,5 (GE Healthcare, № по каталогу BR-1003-54) использовали в качестве регенерирующего буфера. В качестве рабочего буфера, буфера для разбавления аналита и буфера для разбавления образца использовали HBS-EP. Антитела, полученные в примере 2 и примере 3, разбавляли, используя 1xHBS-EP (GE Healthcare, № по каталогу BR-1006-69), выполняли серийные разведения мономера альфа-синуклеина (1 мг/мл) и белка фибрилл (3 мг/мл) в двух повторах и анализировали в общей сложности в 6 концентрациях (0; 0,39; 1,56; 6,25; 25; 100 нМ), включая 0 нМ. Для осуществления захвата использовали мономер, соответствующий (теоретически) 800 резонансным

единицам (RU), и белок фибрилл, соответствующий (теоретически) 100 RU. Фазу захвата выполняли при времени контакта 60 секунд, скорости потока 30 мкл/мин и периоде стабилизации 180 секунд. Фазу ассоциации выполняли при времени ассоциации 120 секунд и скорости потока 30 мкл/мин. Фазу диссоциации выполняли при времени диссоциации 360 секунд и скорости потока 30 мкл/мин. Фазу регенерации выполняли дважды при времени регенерации 240 секунд (первый раз) и 60 секунд (второй раз) и скорости потока 30 мкл/мин. Аппроксимацию проводили с использованием модели связывания 1:1 и программного обеспечения для количественного определения Viascore T200 Evaluation software (GE Healthcare).

Результаты анализа показаны на Фиг. 2а-2с и в приведенной далее таблице.

Таблица 12

ID клона	K_D (нМ)
Ch11F11	0,02472
Hu11F11 (вер.2)	0,0596
Hu11F11 (вер.3)	0,0316
Hu11F11 (вер.4)	0,0204

В результате, гуманизированные антитела в этой интерпретации, в частности гуманизированные антитела, происходящие из химерного антитела 11F11, такие как hu11F11 (вер.2), hu11F11 (вер.3) и hu11F11 (вер.4), демонстрировали такое же значение K_D , что и химерное антитело 11F11. Связывание гуманизированных антител характеризовалось значениями K_D $(0,02-0,06) \times 10^{-9}$ М, и низкое значение K_D , равное $0,02 \times 10^{-9}$ М, было получено для химерного антитела, которое обладало высокой аффинностью к плавающим тельцам.

Пример 6. Получение антитела к IGF1R (scFv)

6-1. Получение антитела к IGF1R (scFv)

Моноклональные антитела получали, используя метод фагового дисплея/пэннинга. Конкретно, в качестве антигенов, использованных при проведении пэннинга с фаговым дисплеем и другого вида анализа, применяли следующие белки. В этом примере использовали пептид, состоящий из остатков 31-932 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 99, в случае которого сигнальную последовательность удаляли из внеклеточного домена IGF1R человека и вводили гистидиновую метку на С-конце (R&D Systems, USA, 391-GR). Для тестирования межвидовой перекрестной реактивности в качестве антигенов использовали IGF1R обезьяны (National Research

Council, Canada), мышинный IGF1R (R&D Systems, 6630-GR/CF) и крысиный IGF1R (National Research Council, Canada) с His-меткой на С-конце.

Клетки из библиотеки scFv (одноцепочечных переменных фрагментов) с разнообразием 1×10^{10} вариантов, полученной от человека (приготовленной SHIM Hyunbo в Женском университете Ихва), использовали для инокулирования среды 2xYT (17 г триптона (CONDA, 1612.00), 10 г дрожжевого экстракта (CONDA, 1702.00) и 5 г NaCl (Sigma, S7653)), содержащей хлорамфеникол (34 мкг/мл; Sigma, C0857), 2% глюкозы (Sigma, G5400) и 5 mM MgCl₂ (Sigma, C0857), и подращивали при 30°C в течение 3 часов до значения OD₆₀₀ 0,5-0,7. Затем клетки инфицировали хелперным фагом и культивировали в среде 2xYT, содержащей хлорамфеникол (34 мкг/мл), 5 mM MgCl₂, канамицин (70 мкг/мл; Sigma, K1876) и 1 mM IPTG (ELPISBIO, IPTG025), при 30°C в течение 16 часов, чтобы вызвать упаковку фага. Далее культуральный раствор центрифугировали при 4500 об./мин при 4°C в течение 15 минут. В супернатант добавляли 4% ПЭГ 6000 (Fluka, 81253) и 3% NaCl (Sigma, S7653) и инкубировали в течение 1 часа на льду. Продукт центрифугировали при 8000 об./мин в течение 20 минут при 4°C, затем осадок после центрифугирования суспендировали в PBS и еще раз центрифугировали при 4°C и 12000 об./мин в течение 10 минут, получая супернатант, содержащий фаговую библиотеку. Полученный супернатант хранили при 4°C до последующего применения.

6-2. Пэннинг с использованием фагового дисплея

Для проведения скрининга антител к IGF1R человека проводили три раунда пэннинга в соответствии с изложенным ниже. Фаговая библиотека представляла собой синтетическую библиотеку scFv человека, методика пэннинга с фаговым дисплеем и результат показаны в Таблице 13.

Таблица 13

Стадия	Пэннинг		
	1-ый раунд	2-ой раунд	3-ий раунд
Антиген	ECD IGF1R (биотинилированный)	ECD IGF1R (биотинилированный)	Клетка MCF-7
Метод покрытия поверхности	Непрямая иммобилизация	Непрямая иммобилизация	-
На входе	$7,0 \times 10^{12}$	$6,0 \times 10^{12}$	$5,0 \times 10^{12}$

На выходе	IGF1R или MCF-7	4,9 x 10 ⁸	3,3 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵
Промывка	PBS-T**	5 раз	10 раз	10 раз
	PBS	2 раза	2 раза	2 раза

Конкретно, 1 мл раствора рекомбинантного белка IGF1R человека в концентрации 5 мкг/мл (391-GR от R&D Systems, USA, или 10164-H08H-50R от Sino Biological Life Technologies, USA) добавляли в иммунопробирку (Maxisorp, 444202) и поверхность иммунопробирки покрывали при 4°C в течение 16 часов. Затем супернатант удаляли и инкубировали с добавлением PBS, содержащего 3% BSA, при 37°C в течение 1 часа для блокирования неспецифического связывания посредством связывания BSA с поверхностью, не занятой связавшимся IGF1R. После удаления супернатанта фаговую библиотеку, полученную в примере 11-1, смешанную с 1,5%-ным раствором BSA, помещали в иммунопробирку и проводили взаимодействие при 37°C в течение 1 часа, давая возможность специфичному к IGF1R фагу связаться с антигеном. Затем продукт промывали раствором PBS-T (забуференным фосфатом физиологическим раствором, содержащим 0,05% твина 20) для удаления неспецифически связавшихся фагов, и фаги, связавшиеся с IGF1R, собирали, используя 100 мМ раствор триэтиламина.

Суспензию с собранными фагами нейтрализовали 1 М раствором трис-буфера (pH 7,4) и использовали для трансфекции *E. coli* K12 ER2738 при 37°C в течение 1 часа, и инфицированные *E. coli* высевали на агаризованную среду LB, содержащую тетрациклин и карбенициллин, и культивировали при 37°C в течение ночи. На следующий день культивированные *E. coli* суспендировали в 5 мл среды SB (супер бульон), содержащей тетрациклин и карбенициллин, и добавляли равный объем 50%-ного глицерина. Одну часть хранили при -80°C, а 50 мкл продукта суспендировали в 40 мл среды SB (супер бульон), содержащей тетрациклин и карбенициллин, добавляли хелперный фаг VCSM13 из расчета 10¹² бляшкообразующих единиц (БОЕ) и культивировали с перемешиванием при 37°C в течение 1 часа. Затем к культуральному раствору добавляли канамицин и культивировали при 30°C в течение примерно 16 часов, чтобы культивировать только клетки *E. coli*, инфицированные хелперным фагом.

На следующий день, после центрифугирования культурального раствора, отбирали супернатант и добавляли к буферу, содержащему 4% ПЭГ 8000 и 3% хлорида натрия (NaCl), проводили взаимодействие при 4°C в течение примерно 1 часа и фаги осаждали центрифугированием. После удаления супернатанта осажденный пул фаговых

частиц ресуспендировали в PBS-буфере, содержащем 1% BSA, и использовали для следующего раунда пэннинга. По мере продвижения по раундам число промывок с использованием PBS-T увеличивали для амплификации и концентрирования антигенспецифичных фагов.

6-3. Скрининг единичных клонов

Отбирали клоны клеток, демонстрирующие аффинность связывания с ECD (внеклеточным доменом) IGF1R человека и с MCF-7, экспрессирующими IGF1R.

Конкретно, для отбора моноклональных антител, специфически связывающихся с IGF1R, из пула фагов, полученного в примере 11-2, проводили описанный далее эксперимент.

Чтобы изолировать моноклоны из концентрированного пула, пул фагов, полученный на агаризованной среде LB с тетрациклином/карбенициллином, рассеивали и культивировали для выделения отдельных колоний. После инокулирования этими колониями 96-луночного планшета с глубокими лунками и инкубирования в течение ночи использовали 10 мкл культурального раствора для повторного инокулирования 96-луночного планшета с глубокими лунками и инкубировали аналогичным образом при 37°C в течение примерно 4 часов до получения соответствующих значений OD (0,5-0,7). После добавления в культуральный раствор хелперного фага с множественностью заражения (MOI) 20 проводили взаимодействие в смеси при 37°C в течение 1 часа. После этого в культуральную среду добавляли канамицин и культивировали в течение ночи при 30°C. На следующий день культуральную среду центрифугировали и отбирали супернатант для проведения ELISA с целью отбора IGF1R-специфичных фагов (Steinberger, Rader and Barbas III. 2000. Phage display vectors. В: Phage Display Laboratory Manual. 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, pp. 11.9-11.12).

В каждую лунку планшета для ELISA добавляли по 100 нг рекомбинантного IGF1R и проводили взаимодействие при 4°C в течение примерно 15 часов для покрытия поверхности лунок планшета антигеном. Для предотвращения неспецифического связывания в каждую лунку добавляли по 200 мкл PBS буфера, содержащего 3% BSA, и затем проводили взаимодействие при 37°C в течение примерно 1 часа. Супернатант отбрасывали.

В каждую лунку помещали по 100 мкл раствора, содержащего полученный из одного клона фаг, осуществляли взаимодействие при 37°C в течение 1 часа и 3 раза промывали, используя по 300 мкл PBS-T. Для детектирования фага, связавшегося с

антигеном IGF1R, конъюгированное с HRP антитело к HA разбавляли 1:5000 в PBS буфере, содержащем 3% BSA, и проводили взаимодействие при 37°C в течение 1 часа. После 3-кратной промывки по 300 мкл PBS-T добавляли 100 мкл ТМВ (тетраметилбензидина, Sigma, T0440) для проявления окраски, а для гашения этой реакции добавляли 50 мкл 1 н. раствора H₂SO₄. Основываясь на измерении поглощения при 450 нм, в качестве клонов антигенспецифических антител отбирали клоны с сильным поглощением по сравнению с контрольной группой, обработанной BSA. В результате проведения двукратного скрининга отбирали клоны 1564.

Пример 7. Получение вариантов антитела к IGF1R с измененной аффинностью

Оптимизацию антител выполняли путем изменения аффинности для отобранных клонов по результатам оценки лиганд-связывающей способности и способности проникать через ГЭБ. В первом испытании получали приготовленные вручную смеси NNS-содержащих праймеров для рандомизации CDR2 тяжелой цепи и CDR3 легкой цепи на основании scFv 1564 и амплифицированного гена scFv 1564, содержащего рандомизированную последовательность, с использованием метода ПЦР. Амплифицированные генные продукты встраивали в вектор pComb3x для создания формы библиотеки, подходящей для фагового дисплея, и посредством пэннинга этой библиотеки и скрининга с использованием ELISA можно было отобрать ряд клонов scFv, связывающихся с IGF1R. Для отобранных клонов посредством секвенирования генов идентифицировали аминокислотные последовательности варибельной области.

Во втором испытании конструировали две минибibliotheki для тяжелых и легких цепей, в которых были введены соответствующие зародышевой линии обратные мутации в CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно. В конечном итоге клоны получали, осуществляя отбор вариантов с измененной аффинностью на основании продуктивности и аффинности связывания клонов с антигеном.

Пример 8. Получение вариантов антител, имеющих дезамидированные остатки

8-1. Идентификация дезамидированных остатков

Осуществление реакции дезамидирования означает, например, что в результате атаки пептидной связи боковой цепью аспарагина образуется симметричное сукцинимидное промежуточное соединение, и это промежуточное соединение путем гидролиза превращается как в аспарагиновую кислоту, так и в изоаспарагиновую

кислоту. В частности, когда дезамидирование происходит в CDR, то антитело расщепляется и становится слабо связывающимся с антигеном, что может приводить к снижению эффективности и к гетерогенности образца. Гетерогенность образца осложняет его идентификацию при клинических испытаниях. Ввиду этого предполагалось идентифицировать место, где происходит дезамидирование, с использованием анализа *in silico* и пептидного картирования и, в конечном итоге, обеспечить стабильность путем предотвращения дезамидирования с одновременным получением улучшенных характеристик и эффективности.

Как показано на Фиг. 8, наличие фактического дезамидирования было установлено с использованием анализа *in silico* и пептидного картирования в отношении родительского клона 1564. Для этого образцы выдерживали при 4°C или 40°C в течение одной недели перед проведением анализа и подтверждали, что дезамидирование происходило в L-CDR2, L-CDR3 и H-CDR2. Варианты с измененной аффинностью, описанные в примере 7, также анализировали для подтверждения расположения места дезамидирования.

8-2. Получение вариантов антител

Способ удаления дезамидированного остатка осуществляли путем замены расположенного после него остатка с получением варианта с мутацией.

1) В аминокислотной последовательности выполняли замену Asn на остатки D или Q, схожие с Asn. Если у варианта с мутацией не наблюдалось никакого изменения в аффинности связывания, то все остатки заменяют на Q.

2) N95a, дезамидированный остаток в LCDR3, заменяли на остатки H, R и K, имеющие положительный заряд. Клоны, подвергнутые этому процессу дезамидирования, также обозначаются клонами дезамидирования (de)(StoP).

3) Остатки, расположенные непосредственно после остатков CDR, в которых происходит дезамидирование, заменяли. Эти остатки являются относительно небольшими и слабозаряженными (например, остатками глицина или серина). Поэтому посредством замены этих остатков на другие гидрофобные остатки и остатки относительно небольшого размера (например, валина или аланина), делали попытку свести к минимуму разницу в аффинности связывания по сравнению с родительским антителом (клонами до замены остатков) (Таблица 21). Клоны, подвергнутые этому процессу дезамидирования, также обозначаются клонами дезамидирования (de)(StoP). В

приведенной ниже таблице показано, как выполнить замену остатка, расположенного после остатка, в котором происходит дезамидирование.

Таблица 14

Расположение в антителах	CDR (последовательность)	Сайт дезамидирования	Замена
Легкая цепь	2 (AN <u>S</u> NRPS)	N51	S52V
Легкая цепь	3 (GTWAGSLN <u>G</u> YV)	N95a	G95bA
Тяжелая цепь	2 (SYD <u>N</u> GN)	N54	G55A

Курсив: дезамидированный остаток.

Шрифт жирный и с подчеркиванием: остаток, подлежащий замене.

Пример 9. Получение различных форм антител к IGF1R

9-1. Получение миниантитела к IGF1R

Миниантитело получали путем присоединения целиком scFv IGF1R-специфичного моноклонального антитела из фаговой библиотеки, полученного в примерах 6-8, к С-концу Fc. Для этого получали нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность scFv, приведенную в Таблице 12, выполняли расщепление этой нуклеотидной последовательности под действием фермента рестрикции и клонировали в экспрессирующий вектор на основе pcDNA, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую Fc.

9-2. Получение бивалентного антитела к IGF1R

Получали целиком scFv IGF1R-специфичного моноклонального антитела из фаговой библиотеки, полученного в примерах 6-8, и два целиком scFv соединяли с каждым из С-концов терапевтического антитела в форме IgG, получая бивалентное антитело. Для этого получали нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность scFv, приведенную в Таблице 12, выполняли расщепление под действием фермента рестрикции и клонировали в экспрессирующий вектор на основе pcDNA, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтическое антитело.

9-3. Получение антитела к IGF1R в форме IgG (полноразмерного IgG)

Для того, чтобы преобразовать последовательности антитела 1564 и антитела F06 в форму полноразмерного IgG1 (полн. IgG) среди IGF1R-специфичных моноклональных антител из фаговой библиотеки, полученных в примерах 6 и 7, синтезировали нуклеотидные последовательности областей тяжелой цепи и легкой цепи (Genotec Inc.).

Синтезированные гены тяжелой цепи и легкой цепи клонировали в экспрессирующие векторы. Одна тяжелая цепь, соединенная с одной молекулой scFv антитела к GF1R, и другая тяжелая цепь, не содержащая scFv антитела к IGF1R, и общая легкая цепь составляли моновалентную форму антитела.

9-4. Получение моновалентного антитела к IGF1R в форме scFv

Пример 9-2 относится к форме миниантитела, в которой антитело к IGF1R в форме scFv связано с каждым из C-концов двух Fc тяжелых цепей. В этом примере один scFv связан с C-концом только одного Fc в тяжелой цепи. В случае формы антитела, полученного в примерах 6-8, конструировали вектор, в котором 1564, F06, C04, VH5, VH16, VH35, VH9, VH2, VH7 и VH32 из IGF1R-специфичного моноклонального антитела из фаговой библиотеки были соединены с C-концом только одного Fc, и конструировали вектор, не содержащий антитела к IGF1R, соединенного с C-концом. Мутацию типа «выступы-во-впадины» вводили в Fc-области для получения гетеромерной формы при продуцировании антител в клетках.

9-5. Экспрессия и очистка различных антител к IGF1R

Векторы, полученные в примерах от 9-1 до 9-4, вводили в клетки так, как приведено ниже.

Конкретно, клетки CHO-S подводили до концентрации $1,5 \times 10^6$ клеток/мл в среде CD-CHO (Gibco, 10743) и затем культивировали в условиях 8% CO₂ при 37°C в течение 1 суток. В день проведения трансфекции с использованием ДНК клетки, выращенные до $2,5-3 \times 10^6$ клеток/мл, готовили в концентрации $2,1 \times 10^6$ клеток/мл, используя среду CD-CHO, содержащую 1% диметилсульфоксида (DMSO), и затем культивировали в условиях 8% CO₂, 37°C в течение 3 часов. После центрифугирования при 3000 об./мин в течение 15 минут супернатант удаляли и ресуспендировали в среде RPMI 1640 с 2,5% FBS.

После этого комбинацию векторов разбавляли в среде Opti-MEM из расчета 1 мкг на один мл среды и готовили разведение полиэтиленимина (PEI; Polysciences, 23966, исходная концентрация 1 мг/мл) из расчета 8 мкг на один мл культуральной среды. После перемешивания смесей ДНК и PEI и выдерживания смеси при комнатной температуре в течение 10 мин смесь выливали в колбу, содержащую клетки, и инкубировали в течение 4 часов при 5% CO₂, 37°C, 100 об./мин. Затем смесь культивировали с добавлением среды CD-CHO в том же объеме, что и объем культуры, и инкубировали при 8% CO₂, 37°C, 110 об./мин в течение 4 суток.

Полученный культуральный раствор пропускали через колонку MabSelectSure (GE Healthcare, 5 мл), уравновешенную путем пропускания уравновешивающего буфера (50 мМ трис-HCl; pH 7,5; с 100 мМ NaCl), давая возможность экспрессированному антителу связаться с колонкой. Затем, после элюирования 50 мМ раствором Na-цитрата (pH 3,4) и 100 мМ раствором NaCl проводили нейтрализацию, используя 1 М раствор трис-HCl (pH 9,0), чтобы конечное значение pH составляло 7,2. После этого буферный раствор заменяли на PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор, pH 7,4) и, если чистота была высокой, его хранили при -20°C после приготовления, а когда была необходима дополнительная очистка, его хранили при 4°C до проведения дальнейшей очистки.

При необходимости дополнительной очистки его очищали, используя колонку HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare, № по каталогу 28-9893-36), и для очистки можно было использовать разные виды гель-проникающей хроматографии. После уравновешивания уравновешивающим буфером (1х забуференным фосфатом физиологическим раствором, pH 7,4, Gibco, № по каталогу 10010-023) первоначально очищенный образец загружали на колонку. Полностью очищенный образец после получения хранили в замороженном состоянии при -20°C.

Пример 10. Получение биспецифического антитела

Антитело к IGF1R в форме scFv по настоящему изобретению получали путем соединения вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи с использованием линкера (SEQ ID NO: 134), и чтобы получить биспецифическое антитело, проводили присоединение к С-концу константной области тяжелой цепи полноразмерной формы IgG антитела к альфа-синуклеину, используя линкер с SEQ ID NO: 133. Помимо этого, для создания формата биспецифического антитела моновалентное антитело получали путем соединения одной молекулы в форме scFv антитела к IGF1R в форме scFv с одной молекулой антитела к альфа-синуклеину в форме IgG, и бивалентное антитело получали путем соединения двух молекул антитела к IGF1R в форме scFv с одной молекулой антитела к альфа-синуклеину в форме IgG, соответственно.

Типичные последовательности антитела к альфа-синуклеину, использованные для получения биспецифического антитела в этом примере, и комбинация рекомбинантных тяжелой цепи и легкой цепи биспецифического антитела, полученного согласно настоящему изобретению, показаны в приведенной выше Таблице 10.

Конкретный способ получения бивалентного биспецифического антитела и моновалентного биспецифического антитела описан ниже.

10-1. Клонирование бивалентного биспецифического антитела

Чтобы сконструировать экспрессирующий вектор для бивалентного биспецифического антитела, нуклеотидную последовательность для антитела, включая сигнальную последовательность, встраивали в сайт множественного клонирования (MCS) вектора pcDNA3.4 (Invitrogen). Экспрессирующий вектор для биспецифического антитела представлял собой вектор для моноцистронной экспрессии, и, соответственно, получали экспрессирующие векторы для тяжелой цепи и экспрессирующие векторы для легкой цепи.

В качестве последовательности тяжелой цепи, встроенной в экспрессирующий вектор для тяжелой цепи, scFv фрагмент антитела к IGF1R, был соединен через линкер с С-концом иммуноглобулина, в котором были соединены переменная область тяжелой цепи и константная область тяжелой цепи антитела к альфа-синуклеину человека. В качестве последовательности легкой цепи, встроенной в экспрессирующий вектор для легкой цепи, были соединены переменная область легкой цепи и константная область легкой цепи антитела к альфа-синуклеину человека.

10-2. Клонирование моновалентного биспецифического антитела

Моновалентное биспецифическое антитело представляло собой гетеродимер, содержащий тяжелую цепь («впадину») иммуноглобулина к альфа-синуклеину, к которой на С-конце был присоединен scFv антитела к IGF1R, тяжелую цепь («выступ») иммуноглобулина к альфа-синуклеину, к которой этот scFv присоединен не был, и легкую цепь, конъюгированную с этим гетеродимером.

Для повышения эффективности конъюгирования тяжелых цепей гетеродимера использовали метод «выступы-во-впадины». А именно, в соответствующей части СН3 кодирующей последовательности тяжелой цепи производили замены «по типу впадины» T366S, L368A и Y406V, а в соответствующей части СН3 кодирующей последовательности тяжелой цепи производили замену аминокислот T366W «по типу выступа».

10-3. Временная экспрессия

Полученный вектор готовили с использованием набора Maxi-prep (Qiagen), чтобы получить большое количество плазмидной ДНК. Затем их вводили в клетки следующим образом. Чтобы получить моновалентное биспецифическое антитело (bsAb), при

проведении трансфекции использовали экспрессирующий вектор с ДНК для тяжелой цепи и экспрессирующий вектор с ДНК для легкой цепи в соотношении 1:1. Чтобы получить моновалентное bsAb, при проведении трансфекции использовали экспрессирующий вектор с ДНК для тяжелой цепи «по типу впадины», экспрессирующий вектор с ДНК для тяжелой цепи «по типу выступа» и экспрессирующий вектор с ДНК для легкой цепи в соотношении 0,5:0,5:1.

За день до проведения трансфекции концентрацию клеток ExpiCHO™ (Gibco, № по каталогу A29127) подвели до значения от 3×10^6 до 4×10^6 жизнеспособных клеток/мл в среде для экспрессии ExpiCHO™ (Gibco, № по каталогу A29100-01) и культивировали при 8% CO₂, 37°C и 120 об./мин в течение 1 суток. В день проведения трансфекции с использованием ДНК клетки, которые были выращены до концентрации от 7×10^6 до 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл и имели уровни выживаемости 95% или больше, были разбавлены с использованием порции свежей среды до 6×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

Для осуществления трансфекции родительских клеток готовили комплекс ExpiFectamine™ CHO и плазмидной ДНК, используя набор для трансфекции ExpiFectamine™ CHO (Gibco, № по каталогу A29129). Каждый из реагентов, ДНК и ExpiFectamine™ CHO, готовили в соответствующих концентрациях и инокулировали в старую среду OptiPRO™ SFM® (Gibco, № по каталогу 12309019), которую отмеряли и перемешивали с выдерживанием при комнатной температуре в течение 5 минут. Данным продуктом инокулировали родительские клетки и после трансфекции проводили культивирование. На следующие сутки после проведения трансфекции трансфицированные клетки инокулировали, используя усилитель и питательные вещества, включенные в набор для трансфекции ExpiFectamine™ CHO, и через 5 суток дополнительно инокулировали, используя питательные вещества, после чего инкубировали в течение 10 суток при 8% CO₂, 37°C и 120 об./мин для получения трансфицированных клеток.

10-4. Сбор среды

Чтобы обработать культуральный раствор после завершения культивирования, культуральную среду переносили в стакан для центрифугирования и центрифугировали при 4°C и 6500 об./мин в течение 30 минут, после чего фильтровали с использованием фильтра с размером пор 0,2 мкм, получая культуральную среду с удаленными

суспендированными твердыми веществами. Затем эту культуральную среду использовали для последующей очистки.

Пример 11. Анализ аффинности специфического связывания с IGF1R с использованием антитела к IGF1R

11-1. Анализ (ELISA) аффинности специфического связывания с IGF1R с использованием антитела к IGF1R в форме миниантитела

Для тестирования аффинности связывания и зависящего от концентрации связывания клонов 996, 1226, 1564 и МКJP2 в форме миниантитела, полученных в примере 9-1, с рекомбинантным IGF1R проводили ELISA анализ.

Конкретно, рекомбинантный IGF1R человека, который является мишенью для связывания антител, представляет собой внеклеточный домен (ECD), приобретали у R&D Systems (6630-GR/CF). IGF1R человека разбавляли до концентрации 1 мкг/мл в PBS буфере, добавляли в 96-луночный планшет для ELISA (иммунопланшеты Nunc, NUNC, Rochester, NY) в количестве 100 мкл на одну лунку, нанесение покрытия осуществляли, проводя взаимодействие при 4°C в течение 16 часов, и затем супернатант удаляли. Добавляли PBS буфер, содержащий 3% BSA (бычьего сывороточного альбумина), из расчета до 200 мкл на одну лунку и проводили взаимодействие в течение 2 часов для блокирования неспецифического связывания.

Готовили 3-кратные разведения полученных в примере 9-1 антител клонов 996, 1226, 1564 и МКJP2 в форме миниантитела, исходя из самой высокой концентрации 20 нМ с получением 12 точек, затем в каждую лунку переносили по 100 мкл и далее проводили обработку при комнатной температуре в течение 1 часа. После обработки промывали 4 раза PBS буфером, содержащим 0,05% твина 20, и проводили взаимодействие при комнатной температуре в течение одного часа, добавляя в каждую лунку по 100 мкл раствора конъюгированного с HRP антитела к иммуноглобулину человека, распознающего Fc миниантитела человека, разбавленного в блокирующем буфере 1:5000. После 4-кратной промывки каждый раз по 300 мкл PBS-T (с 0,05% твина 20) осуществляли проявление окраски с использованием ТМВ (тетраметилбензидина, Sigma, T0440). Ферментативную реакцию гасили раствором серной кислоты (0,5 моль/л) и поглощение регистрировали и анализировали при 450 нМ, используя микропланшетный ридер. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 1а.

Было подтверждено, что четверо из клонов в форме миниантител связывались с рекомбинантным белком IGF1R человека зависящим от концентрации образом и, в

частности, для МКJP2 была продемонстрирована наивысшая способность к связыванию и, соответственно, клоны 996 и 1564 показали аналогичную силу связывания, а клон 1226 показал немного более низкую силу связывания.

11-2. ELISA анализ межвидовой перекрестной реактивности антител к IGF1R

Межвидовую перекрестную реактивность антител 1564 к IGF1R человека, полученных согласно способу из примера 9-2, и антител к IGF1R, полученных в примере 6-3, анализировали с использованием ELISA анализа. Для этого сначала IGF1R человека, обезьяны, мыши и крысы в качестве антигенов разбавляли до концентрации 1 мкг/мл, добавляли в каждую лунку по 100 мкл и проводили взаимодействие при 4°C в течение 15 часов для нанесения покрытия на дно лунок планшета. После удаления супернатанта каждую лунку обрабатывали по 200 мкл PBS буфера, содержащего 3% BSA, для блокирования неспецифического связывания. Антитела к IGF1R разбавляли в 5 раз в PBSB (3% BSA в PBS) при максимальной концентрации 400 нМ, добавляли в каждую лунку и проводили взаимодействие при 37°C в течение 1 часа. Затем, после 5-кратной промывки PBS буфером каждую лунку обрабатывали, используя по 100 мкл разбавленного 1:20000 раствора конъюгированного с HRP антитела к Fab человека, распознающего Fab-часть связанного антитела, и проводили взаимодействие при 37°C в течение 1 часа. Продукт 5 раз промывали PBS буфером и проявление окраски осуществляли с использованием ТМВ (тетраметилбензидина, Sigma, T0440) согласно способу производителя. Ферментативную реакцию гасили раствором серной кислоты (0,5 моль/л) и поглощение измеряли при 450 нМ, используя микропланшетный ридер (Molecular device). Когда в ELISA анализе используют много образцов, планшеты разделяли на две части. Результаты эксперимента показаны ниже в Таблице 15.

Конкретно, результаты ELISA для биспецифических антител к IGF1R человека, результаты для IgG 1564 и биспецифических антител к IGF1R человека, результаты ELISA для биспецифических антител к IGF1R мыши и результаты ELISA для биспецифических антител к IGF1R крысы, результаты ELISA для биспецифических антител к IGF1R обезьяны суммированы ниже в Таблице 15.

Приведенные ниже результаты эксперимента демонстрируют преимущества оценки эффективности с использованием моделей животных различных видов и, таким образом, эффективность терапевтических агентов может быть оценена с использованием антитела по настоящему изобретению в моделях заболеваний различных видов.

Таблица 15

Результаты анализа связывающей способности антител к IGF1R различных видов посредством ELISA

Эксперимент	Клон антитела	Ес ₅₀ (нМ)
ELISA для IGF1R человека	ch11F11-1564	0,914
	ch11F11-48G5	1,21
	ch11F11-54H4	2,88
	ch11F11-60H6	10
	ch11F11-B11	7,13
ELISA для IGF1R человека	IgG 1564	0,0823
	ch11F11-1564	0,379
ELISA для IGF1R мыши	ch11F11	N/A*
	ch11F11-1564	3,02
	ch11F11	N/A*
	ch11F11-48G5	6,2
	ch11F11-54H4	N/A
	ch11F11-60H6	18,6
	ch11F11-B11	148
ELISA для IGF1R крысы	ch11F11	N/A*
	ch11F11-1564	1,05
	ch11F11-48G5	2,44
	ch11F11-54H4	14,2
	ch11F11-201**	N/A*
	ch11F11-1564	0,874
	ch11F11-60H6	38
	ch11F11-B11	35,1
ELISA для IGF1R обезьяны	ch11F11	N/A*
	ch11F11-1564	2,48
	ch11F11-48G5	6,69
	ch11F11-54H4	8,83
	ch11F11-201**	N/A*
	ch11F11-1564	2,21

	ch11F11-60H6	N/A
	ch11F11-B11	180

N/A*: не установлено.

**201: scFv форма биологического аналога герцептина.

11-3. Анализ аффинности связывания варианта антитела к IGF1R с измененной аффинностью (FACS)

Анализ аффинности связывания вариантов антитела к IGF1R с измененной аффинностью, полученных в примере 7, проводили с использованием ELISA в случае ECD IGF1R, а аффинность связывания в отношении MCF-7 анализировали с использованием FACS.

Что касается первичных клонов, то в Таблице 16 показаны результаты ELISA анализа в случае ECD IGF1R для биспецифической формы антител соответствующих первично отобранных клонов, а в Таблице 17 показан результат анализа аффинности связывания в отношении клеточной линии MCF-7 с использованием FACS.

Таблица 16

Результаты ELISA по связыванию биспецифических форм антител первично отобранных клонов с ECD IGF1R

Клон антитела	EC ₅₀ (нМ)
ch11F11-1564	0,442
ch11F11-A06	1,19
ch11F11-A07	1,2
ch11F11-B02	0,919
ch11F11-B09	1,08
ch11F11-1564	0,49
ch11F11-D03	0,666
ch11F11-E06	0,668
ch11F11-F06	0,467
ch11F11-H04(G)	0,67
Hu3A9-1564	0,144
Hu3A9-A02	0,13
Hu3A9-A07	0,125
Hu3A9-B10	0,156

Hu3A9-B01	0,145
Hu3A9-C04	0,107
Hu3A9-E09	0,159

Таблица 17

Результаты FACS-анализа связывания с клетками линии MCF-7

Образцы	Среднее геометрическое
Только 2-ое антитело (Ab)	2,92
Родительское 1564	4,09
F06	5,02
A07	5,06
B02	4,54
B09	4,29
D03	4,09
E06	4,24
F06	6,33
C04	3,88

В результате клон F06 был отобран как клон, имеющий самую высокую связывающую способность в отношении связывания с клетками (с созревшей аффинностью) по сравнению с родительским клоном (клоном 1564), а клон C04 был отобран как клон с самой низкой связывающей способностью (сниженной аффинностью) в отношении связывания с клетками по сравнению с родительским клоном 1564.

Что касается анализа вторичных клонов, то в Таблице 18 показаны результаты ELISA по связыванию с ECD IGF1R клонов в форме биспецифических антител, полученных способом вторичного продуцирования.

Таблица 18

Результаты ELISA для вторично отобранных клонов в случае ECD IGF1R

Клон антитела	EC ₅₀ (нМ)
Hu11F11(вер.2)-1564	0,259
ch11F11-1564 моновалентное	0,347
Hu11F11(вер.2)-C04	0,15
Hu11F11(вер.2)-F06	0,147

Hu11F11(вер.2)-1564	0,864
ch11F11-F06	0,857
Hu11F11(вер.2)-VH2	135
Hu11F11(вер.2)-VH5	0,366
Hu11F11(вер.2)-1564	0,157
Hu11F11(вер.2)-VH7	402
Hu11F11(вер.2)-VH9	6,06
Hu11F11(вер.2)-VH16	0,236
Hu11F11(вер.2)-1564	0,149
Hu11F11(вер.2)-VH32	121
Hu11F11(вер.2)-VH35	0,167
Hu11F11(вер.2)-VH27	N/A*

Отбирали клоны, подлежащие анализу с использованием FACS, которые показаны в Таблице 19, после исключения клонов, имеющих значительно более низкую продуктивность и физические свойства среди вторично полученных клонов.

Таблица 19

Клоны, подлежащие анализу с использованием FACS

Классификация аффинности связывания	Клон антитела	Объяснение
Аффинность связывания, аналогичная родительскому клону 1564	C04	FACS и анализ <i>in vivo</i>
	F06	FACS и анализ <i>in vivo</i>
	VH5	FACS и анализ <i>in vivo</i>
	VH16	FACS и анализ <i>in vivo</i>
	VH35	FACS и анализ <i>in vivo</i>
Аффинность связывания, сниженная в 50 раз	VH9	FACS и анализ <i>in vivo</i>
	C12	Нежелательные физические свойства
Аффинность связывания, сниженная в 50 раз или больше	VH2	FACS и анализ <i>in vivo</i>
	VH6	Нежелательные физические свойства
	VH7	FACS и анализ <i>in vivo</i>
	VH27	Нежелательные физические свойства
	VH32	FACS и анализ <i>in vivo</i>

На Фиг. 4с представлен результат анализа связывания клонов с клетками линии MCF-7 с использованием FACS, и все проанализированные клоны имели более низкую

аффинность связывания с MCF-7 по сравнению с родительским клоном 1564. Результаты показывают, что клоны, демонстрирующие сниженную связывающую способность в ELISA, также демонстрируют сниженную связывающую способность в анализе с использованием FACS.

Отобранными клонами антител являются F06, C04, VH2, VH5, VH7, VH9, VH16 и VH32, и аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи для этих антител показаны выше в Таблицах 4 и 5.

Среди клонов антител горячие точки дезамидирования, присутствующие в вариантах VH5, VH16 и F06, удаляли в соответствии с Таблицей 14 из примера 8-2 с получением мутантных форм, и данные варианты получали в виде биспецифических антител согласно примеру 10. VH5 и VH16 использовали для получения бивалентных биспецифических антител с hu11F11 (вер.2), а F06 использовали для получения моновалентных биспецифических антител с hu11F11 (вер.2). Используя такое полученное биспецифическое антитело, анализировали три варианта VH5, VH16 и F06 (т.е. hu11F11-F06, hu11F11-VH5, hu11F11-VH16 в качестве биспецифических антител) и дезамидированные мутантные формы (т.е. hu11F11-F06(de2)(StoP), hu11F11-VH5(de2)(StoP), hu11F11-VH16(de2)(StoP) в качестве биспецифических антител) на предмет связывания с MCF-7 в соответствии с описанным выше методом FACS анализа. Компоненты биспецифических антител описаны в Таблице 10, а замены в сайте дезамидирования в этих антителах описаны в Таблице 14 примера 8-2.

Результаты анализа с использованием FACS показаны ниже в Таблице 20. Было подтверждено, что аффинность связывания всех трех дезамидированных мутантных форм (hu11F11-F06(de2)(StoP), hu11F11-VH5(de2)(StoP), hu11F11-VH16(de2)(StoP)) не снижалась по сравнению с родительскими антителами (VH5, VH16, F06).

Таблица 20

Вариант	Дикий тип (WT)	(de2)(StoP)	
	MFI	MFI	Аффинность связывания (%) по отношению к аффинности связывания для WT
F06(de2)(StoP)	9,61	8,61	89,59
VH5(de2)(StoP)	6,44	8,03	124,69
VH16(de2)(StoP)	6,13	6,42	104,73

*MFI означает среднюю интенсивность флуоресценции.

Отрицательный контроль MFI (только в случае вторичного Ab): 2,29.

Используя полученные выше биспецифические антитела, способность трех вариантов VH5, VH16 и F06 и их дезамидированных мутантных форм связываться с белком IGF1R человека анализировали посредством ELISA в соответствии с методом из примера 15-2. Результаты показаны в приведенной далее таблице. Было подтверждено, что аффинность связывания всех трех мутантных форм не снижалась по сравнению с родительским антителом.

Таблица 21

Вариант	WT	(de2)(StoP)	
	EC ₅₀ (нМ)	EC ₅₀ (нМ)	% от WT
F06(de2)(StoP)	0,112	0,0575	195
VH5(de2)(StoP)	0,125	0,0561	222,81
VH16(de2)(StoP)	0,143	0,122	117,21

11-4. Анализ с применением ВИАcore в случае IGF1R человека

Анализировали способность антитела по настоящему изобретению связываться с IGF1R человека.

Для клона 1564 в форме IgG степень связывания с IGF1R человека определяли в анализе с применением SPR. Антитело к гистициновой метке, связанной с ECD IGF1R человека в качестве антигена, разбавляли до концентрации 20 мкг/мл в ацетатном буфере с pH 4,0 и затем иммобилизовали в референсном/аналитическом канале чипа CM4 (с карбоксиметилированным декстраном) до уровня 10000 RU как целевого RU в соответствии с методом сочетания по аминокгруппе. Во время захвата в качестве рабочего буфера использовали PBS и скорость потока поддерживали при 30 мкл/мин. В процессе стадий ассоциации/диссоциации скорость потока составляла 40 мкл/мин и в качестве рабочего буфера использовали PBS. Продолжительность стадий ассоциации/диссоциации составляла 5 минут и 20 минут, соответственно. Анализ проводили в следующем порядке: базовая линия 1, активация (1-этил-3,3-диметиламинопропилкарбодиимид (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS)), загрузка IGF1R человека, гашение (1 М раствором этаноламина), базовая линия 2, ассоциация и диссоциация. Оценку проводили с использованием бивалентной модели и анализировали, применяя аналитическое программное обеспечение Biacore T200 (версию 1.0, S/N: 04Y15X11-0149).

Результатом анализа стало подтверждение того, что K_D для антитела 1564 в форме IgG составляет $2,5305 \times 10^{-9}$ нМ, а для антитела F06 в форме IgG составляет $4,7802 \times 10^{-7}$ нМ, при этом оба они продемонстрировали высокую способность связываться с IGF1R человека. Результаты этого анализа показаны на ФИГ. 11b. В частности, если клон 1564 получали в форме IgG, то этот клон 1564 показывал константу диссоциации $2,5305 \times 10^{-9}$ нМ в отношении IGF1R человека, и в случае клона 1564 было подтверждено отсутствие какого-либо значительного изменения аффинности связывания в зависимости от форм антител.

Пример 12. Анализ способности антитела к IGF1R связываться с клеточной линией, экспрессирующей IGF1R человека, и эндотелиальными клетками головного мозга

12-1. Анализ с использованием FACS в случае MCF-7

Чтобы убедиться, связываются ли клоны 996, 1226 и 1564 антител в форме миниантител, полученные в примере 9-1, с эндогенным IGF1R на клеточной поверхности, проводили анализ аффинности связывания для клеточных линий, экспрессирующих IGF1R человека, и эндотелиальных клеток головного мозга с использованием FACS. Степень связывания с MCF-7, известной как клеточная линия рака молочной железы, сверхэкспрессирующая IGF1R, тестировали с использованием FACS.

Конкретно, каждое из этих трех миниантител разбавляли до концентрации 20 мкг/мл, добавляли к клеткам линии MCF-7 в количестве $0,43 \times 10^{-6}$ из расчета на один образец и проводили взаимодействие при 4°C в течение 1 часа. После двукратной промывки PBS буфером добавляли конъюгированное с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) антитело к иммуноглобулину человека в разбавлении 1:500 и проводили взаимодействие при 4°C в течение 1 часа. После двукратной промывки PBS буфером измеряли степени связывания миниантител к IGF1R, используя прибор FACSCalibur. В качестве контроля использовали клетки MCF-7, обработанные только вторичными антителами. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 4а.

A02, A06, A07, B01, B02, B09, B10, C04, D03, E06, F06, H04 (Gly), H04 (Val), VH2, VH5, VH7, VH9, VH16, VH32 и VH35, полученные в примере 7 и примере 9-2, анализировали на предмет аффинности их связывания с MCF-7 аналогичным описанному выше образом. Клон 1564 получали способом из примера 14-2 и использовали для сравнения в качестве родительских клонов, а клетки MCF-7,

обработанные только вторичными антителами, использовали в качестве контролей. Результаты анализа показаны на Фиг. 4с.

Согласно результатам приведенного выше эксперимента, которые выражали в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI) образца, scFv в трех миниантителах, варианты биспецифических антител с измененной аффинностью и родительский клон (клон 1564) специфически связывались с эндогенным IGF1R, экспрессированным на клеточной поверхности. Этот результат показывает, что клоны, полученные в приведенных выше примерах, можно использовать по целевому назначению для связывания с IGF1R в форме, в которой он фактически присутствует в организме.

12-2. Анализ с использованием FACS в случае JIMT-1 и BT474

Подготовку клонов 996, 1226 и 1564 антител в форме миниантител проводили по существу аналогично примеру 12-1 за исключением того, что вместо клеточной линии MCF-7, использованной в примере 14-1, применяли линии клеток рака молочной железы JIMT-1 и BT474. Результаты морфологического исследования подтверждали связывание с эндогенным IGF1R на клеточной поверхности. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 4а.

Согласно результатам приведенного выше эксперимента, которые выражали в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI) соответствующего образца, было подтверждено, что scFv в трех протестированных миниантителах специфически связывались с эндогенным IGF1R на поверхности клеток различных клеточных линий, экспрессирующих IGF1R.

12-3. Анализ с использованием FACS эндотелиальных клеток головного мозга мыши

Исследовали, связывается ли клон 1564 в форме биспецифического антитела, полученный способом из примера 9-2, и клон 1564 в форме IgG, полученный способом из примера 14-3, с эндотелиальными клетками головного мозга линии bEND.3. С этой целью группу, обработанную только вторичным антителом, и группу, обработанную только терапевтическим антителом в форме IgG (ch11F11), использовали в качестве отрицательных контролей. Анализ с использованием FACS проводили аналогично примерам 12-1 и 12-2. Результаты анализа показаны на Фиг. 4б.

Все протестированные клоны продемонстрировали связывание с bEND.3, за исключением отрицательных контролей. Эти результаты подтверждали, что различные

формы клона 1564 специфически связывались с IGF1R, экспрессированным на поверхности эндотелиальных клеток головного мозга.

Пример 13. Анализ внутриклеточной интернализации антитела к IGF1R

13-1. Анализ интернализации в MCF-7 миниантител 1564, 996, 1226, МКJP2

Эксперимент для данного примера проводили, чтобы протестировать, происходила ли внутриклеточная интернализация клонов 996, 1226, 1564 и МКJP2 в форме миниантител, полученных в примере 9-1, в линии клеток, экспрессирующих IGF1R, и проходило ли введенное в клетку антитело по пути RMT без деградации. Чтобы использовать антитело к IGF1R в качестве челнока для улучшения ГЭБ-проникающей способности, антитело должно быть интернализировано эндотелиальными клетками головного мозга, составляющими ГЭБ.

Внутриклеточную интернализацию антител по настоящему изобретению тестировали, используя линию клеток MCF-7, экспрессирующих IGF1R. Конкретно, после посева 30000 клеток линии MCF-7 в 8-луночную слайд-камеру клетки культивировали в течение 1 суток. Культивируемые клеточные линии обрабатывали в каждой лунке при 4°C в течение 2 часов, используя клоны 996, 1226, 1564 и МКJP2 антител в форме миниантител в концентрации 5 мкг/мл, полученные в примере 9-1, промывали три раза холодной средой DMEM (модифицированной Дульбекко средой Игла) и кроме этого обрабатывали конъюгированным с Alexa488 антителом к Fc иммуноглобулина человека при 4°C в течение 1 часа.

Для тестирования интернализации комплекса с антителом планшет переносили в CO₂-инкубатор и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Культуру фиксировали, добавляя 100%-ный метанол, и одновременно с этим останавливали взаимодействие. После фиксации 3 раза промывали PBS. С использованием флуоресцентного микроскопа за степенью интернализации антитела наблюдали, применяя зеленый фильтр (Alexa488). Для подтверждения места расположения каждой клетки при использовании данного способа визуализации ядра внутри клеток окрашивали с использованием 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI). Результаты эксперимента показаны на Фиг. 5а.

Результаты эксперимента показали, что все четыре протестированных антитела в эксперименте с использованием клеточной линии MCF-7 хорошо подвергались интернализации. В частности, было обнаружено, что интернализация МКJP2 и 1564 происходила в большей степени, чем в случае других клонов.

13-2. Анализ интернализации в MCF-7 в случае C04, F06, VH5, VH16, VH35, VH9, VH2, VH7, VH32

Тестировали варианты клона 1564, характеризующиеся изменением в способности связываться с IGF1R, или тестировали связывание с IGF1R на клеточной поверхности клеток линии MCF-7, экспрессирующих IGF1R, с использованием FACS. 2×10^5 клеток MCF-7 обрабатывали биспецифическим антителом, приготовленным с использованием антитела к IGF1R в форме scFv, в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 минут. После промывки PBS буфером, содержащим 1% BSA, проводили обработку в течение 1 часа вторичным антителом, конъюгированным с FITC, для детектирования антител человека. После промывки PBS буфером анализ с применением FACS подтвердил наличие внеклеточного связывания и интернализации различных вариантов с измененной аффинностью связывания.

По результатам, показанным в Таблице 22, было обнаружено, что биспецифическое антитело, включающее в себя антитело 1564 к IGF1R, характеризуется повышенной интернализацией и повышенной интенсивностью флуоресценции при 37°C по сравнению с результатами, полученными в условиях с охлаждением. Эти результаты подтверждают, что варианты клона 1564 хорошо связываются с клетками и подвергаются интернализации, попадая внутрь клеток зависимым от связывания образом.

Таблица 22

Образец	Среднее геометрическое
	Интернализация при 37°C
Без обработки	1,88
Только 2-ое Ab	2,86
hu3A9 WT	3,4
hu3A9x1564 WT	7,72
hu11F11 WT	3,18
hu11F11x1564 WT	7,34
hu3A9x1564_C04	7,23
hu3A9x1564_F06	19,8
hu11F11x1564_VH5	6,1
hu11F11x1564_VH16	5,83

hu11F11x1564_VH35	7,28
hu11F11x1564_VH9	5,01
hu11F11x1564_VH2	3,19
hu11F11x1564_VH7	3,84
hu11F11x1564_VH32	3,24

13-3. Анализ интернализации в эндотелиальных клетках головного мозга человека

Тестировали, осуществляется ли интернализация бивалентной формы и моновалентной формы клона 1564, полученных в примерах 9-2 и 9-4, в первичных клетках эндотелия микрососудов головного мозга человека (НМБЕС). Терапевтическое антитело в форме IgG (11F11) использовали в качестве отрицательного контроля.

Клетки НМБЕС (Cell Systems, № по каталогу: ACBRI376) помещали в 12-луночный планшет при конfluence 90% и затем добавляли тестируемое антитело. После фиксации 4%-ным раствором параформальдегида и проводимого на следующий день промывания PBS осуществляли блокирование и пермеабиллизацию с использованием раствора, содержащего 3% BSA и тритон X, в течение 50 минут. После промывания PBS проводили инкубирование с антителом к Fc иммуноглобулина человека (антителом козы к Fc иммуноглобулина человека) в течение 2 часов и 30 минут, промывали PBS и обрабатывали вторичным антителом к соответствующему первичному антителу в течение 1 часа. После промывания PBS клетки окрашивали в течение 10 минут красителем Hoechst в разведении 1:1000 для окрашивания ядер. Результаты анализировали с применением конфокального микроскопа LSM 780 NLO с объективом EC Plan-Neofluar 100X/1.3 Oil. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 5b.

Бивалентная форма и моновалентная форма клона 1564 демонстрировали повышенную интернализацию по сравнению с терапевтическим антителом (11F11), использованным в качестве отрицательного контроля. Этот результат показывает, что описанное выше антитело к IGF1R может подвергаться эффективной интернализации эндотелиальными клетками головного мозга, составляющими ГЭБ, в виде различных форм биспецифических антител, содержащих связанные с ним терапевтическое антитело, повышая тем самым способность терапевтического антитела проникать через ГЭБ.

13-4. Анализ клеточного метаболического пути в эндотелиальных клетках головного мозга человека

Если антитело интернализировано и находится в клетке там же, где находится лизосомальный маркер, то данное антитело не может пройти через ГЭБ по причине деградации в эндотелиальных клетках головного мозга. В противоположность этому, если антитело находится там же, где и ранняя эндосома, ассоциированная с экзоцитозом, или маркер, который, как известно, связан с переносом через ГЭБ, то ожидается, что данное антитело пересечет ГЭБ посредством рецептор-опосредованного трансцитоза, то есть будет интернализировано с попаданием в эндотелиальные клетки головного мозга и затем поступит в головной мозг.

После обработки клеток НМВЕС аналогичным образом с использованием бивалентной формы 1564 среди прочих антител, протестированных в примере 13-2, проводили анализ того, какой клеточный компонент в этих клетках находится вместе с этими антителами. Между тем, каждое из приведенных далее антител обрабатывали одновременно козыми антителами к иммуноглобулину человека для детектирования обработанных антител после блокирования и пермеабилзации.

- антитело к катепсину D: лизосомальному маркеру;
- антитело к кавеолину-1: кавеолин-опосредуемому маркеру трансцитоза (который считается основным механизмом прохождения через ГЭБ),
- антитело к антигену ранних эндосом 1 (EEA1): маркеру ранних эндосом.

Остальные стадии способов были аналогичны примеру 13-2, а вторичные антитела к данным маркерам обрабатывали соответственно.

Анализ результатов показан на Фиг. 5с. Клон 1564 в форме биспецифического антитела не был расположен вместе с катепсином D, но был расположен с кавеолином-1 и EEA1 с внутренней стороны клеточной мембраны и внутри клеток. Эти результаты указывают на то, что после интернализации клона 1564 стало возможным пересечение ГЭБ по RMT-пути без подвергания механизму внутриклеточной деградации.

Пример 14. Анализ влияния антитела к IGF1R на передачу сигнала с участием IGF1R

14-1. Анализ пролиферации клеток линии MCF-7 с использованием IGF1R

Влияет ли антитело к IGF1R по настоящему изобретению на связывание IGF1R (рецептора IGF1) с его лигандом, уточняли, используя анализ эффективности пролиферации клеток с участием IGF1.

Клоны 996, 1226, 1564 и МКJP2 антител в форме миниантител, полученных в примере 9-1, разбавляли в 5 раз, начиная с концентрации 400 нМ, соответственно получая разбавленные образцы, и затем по 25 мкл растворов разбавленных образцов соответствующим образом обрабатывали 25 мкл IGF1 в концентрации 20 нг/мл. Клетки линии MCF-7, экспрессирующие IGF1R, культивировали и пересевали, удаляя среду в день эксперимента, и по 20000 клеток добавляли в каждую лунку (что соответствовало 50 мкл) 96-луночного планшета, в котором размещались IGF1 и тестируемое антитело.

После инкубирования при соответствующей температуре и влажности в течение 3 суток добавляли 10 мкл реагента из набора для подсчета количества клеток (ССК-8), чтобы измерить степень роста клеток, и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 4-5 часов. Затем отбирали пробы и измеряли поглощение при длине волны 450 нМ, используя спектрофотометр. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 6а.

В соответствии с результатами этого эксперимента было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению не ингибирует пролиферацию клеток MCF-7, обусловленную передачей сигнала от IGF1 к IGF1R. Антитело к IGF1R (ImClone), взятое в качестве контроля, ингибировало пролиферацию клеток MCF-7, обусловленную передачей сигнала от IGF1 к IGF1R зависимым от концентрации, используемой при обработке, образом. Следовательно, антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело, обладающее способностью связываться с IGF1R, экспрессированным на эндотелиальных клетках, составляющих ГЭБ, и проходить через ГЭБ, но не ингибировать передачу сигнала с участием IGF1 в клетки организма. Таким образом, было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению можно использовать в качестве челнока для прохождения через ГЭБ.

14-2. Анализ ингибирования компонента IGF1R-опосредованной передачи сигнала в клеточной линии MCF-7

В условиях, когда в результате связывания IGF1 с клетками, экспрессирующими IGF1R, происходила передача сигнала в клетки, антитело к IGF1R по настоящему изобретению тестировали, чтобы определить, вовлечен ли IGF1 в передачу сигнала через рецептор и компонент нисходящего сигнального пути. То есть, антитело к IGF1R использовали для обработки клеточных линий MCF-7, экспрессирующих IGF1R, и затем анализировали общее содержание IGF1R, содержание фосфорилированного IGF1R, общее содержание Akt (протеинкиназы B), как факторов, участвующих в последующей передаче сигнала от IGF1R, и содержание фосфорилированной Akt в клетках.

После культивирования клеток MCF-7 культуральную среду заменяли на не содержащую сыворотки культуральную среду за 20 часов до обработки антителом к IGF1R. Клоны 996, 1226, 1564 и МКJP2 антител в форме миниантител, полученных в примере 4-1, добавляли в концентрации 100 нМ в клеточные линии MCF-7, соответственно, и через 1 час обрабатывали IGF1 (200 нг/мл). Через 20 минут клетки промывали PBS и затем лизировали, используя M-PER (реагент для экстракции белков млекопитающих), дополненный смесью ингибиторов протеаз и фосфатаз. После измерения концентрации белка с использованием набора для анализа с бicineхониновой кислотой (BCA) 12,5 мкг белка загружали на полиакриламидный гель для проведения электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и затем переносили на мембрану из поливинилиденфторида (PVDF). Блокирование осуществляли при комнатной температуре с осторожным встряхиванием в течение 1 часа, используя PBST (с 0,1% твина 20), содержащий 5% BSA, и затем добавляли первичное антитело к IGF1R или к Akt при медленном встряхивании и 4°C в течение ночи. Для контроля нанесения использовали антитело к бета-актину. После промывки добавляли вторичное антитело с медленным встряхиванием при комнатной температуре в течение 1 часа и затем промывали. Добавляли раствор для усиления хемилюминесценции (ECL) и регистрировали сигналы, используя систему Image Quant Las 4000. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 6b.

В соответствии с результатами эксперимента было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению не оказывало влияния на общее содержание IGF1R, содержание фосфорилированного IGF1R, общее содержание Akt, как факторов, участвующих в последующей передаче сигнала от IGF1R, и содержание фосфорилированной Akt в клетках.

14-3. Анализ ингибирования компонента IGF1R-опосредованной передачи сигнала в эндотелиальных клетках головного мозга мыши

В условиях, когда в результате связывания IGF1 с клетками, экспрессирующими IGF1R, происходила передача сигнала в клетки, антитело к IGF1R по настоящему изобретению тестировали, чтобы определить, вовлечен ли IGF1 в передачу сигнала через рецептор и компонент нисходящего сигнального пути. То есть, 11F11-1564 и 3A9-1564, CH11F11 и ch3A9, моноспецифические антитела к альфа-синуклеину, описанные в публикации заявки на патент Кореи № 2018-0081465, полученные способом из примера 9-2, и клон 1564 в форме IgG, полученный способом из примера 9-3, добавляли к

клеточным линиям bEND3, экспрессирующим IGF1R, и затем анализировали общее содержание IGF1R, содержание фосфорилированного IGF1R, общее содержание Akt, как факторов, участвующих в последующей передаче сигнала от IGF1R, и содержание фосфорилированной Akt в клетках.

В процессе инкубации клеток bEND3 культуральную среду заменяли на не содержащую сыворотки культуральную среду за 20 часов до обработки антителом к IGF1R. Клоны биспецифических антител 1564 и МКJP2, полученные в примере 14-2, добавляли в концентрации 100 нМ в клеточную линию bEND, соответственно, и через 1 час обрабатывали IGF1 (200 нг/мл). Через 20 минут клетки промывали PBS и затем лизировали, используя M-PER, дополненный смесью ингибиторов протеаз и фосфатаз. После измерения концентрации белка с использованием набора для анализа с BCA 12,5 мкг белка загружали на гель для проведения SDS-PAGE и затем переносили на мембрану из PVDF. Блокирование осуществляли при комнатной температуре с осторожным встряхиванием в течение 1 часа, используя PBST (с 0,1% твина 20), содержащий 5% BSA, и затем добавляли первичное антитело к IGF1R или к Akt при медленном встряхивании и 4°C в течение ночи. Для контроля нанесения использовали антитело к бета-актину. После промывки добавляли вторичное антитело с медленным встряхиванием при комнатной температуре в течение 1 часа и затем промывали. Добавляли раствор для ECL и регистрировали сигналы, используя систему Image Quant Las 4000. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 6с.

В соответствии с результатами эксперимента было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению не оказывало влияния на общее содержание IGF1R, содержание фосфорилированного IGF1R, общее содержание Akt, как фактора, участвующего в последующей передаче сигнала от IGF1R, и содержание фосфорилированной Akt в клетках.

Пример 15. Анализ ГЭБ-проникающей способности антитела к IGF1R *in vivo* (анализ совместной локализации)

15-1. Совместная локализация миниантител с сосудами головного мозга

Чтобы убедиться, осуществилось ли распределение антител к IGF1R по настоящему изобретению по сосудистой системе головного мозга *in vivo*, проводили следующий эксперимент.

Конкретно, PBS буфер или контрольный IgG (10 мг/кг) и клоны 996, 1226 и 1564 антител в форме миниантител, полученных в примере 14-1, вводили в хвостовую вену

самцам мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель, соответственно. Через 4 часа осуществляли перфузию головного мозга мышей, делая инъекцию в полость сердца, достаточным количеством 0,9%-ного раствора NaCl и 4%-ного раствора параформальдегида. Фиксированный головной мозг извлекали, готовили срезы толщиной 20 мкм и проводили совместное окрашивание, используя антитела к CD31 мыши в качестве маркера сосудов и антитела к Fc иммуноглобулина человека, чтобы подтвердить совместную локализацию сосудов головного мозга и тестируемого антитела к IGF1R. Для визуализации с использованием флуоресцентного микроскопа в случае CD31 применяли вторичное антитело, конъюгированное с Alexa 488, а в случае Fc иммуноглобулина человека применяли вторичное антитело, конъюгированное с Alexa 594. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 7а.

В соответствии с результатами этого эксперимента было подтверждено, что антитела по настоящему изобретению, не блокирующие связывание с лигандом, обладают превосходной ГЭБ-проникающей способностью. Результат окрашивания тканей головного мозга маркерами сосудов (антителами к CD31, зеленый цвет) и человеческих антител (антителами к Fc иммуноглобулина человека, красный цвет) в соответствии со способом анализа степени совместной локализации антител с кровеносными сосудами сердца с использованием иммуноокрашивания (Neuron (2016), Yu-Zuchego и др.) показал, что антитела по настоящему изобретению, не блокирующие связывание с лигандом, демонстрировали более высокую степень совместной локализации, чем IgG в контрольной группе.

15-2. Анализ ГЭБ-проникающей способности биспецифического антитела *in vivo*

Предпринимали попытку подтверждения ГЭБ-проникающей способности *in vivo* антитела к IGF1R по настоящему изобретению на обычных крысах. PBS буфер или контрольный IgG (10 мг/кг) и терапевтическое антитело для лечения болезни Паркинсона (11F11) или бивалентное биспецифическое антитело (11F11-1564), содержащее клон 1564, соединенный с терапевтическим антителом, вводили в хвостовую вену крыс SD (Sprague-Dawley, Спрег-Доули), соответственно. Через 24 часа содержание антител в CSF (спинномозговая жидкость) и головном мозге анализировали с применением масс-спектрометрии. Масс-спектрометрию проводили тем же методом, что и в примере 20-1.

Биспецифическое антитело, в состав которого входил клон 1564, показало более высокую способность проникать в CSF и головной мозг, чем терапевтическое антитело,

с которым не было соединено антитело к IGF1R, и эффективность была подтверждена для обеих доз 10 и 30 мг/кг. В дозе 30 мг/кг биспецифическое антитело демонстрировало примерно в 4,5 раза более высокую способность проникать в головной мозг, чем моноспецифическое антитело.

Клон 1564 получали в бивалентной форме и моновалентной форме в соответствии с примерами 9-2 и 9-4 и затем вводили в дозах 30 мг/кг или 60 мг/кг аналогично тому, как описано выше, и содержание антител в CSF и головном мозге анализировали через 24 часа. Биспецифические антитела этих двух типов, связанные с клоном 1564, показали более высокую способность проникать в CSF и головной мозг, чем моноспецифические антитела. В частности, бивалентная форма демонстрировала более высокую способность проникать через ГЭБ, чем моновалентная форма, при этом способность проникновения в головной мозг возрастала до 5 раз включительно.

Результаты, приведенные на ФИГ. 7b и ФИГ. 7c, показывают, что клон 1564 улучшает ГЭБ-проникающую способность терапевтического антитела в организме, даже когда оно связано с терапевтическим антителом в различных формах.

Ожидалось, что варианты клона 1564 с измененной аффинностью, полученные в соответствии с примером 2, будут обладать улучшенными фармакокинетическими (ФК) показателями в сыворотке крови по сравнению с родительским клоном. Поэтому ожидалось, что ГЭБ-проникающая способность будет улучшена посредством пребывания в сыворотке крови в течение длительного периода времени и непрерывного поддержания притока через ГЭБ. После внутривенного введения крысам SD вариантов с измененной аффинностью, полученных в бивалентной форме в соответствии с примером 9-2 или в моновалентной форме в соответствии с примером 9-4, в дозе 30 мг/кг проводили отбор крови из глазной вены с использованием шприца в моменты времени 0, 24 и 48 часов. Тестируемые антитела распределяли на два эксперимента в соответствии с остовом терапевтического антитела. Биспецифические антитела на основе соответствующих вариантов, использованные в данном эксперименте, показаны в приведенной далее таблице.

Таблица 23

Биспецифические антитела, использованные для анализа проницаемости ГЭБ *in vivo*

Клоны с химерным остовом	Клоны с гуманизированным остовом
Бивалентное ch11F11-1564	Бивалентное hu11F11(вер. 2)-1564

Моновалентное ch11F11-1564	Бивалентное hu11F11(вер.2)-VH5
Моновалентное ch11F11-C04	Бивалентное hu11F11(вер. 2)-VH16
Бивалентное ch11F11-F06	Бивалентное hu11F11(вер. 2)-VH35
Моновалентное ch11F11-F06	Бивалентное hu11F11(вер. 2)-VH9
**	Бивалентное hu11F11(вер. 2)-VH2
**	Бивалентное hu11F11(вер. 2)-VH7
**	Бивалентное hu11F11(вер. 2)-VH32

Уровни антител в крови анализировали с использованием ELISA. После покрытия поверхности лунок 96-луночного планшета антителами козы к Fc иммуноглобулина человека содержимое лунок обрабатывали соответствующим количеством разбавленного образца и затем осуществляли детектирование, применяя антитело к Fab иммуноглобулина человека, конъюгированное с HRP. Результаты анализа показаны на Фиг. 7d и Фиг. 7e.

В результате, в первой тестируемой группе моновалентная форма 1564, моновалентная форма F06 и моновалентная форма C04 продемонстрировали ФК параметры, соответствующие более длительному пребыванию в сыворотке крови, чем бивалентное антитело родительского клона 1564. Во второй тестируемой группе бивалентные формы VH2, VH5, VH7, VH9, VH16 и VH32, за исключением VH35, продемонстрировали ФК параметры, соответствующие увеличенной продолжительности пребывания в сыворотке крови по сравнению с родительским бивалентным 1564.

Чтобы проанализировать ГЭБ-проникающую способность для этих групп, через 48 часов из крыс извлекали CSF и анализировали тем же методом ELISA. Результаты анализа показаны на Фиг. 7f.

В первой тестируемой группе моновалентные формы 1564, моновалентные формы F06 и моновалентные формы C04, демонстрирующие ФК параметры, соответствующие увеличенной продолжительности пребывания в сыворотке крови, демонстрировали более высокий уровень антител в CSF по сравнению с родительским бивалентным 1564. Во второй тестируемой группе бивалентные формы VH2, VH5, VH7, VH9, VH16 и VH32, которые также демонстрировали ФК параметры, соответствующие увеличенной продолжительности пребывания в сыворотке крови, демонстрировали более высокий уровень антител в CSF по сравнению с родительским бивалентным 1564. Антитело VH35 демонстрировало ФК параметры, соответствующие более короткому

пребыванию в сыворотке крови и низкий уровень антител в CSF по сравнению с родительским бивалентным 1564.

Результаты, приведенные на Фиг. 7d, Фиг. 7e и Фиг. 7f, показали, что ФК параметр, соответствующий пребыванию в сыворотке крови, являлся важным фактором, связанным с ГЭБ-проникающей способностью антител, ввиду непрерывного притока антител к ГЭБ, и что ГЭБ-проникающая способность биспецифических антител как челнока для пересечения ГЭБ и ФК параметр, соответствующий продолжительности пребывания в сыворотке крови, возрастали. В частности, в случае моновалентной формы F06 с самым высоким уровнем антител в CSF была продемонстрирована примерно в 5 раз более высокая CSF-проникающая способность, чем для родительского бивалентного 1564. В примерах 18-2 и 18-3, поскольку в CSF бивалентное антитело 1564 демонстрировало примерно в 3 раза более высокую CSF-проникающую способность, чем моноспецифическое антитело, ожидалось, что моновалентная форма F06 будет демонстрировать примерно в 15 раз более высокую ГЭБ-проникающую способность, чем моноспецифическое антитело.

Пример 16. Эпитопное картирование антител к IGF1R

16-1. ELISA анализ антитела к IGF1R, подвергнутого кипячению белка IGF1R и нативного белка IGF1R

В этом примере предпринимали попытку уточнения, будет ли антитело к IGF1R распознавать линейный эпитоп или конформационный эпитоп. ELISA проводили с бивалентными биспецифическими антителами 1564, 48G5, 54H4, 60H6 и B11 и с использованием ECD нативного белка IGF1R человека или подвергнутого нагреванию белка (подвергнутого кипячению IGF1R). Метод ELISA проводили аналогично тому, как в примере 11. Результаты анализа показаны в приведенной далее таблице.

Таблица 24

ID клона	EC ₅₀ (нМ) для нативного IGF1R	EC ₅₀ (нМ) для подвергнутого кипячению IGF1R
ch11F11-1564	0,914	N/A*
ch11F11-48G5	1,21	N/A
ch11F11-54H4	2,88	N/A
ch11F11-60H6	10	N/A
ch11F11-B11	7,13	410

*N/A: не установлено.

Клоны демонстрировали такое же связывание с ECD нативного белка IGF1R человека, как и в примере 15, но не связывались с ECD подвергнутого кипячению белка IGF1R человека, третичная структура которого была разрушена нагреванием. Это означает, что антитело к IGF1R по настоящему изобретению связывается с конформационным эпитопом, а не с линейным эпитопом.

16-2. Эпитопное картирование антитела к IGF1R

Для анализа конформационного эпитопа в случае клона 1564 выполняли сканирование аланином, как приведено ниже. Проводили подготовку клеток OGFAR3, клеточной линии рака яичников с подтвержденным низким уровнем экспрессии IGF1R, для проведения экспрессии библиотеки IGF1R, в которой улучшенный зеленый флуоресцентный белок (eGFP) в качестве метки был слит с N-концом, а C-концевой киназный домен был удален. Библиотека IGF1R содержит мутации, в местах которых остатки на поверхности IGF1R заменены на остатки аланина. Полученную библиотеку использовали для трансфекции клеток OGFAR3. Клетки, идентифицированные как экспрессирующие IGF1R, обрабатывали антителом 1564 и затем метили флуоресцентной меткой путем обработки вторичным антителом, меченным красителем DyLight650. Меченые клетки классифицировали в соответствии с наличием или отсутствием экспрессии IGF1R, со степенью экспрессии IGF1R и наличием или отсутствием связывания с 1564, и глубокое секвенирование РНК проводили с использованием метода Illumina на секвенаторе HiSeq для анализа частоты каждой мутации с заменой на аланин в соответствующей группе клеток. Соответствующую частоту нормировали к результату для клеток, экспрессирующих IGF1R дикого типа, и затем рассчитывали относительную частоту, чтобы отобразить мутации, число которых уменьшилось в 1564-меченной группе клеток. На основании этого наблюдения было обнаружено, что эпитоп в случае клона 1564 расположен в домене FN2 (домен фибронектина 2 типа) и что принадлежащими ему остатками были остатки Y775, P776, F778, R650, S791 и L798. Эти результаты и последовательности, распознаваемые клоном 1564, показаны на ФИГ. 9. Поскольку согласно предшествующим литературным данным эти остатки, как известно, не вовлечены в связывание с IGF1, то данные результаты верно описывают свойства клона 1564 в примере 16-1.

Пример 17. Сравнение аффинностей связывания с антигеном в случае моноспецифического антитела и биспецифического антитела

17-1. Аффинности связывания с антигеном альфа-синуклеином в случае моноспецифического антитела и биспецифического антитела

Исследовали влияние на аффинность связывания антитела к альфа-синуклеину в случае, когда антитело к IGF1R в форме scFv было соединено с антителом к альфа-синуклеину IgG типа.

Агрегаты альфа-синуклеина в концентрации 1 мкг/мл использовали для покрытия поверхности лунок 96-луночного планшета в течение 18 часов и после промывки содержимое лунок обрабатывали каждым из антител в 5-кратном разведении, начиная с концентрации 400 нМ. Связавшиеся антитела обрабатывали антителом к Fc иммуноглобулина человека, конъюгированным с HRP, и затем осуществляли проявление окраски, используя раствор ТМВ, чтобы измерить степень связывания данного антитела.

Результаты, показанные на Фиг. 10а, подтверждали, что аффинность связывания с агрегатами альфа-синуклеина была одинаковой в случаях моноспецифического антитела и биспецифического антитела.

17-2. Аффинности связывания с антигеном IGF1R в случаях моноспецифического антитела и биспецифического антитела

Чтобы сравнить степени связывания одиночного антитела к альфа-синуклеину и биспецифического антитела к антигену IGF1R, проводили эксперимент аналогично тому, как в примере 22.

Результаты, показанные на ФИГ. 10b, подтверждали, что биспецифическое антитело, содержащее антитело к IGF1R в форме scFv, хорошо связывалось зависящим от концентрации образом, а моноспецифическое антитело, не имеющее участка связывания с IGF1R, не связывалось.

17-3. Анализ связывающей способности гуманизированного антитела к альфа-синуклеину

Различие в аффинности связывания между биспецифическим химерным антителом и биспецифическим гуманизированным антителом анализировали, проводя эксперимент аналогично тому, как в примере 17-1.

Как показано на ФИГ. 10c, биспецифические гуманизированные антитела обладали аффинностями связывания с агрегатами альфа-синуклеина на уровне, аналогичном таковому для биспецифического химерного антитела, и было подтверждено, что моновалентное биспецифическое антитело к IGF1R с одним scFv

также демонстрировало аффинности связывания на уровне, аналогичном химерным антителам.

В результате проведения анализа для сравнения аффинностей связывания с IGF1R между биспецифическим химерным антителом и биспецифическим гуманизированным антителом путем проведения эксперимента аналогично тому, как в примере 17-2, установлено, что все биспецифические антитела показывали одинаковую аффинность связывания, но моноспецифическое антитело, не имеющее scFv антитела к IGF1R, не демонстрировало связывания, как показано на ФИГ. 10d.

Эти результаты подтверждают, что оно обладает такой же активностью и не происходит никакого изменения в аффинности связывания с агрегатами альфа-синуклеина и IGF1R, когда его гуманизируют с целью замены участка мышиного антитела, действующего как иммуноген в организме человека.

17-4. Сравнение фагоцитоза моноспецифического антитела и биспецифического антитела

Фагоцитоз относится к процессу удаления внеклеточных веществ посредством вовлечения различных рецепторов макрофагов. Агрегаты различных белков вызывают иммунный ответ или воспалительную реакцию, которые неблагоприятно сказываются на организме человека. В частности, известно, что этому способствует взаимодействие между Fc-областью антитела и FcγR на клеточной поверхности, когда антитело вводят для удаления агрегатов альфа-синуклеина. По этой причине сравнивали связанную с фагоцитозом активность в отношении моноспецифического антитела и биспецифического антитела, подобного антителу к IGF1R, содержащему scFv.

Микроглиальные клетки BV-2, происходящие из мышей, использовали для сравнения фагоцитоза между моноспецифическим антителом и биспецифическим антителом. Клетки BV-2 культивировали в среде RPMI 1640, получали в концентрации 2×10^6 клеток/мл и распределяли по 100 мкл в 96-луночные планшеты с лунками с U-образным дном. Агрегаты альфа-синуклеина (10 мкг/мл) и антитела (25 мкг/мл), разбавленные в среде RPMI 1640, смешивали и оставляли при комнатной температуре на 20 минут. Смесью агрегатов альфа-синуклеина и антител обрабатывали клетки BV-2 и оставляли на 15 минут. Агрегаты альфа-синуклеина в супернатанте извлекали центрифугированием при 1200 об./мин и три раза промывали PBS буфером (pH 2,5) для удаления агрегатов или антител, связанных с клеточной поверхностью. Клетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида и промывали PBS буфером. Чтобы

подтвердить прохождение фагоцитоза агрегатов и антител с попаданием внутрь клеток, добавляли 0,5% тритона X-100 для ослабления клеточной мембраны, промывали PBS буфером и обрабатывали антителом к пан-альфа-синуклеину в течение 1 часа. Связанное антитело к пан-альфа-синуклеину обрабатывали конъюгированным с Alexa-488 антителом к иммуноглобулину кролика в течение 1 часа, и после этого результаты FACS анализа подтверждали поступление агрегатов в клетки макрофагов.

Результаты, показанные на ФИГ. 10е, подтверждали, что обычный IgG человека не оказывал влияния на макрофаги, и что фагоцитоз агрегатов альфа-синуклеина усиливался при обработке антителом к альфа-синуклеину. При сравнении моноспецифического антитела и биспецифического антитела было подтверждено, что их фагоцитоз происходил на схожем уровне, и что антитело к IGF1R в форме scFv, связанного с С-концом IgG, не влияло на данное действие в отношении антитела к альфа-синуклеину.

Пример 18. Оценка эффективности биспецифического антитела

В соответствии с примером 10 получали бивалентное биспецифическое антитело, содержащее химерное антитело 11F11 и scFv клона 1564, и это биспецифическое антитело и одиночное антитело к альфа-синуклеину тестировали на предмет эффективности *in vivo* на трансгенных мышях (экспрессирующих альфа-синуклеин человека под контролем промотора антигена 1 клеток тимуса мыши (mThy-1), Калифорнийский университет (UC) в Сан-Диего), характеризующихся сверхэкспрессией альфа-синуклеина человека. Моноспецифическое антитело или IgG человека (2,5 мг/кг) либо бивалентные биспецифические антитела в таком же молярном количестве вводили внутривенно один раз в неделю в течение 3 месяцев. Использовали по пять мышей на одну группу, а в качестве контроля использовали нетрансгенных животных одного помета. После этого выполняли перфузию, как приведено ниже.

После завершения заключительного введения животных подвергали анестезии хлоралгидратом в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, и затем для анализа патологии в головном мозге осуществляли перфузию 0,9%-ным физиологическим раствором. После этого одну половину (сагиттальный срез) подвергнутого перфузии головного мозга хранили в 4%-ном растворе параформальдегида (pH 7,4; 4°C) в фосфатном буфере до начала проведения анализа, а другую половину незамедлительно замораживали (-70°C).

Анализ патологии проводили так, как приведено ниже. Из половины головного мозга, фиксированного в параформальдегиде, готовили сплошные срезы толщиной 40 мкм в режиме «свободного плавания» с использованием виброметра. Чтобы подтвердить уровень экспрессии альфа-синуклеина в головном мозге в каждой подвергнутой введению группе, срезы, содержащие кору головного мозга, гиппокамп и полосатое тело, инкубировали с антителами к альфа-синуклеину (с маркером агрегатов антителом к α -syn-p129 от Abcam, ab59264, или с антителами к полноразмерному альфа-синуклеину) при 4°C в течение ночи. Альтернативно, чтобы определить степень активности астроцитов, срезы анализировали на предмет GFAP (глиофибрилярный кислый белок) (AB5804, Millipore), или, чтобы провести анализ степени нейровоспаления, срезы инкубировали с антителом к интерлейкину 1 β (IL-1 β) (ab9722, Abcam), соответственно. Альтернативно, для анализа степени гибели нервных клеток в гиппокампе проводили обработку антителом к нейрональному ядерному антигену (NeuN) (Chemicon, № MAB377). После инкубирования с первичным антителом проводили обработку конъюгированным с биотином антителом козы к IgG кролика (1:100, Vector Laboratories) и конъюгированным с пероксидазой хрена авидином D (1:200, ABC Elite, Vector Laboratories) и детектировали с использованием диаминобензидина (DAB). Каждый иммунологически окрашенный срез исследовали под светлопольным микроскопом, измеряя оптическую плотность. Результаты представлены на ФИГ. 11a-11e.

18-1. Анализ способности химерного антитела и биспецифического антитела снижать уровень альфа-синуклеина

На ФИГ. 11a показан результат окрашивания и исследования коры головного мозга и гиппокампа в ткани головного мозга мыши с использованием антитела к α -Syn-p129 после введения антител мышам, чтобы протестировать, могут ли химерное антитело 11F11 и бивалентное биспецифическое антитело, содержащее клон 1564 и химерное антитело 11F11, устранять агрегаты альфа-синуклеина в животной модели на трансгенных мышах (TG), сверхэкспрессирующих альфа-синуклеин человека. α -Syn-p129 представляет собой фосфорилированную по 129-ому остатку форму и маркер агрегатов и выявляется в виде темно-коричневых пятен или агрегатов в окрашенной ткани.

Согласно ФИГ. 11a группа, обработанная IgG, показала более высокий уровень окрашивания α -syn-p129, чем контрольная группа нетрансгенных мышей (не-tg) (#. однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), $p < 0,01$). Напротив, в группе,

обработанной моноспецифическими антителами или биспецифическими антителами, степень окрашивания α -syn-p129 или агрегатов была значительно ниже. В частности, в случае гиппокампа степень снижения в группе с обработкой биспецифическим антителом была выше таковой для химерного антитела 11F11 (*: однофакторный ANOVA, $p < 0,05$). На ФИГ. 11b показан результат эксперимента, аналогичного представленному на ФИГ. 11a, за исключением окрашивания антителом к полноразмерному альфа-синуклеину как маркером. Обнаружение альфа-синуклеина целиком указывает на то, что антитело по настоящему изобретению обладает способностью «очищать» от самого альфа-синуклеина и ингибировать его перенос между клетками. Согласно другим аспектам, это также можно интерпретировать как ингибирование образования агрегатов из мономеров или удаление всех мономеров. Более высокий уровень альфа-синуклеина человека у TG мышей снижен по сравнению с группой, получавшей IgG, в результате введения моноспецифических антител и биспецифических антител. В частности, в гиппокампе биспецифические антитела оказались более эффективны, чем моноспецифические антитела.

Эти результаты указывают на то, что химерное антитело 11F11 и биспецифическое антитело эффективно снижают уровни альфа-синуклеина и его агрегатов в животных моделях болезни Паркинсона даже в низкой дозе 2,5 мг/кг. В особенности, биспецифическое антитело превосходит моноспецифическое антитело, позволяя предположить, что биспецифическое антитело может достигать головного мозга в большей степени, чем моноспецифическое антитело, и эффективно лечить заболевание на основании улучшенной ГЭБ-проникающей способности.

18-2. Анализ способности химерного антитела и биспецифического антитела ослаблять астроглиоз и снижать уровень воспалительных цитокинов)

Глиоз представляет собой неспецифическую реакцию, которая возникает в глиальных клетках в ответ на поражение центральной нервной системы и запускается в результате повреждения ГЭБ или такими веществами, как трансформирующий фактор роста (TGF)-бета и интерлейкин. Репрезентативно, он включает астроглиоз, а белок GFAP используют в качестве маркера. Таким образом, эффект ослабления астроцитоза и высвобождения воспалительных цитокинов, запускающих астроцитоз, анализировали путем введения химерного антитела 11F11 и биспецифического антитела, содержащего клон 1564 и химерное антитело. Результаты данного анализа изложены на ФИГ. 11c и ФИГ. 11d.

На ФИГ. 11c показан результат окрашивания и исследования ткани головного мозга с использованием GFAP (астроглиоз) в качестве маркера после введения антител, чтобы протестировать, могут ли химерное антитело 11F11 и биспецифическое антитело, содержащее клон 1564 и химерное антитело, полученные в примере настоящего изобретения, ослаблять астроглиоз *in vivo*. Моноспецифическое антитело и биспецифическое антитело ингибировали астроглиоз по сравнению с IgG в контрольной группе. В частности, было подтверждено, что эффективность биспецифического антитела в полосатом теле превосходила таковую у моноспецифического антитела.

На ФИГ. 11d показан результат окрашивания и исследования ткани головного мозга с использованием антитела к IL-1бета в качестве маркера после введения антител, чтобы протестировать, могут ли химерное антитело 11F11 и биспецифическое антитело, содержащее клон 1564 и химерное антитело, полученные в примере настоящего изобретения, снижать уровни воспалительных цитокинов *in vivo*. IL-1бета вызывает воспаление, приводящее к гибели и воспалительной реакции различных нейронов. В гиппокампе крыс, которым вводили антитела по настоящему изобретению, уровень IL-1бета снижался в группах, получавших моноспецифические антитела и биспецифические антитела, по сравнению с получавшей IgG контрольной группой, и, в частности, способность к такому снижению у биспецифического антитела значительно превосходила таковую у моноспецифического антитела (#: однофакторный ANOVA, $p < 0,005$; *: однофакторный ANOVA, $p < 0,05$).

Как показано на фигурах, антитело по настоящему изобретению демонстрировало способность к ослаблению астроглиоза и снижению высвобождения воспалительного цитокина IL-1бета, который запускает астроглиоз, по сравнению с контролем.

18-3. Анализ способности химерного антитела и биспецифического антитела ослаблять нейродегенерацию

Предшествующими литературными данными было подтверждено, что гибель клеток головного мозга происходит вследствие нейротоксичности и воспалительной реакции, вызываемых альфа-синуклеином. Анализировали, могут ли моноспецифические антитела и биспецифические антитела по настоящему изобретению ингибировать *in vivo* гибель клеток головного мозга, вызываемую альфа-синуклеином.

В результате окрашивания с использованием NeuN в качестве маркера нейронов коры головного мозга и гиппокампа было обнаружено, что как моноспецифическое антитело, так и биспецифическое антитело снижали степень гибели клеток головного

мозга по сравнению с IgG в контрольной группе. В частности, в случае коры головного мозга было подтверждено, что биспецифическое антитело обладало более сильной способностью ингибировать гибель клеток головного мозга по сравнению с моноспецифическим антителом. Результаты показаны на Фиг. 11е.

Пример 19. Увеличенный период полувыведения как результат конструирования Fc и улучшенная ГЭБ-проникающая способность, обусловленная увеличенным периодом полувыведения

FcRn (неонатальный Fc-рецептор) является важным рецептором на клеточной мембране, который увеличивает период полувыведения путем захвата и циркуляции антитела в клетках, что ингибирует тем самым деградацию антитела при его циркулировании в кровеносных сосудах. ГЭБ-проникающая способность также важна для проявления трансцитозной активности антитела, но хорошо известно, что, хотя трансцитозная активность антитела важна в плане ГЭБ-проникающей способности, однако прохождение антитела через ГЭБ зависит от концентрации антител в кровеносных сосудах. В связи с этим, чтобы увеличить период полувыведения биспецифического антитела, получали биспецифические антитела с увеличенной аффинностью связывания с FcRn путем замены метионина (Met) на лейцин (Leu) в положении аминокислотного остатка 428 в Fc-области. В результате сравнения периода полувыведения при введении биспецифического антитела WT (дикого типа) и биспецифического антитела с мутацией M428L в дозе 10 мг/кг tg мышам, экспрессирующим FcRn человека, было подтверждено, что эффект увеличения периода полувыведения составлял примерно 50%, как показано на ФИГ. 11. Чтобы снова подтвердить увеличение периода полувыведения, анализировали ФК профили после введения обезьянам биспецифического антитела WT, бивалентного биспецифического антитела с M428L и моновалентного биспецифического антитела с M428L. В случае биспецифического антитела WT, как показано на ФИГ. 12а, концентрация в крови быстро уменьшалась через 168 часов, в то время как в случае биспецифических антител с M428L с высокой аффинностью связывания с FcRn поддерживалась более высокая концентрация в крови по сравнению с WT. Было подтверждено, что период полувыведения возрастал примерно на 1,5 суток в случае биспецифического антитела с M428L по сравнению с биспецифическим антителом WT. В частности, что касается клиренса, то моновалентное биспецифическое антитело с M428L характеризовалось

лучшим клиренсом, а биспецифическое антитело WT демонстрировало самый быстрый клиренс (Фиг. 12b).

Для проверки улучшения прохождения через ГЭБ, обусловленного эффектом увеличения периода полувыведения, через 24 часа после введения антител проводили выделение CSF и анализировали содержание антител в CSF. После нанесения покрытия с использованием IGF1R (100 нг/мл) в охлажденном состоянии в течение 18 часов, добавляли CSF для детектирования антител, связавшихся с IGF1R. Как можно видеть на ФИГ. 12с, было подтверждено, что содержание биспецифического антитела с M428L, прошедшего через ГЭБ, которое в большом количестве присутствовало в крови, оказалось высоким, и моновалентное биспецифическое антитело с M428L продемонстрировало улучшенную ГЭБ-проникающую способность по сравнению с бивалентным биспецифическим антителом с M428L, а также превосходную ГЭБ-проникающую способность.

Пример 20. Оценка эффективности биспецифических антител на основе дезамидированных вариантов с измененной аффинностью

Моновалентные биспецифические антитела, включающие в себя hu11F11(вер. 2) (гуманизированное антитело 11F11) и F06 scFv (вариант 1564 с измененной аффинностью), в частности биспецифические антитела, включающие в себя мутантные формы, имеющие модификации в некоторых остатках CDR с целью устранения дезамидирования (в том числе hu11F11(вер. 2)-F06(de2)(StoP) моновалентное), получали в соответствии с примером 10. Полученное биспецифическое антитело и моноспецифическое антитело к альфа-синуклеину тестировали и сравнивали на предмет эффективности *in vivo* на трансгенных мышах, сверхэкспрессирующих альфа-синуклеин человека (альфа-синуклеин человека под контролем промотора mThy-1, UC в Сан-Диего).

Конкретно, трансгенным мышам в возрасте 4 месяцев внутрибрюшинно вводили hu11F11(вер. 2) в дозе 20 мг/кг и эквивалент биспецифического антитела в том же молярном количестве (23,4 мг/кг) в моменты времени 0, 72, 144 или 192 часа в течение 8 суток. Через двадцать четыре часа после введения последней дозы животных подвергали анестезии хлоралгидратом и осуществляли перфузию сердца 0,9%-ным физиологическим раствором. Головной мозг извлекали и мгновенно замораживали при -70°C до начала проведения анализа. Ткань головного мозга измельчали и центрифугировали для удаления дебриса и получали супернатант. Его анализировали на

наличие α -syn в ELISA анализе для количественного определения содержания α -syn в лизате головного мозга (Invitrogen, № КНВ0061). Результат показан на ФИГ. 13.

Как показано на ФИГ. 13, присутствие гуманизированного антитела 11F11(вер. 2) и биспецифического антитела на основе дезамидированного варианта F06, полученных согласно одному из примеров настоящего изобретения, снижало содержание α -syn в головном мозге по сравнению со случаем IgG как контроля. В частности, биспецифическое антитело демонстрировало превосходную способность снижать содержание α -syn в головном мозге по сравнению с моноспецифическим антителом к α -syn.

Пример 21. Анализ (ELISA) аффинности специфического связывания с антигеном IGF1R в случае биспецифического антитела, включающего в себя (de2)(StoP) дезамидированное антитело к IGF1R

Эксперимент данного примера проводили, чтобы протестировать, имеет ли биспецифическое антитело, включающее в себя дезамидированное антитело к IGF1R, полученное согласно примеру 8, обычную аффинность связывания с антигеном, и чтобы одновременно проанализировать антигенсвязывающую аффинность в случае дезамидированного антитела к IGF1R в различной форме антител к IGF1R и в случае форматов биспецифического антитела, полученных разными способами. Для этого создавали моновалентное биспецифическое антитело и бивалентное биспецифическое антитело, включающие в себя каждое антитело, выбранное из недезамидированного антитела (дикого типа), (de)(StoP) дезамидированного антитела и (de2)(StoP) дезамидированного антитела, полученных на основе антител к IGF1R клонов F06, VH5 и VH16. Количественный анализ и сравнение их аффинности связывания и зависящего от концентрации связывания с рекомбинантным IGF1R проводили с использованием сэндвич-ELISA. В качестве антитела к α -syn использовали клон hu11F11 (вер.2).

Рекомбинантный IGF1R человека в качестве антигена для связывания антитела приобретали у Sino Biological в виде внеклеточного домена (ECD) (10164-H08H). С использованием 96-луночного планшета для ELISA (иммунопланшеты Nunc, NUNC, Rochester, NY) выполняли разбавление IGF1R человека до концентрации 1 мкг/мл в PBS буфере и вносили из расчета по 100 мкл на одну лунку, затем проводили взаимодействие при 4°C в течение 16 часов и после нанесения покрытия на поверхность лунок супернатант удаляли. В каждую лунку добавляли по 200 мкл PBS буфера, содержащего

1% BSA (бычьего сывороточного альбумина), и проводили взаимодействие при 37°C в течение 2 часов для блокирования неспецифического связывания.

Готовили пятикратные разведения полученных биспецифических антител и каждого из контрольных антител (антитела дикого типа и (de)(StoP) дезамидированного антитела), начиная от максимальной концентрации 400 нМ, с получением восьми (8) точек. Разбавленные растворы добавляли в каждую лунку в объеме 100 мкл и проводили взаимодействие при 37°C в течение 2 часов для связывания антител с нанесенным в качестве покрытия антигеном. По завершении реакции осуществляли 4-кратную промывку, используя по 300 мкл PBS буфера, содержащего 0,05% твина 20, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора конъюгированного с HRP антитела, распознающего Fc иммуноглобулина человека в биспецифическом антителе, разбавленного в соотношении 1:2000 в блокирующем буфере, и проводили взаимодействие в течение 1 часа при 37°C. После 4-кратной промывки с применением вновь по 300 мкл PBS-T (с 0,05% твина 20), для проявления окраски использовали ТМВ (тетраметилбензидин, Sigma, T0440). Ферментативную реакцию останавливали, добавляя раствор серной кислоты (0,5 моль/л), и поглощение регистрировали и анализировали при 450 нМ, используя микропланшетный ридер (Molecular Devices). Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 14а-14с и в Таблице 25. На Фиг. 14а представлен результат эксперимента для моновалентного антитела F06, моновалентного антитела F06(Stop) и антитела F06(de2)(Stop), на Фиг. 14b представлен результат эксперимента для антитела VH5, антитела VH5(de)(Stop) и антитела VH5(de2)(Stop), а на Фиг. 14с представлен результат эксперимента для антитела VH16, антитела VH16(de)(Stop) и антитела VH16(de2)(Stop).

Согласно Фиг. 14а, 14b и 14с, независимо от типа клона антитела к IGF1R и моновалентного/бивалентного формата, (de2)(StoP) дезамидированное антитело сохраняло способность связываться с антигеном на уровне недезамидированного антитела дикого типа и обладало превосходной антигенсвязывающей способностью по сравнению с (de)(StoP) дезамидированным антителом. В приведенной ниже Таблице 25 показаны результаты эксперимента для недезамидированного антитела (дикого типа), (de)(StoP) дезамидированного антитела и (de2)(StoP) дезамидированного антитела на основе F06, VH5 и VH16.

Таблица 25

Клоны	(de)(StoP)		(de2)(StoP)	
	EC ₅₀ (нМ)	масс. %	EC ₅₀ (нМ)	масс. %
F06 моновалент.	4,24	2,64	0,0575	195,00
VH5 бивалент.	1,19	10,50	0,0561	222,81
VH16 бивалент.	1,25	11,44	0,122	117,21

В Таблице 25 приводится сравнение численных значений, полученных на основании результатов сэндвич-ELISA для (de)(StoP) дезамидированного антитела и (de2)(StoP) дезамидированного антитела. Согласно результатам, приведенным в Таблице 25, было подтверждено, что независимо от типа клона антитела к IGF1R и моновалентного/бивалентного формата, (de2)(StoP) дезамидированное антитело обладало превосходной антигенсвязывающей способностью по сравнению с (de)(StoP) дезамидированным антителом.

Пример 22. Анализ (FACS) аффинности специфического связывания с антигеном IGF1R клеточной поверхности для биспецифического антитела, включающего в себя (de2)(StoP) дезамидированное антитело к IGF1R

Анализ аффинности специфического связывания с антигеном IGF1R клеточной поверхности проводили, применяя FACS, с использованием (de2)(StoP) дезамидированных биспецифических антител соответствующих им антител дикого типа и (de)(StoP) дезамидированных биспецифических антител в качестве контролей, использованных в примере 21. В этом анализе использовали клетки MCF-7, сверхэкспрессирующие IGF1R.

Конкретно, раствор каждого из этих биспецифических антител разбавляли до концентрации 10 мкг/мл, добавляли к клеткам линии MCF-7 при содержании $0,5 \times 10^6$ клеток линии MCF-7 и проводили взаимодействие при 4°C в течение 2 часов. После двукратной промывки PBS буфером добавляли конъюгированные с FITC антитела к иммуноглобулину человека в разбавлении 1:1000 и проводили взаимодействие при 4°C в течение 1 часа. После повторения двукратной промывки PBS буфером измеряли степень связывания антитела BsAb к IGF1R, используя прибор FACSCalibur. В качестве контроля использовали клетки MCF-7, обработанные только вторичным антителом, и результаты эксперимента показаны на ФИГ. от 15а до 15с.

Как показали результаты эксперимента, аналогичные результатам, подтвержденным в примере 21, аффинность связывания с антигеном в случае (de2)(StoP)

дезамидированного антитела оказалась эквивалентной таковой для недезамидированного антитела дикого типа и оказалась превосходящей антигенсвязывающую способность (de)(StoP) дезамидированного антитела, независимо от типа клона антител к IGF1R и моновалентного/бивалентного форматов.

Пример 23. Анализ ГЭБ-проникающей способности *in vivo* для биспецифического антитела на основе (de2)(StoP) дезамидированного антитела к IGF1R

ГЭБ-проникающую способность биспецифического антитела *in vivo*, включающего в себя дезамидированное антитело к IGF1R, согласно примеру 8, подтверждали на крысах SD (Sprague-Dawley). Экспериментальные группы и дозы суммированы в приведенной ниже таблице.

Таблица 26

ID клона	Доза
hu11F11(вер.2)	30 мг/кг
hu11F11(вер.2)-1564, моновалентное	35,46 мг/кг
hu11F11(вер.2)-F06, моновалентное (de)(StoP)	35,46 мг/кг
hu11F11(вер.2)-F06, моновалентное (de2)(StoP)	35,46 мг/кг

Как описано в Таблице 26, содержание антител в сыворотке крови и спинномозговой жидкости (CSF) через 24 часа после однократного введения моноспецифического антитела к α -syn или биспецифического антитела к α -syn/IGF1R в хвостовую вену крыс, анализировали с использованием масс-спектрометрического анализа. Конкретный вариант масс-спектрометрического метода выполняли по существу аналогично тому, как в примере 15, и результат анализа показан на ФИГ. 16.

Наблюдаемая на ФИГ. 16 концентрация в сыворотке крови, показывающая концентрацию антитела в крови через 24 часа после введения, была примерно одинаковой в случае (de)(StoP) дезамидированного антитела и (de2)(StoP) дезамидированного антитела. С другой стороны, концентрация в спинномозговой жидкости, показывающая доставку антитела в головной мозг, была самой высокой в случае (de2)(StoP) дезамидированного антитела. Это указывает на то, биспецифическое антитело по настоящему изобретению демонстрирует превосходную ГЭБ-проникающую способность, обусловленную дезамидированным антителом к IGF1R.

Чтобы исследовать эффективность биспецифического антитела по настоящему изобретению в течение более продолжительного периода времени, после однократного

введения моноспецифического антитела к альфа-синуклеину hu11F11 (вер. 2) и hu11F11(вер. 2)-F06 моновалентного (de2)(StoP), которое представляло собой биспецифическое (de2)(StoP) дезамидированное антитело, в хвостовую вену крыс, анализировали содержание антител в сыворотке крови, спинномозговой жидкости и головном мозге в течение вплоть до 168 часов после введения, применяя масс-спектрометрический анализ. Конкретную методику масс-спектрометрического анализа выполняли по существу аналогично тому, как в примере 15, и результат анализа показан на ФИГ. 17.

Согласно ФИГ. 17 наблюдаемая концентрация антител в сыворотке крови была примерно одинаковой для моноспецифического антитела к альфа-синуклеину и (de2)(StoP) дезамидированного биспецифического антитела. Однако, в случае концентрации в спинномозговой жидкости, показывающей доставку антитела в головной мозг, площадь под кривой (AUC) для (de2)(StoP) дезамидированного биспецифического антитела увеличивалась примерно в 5,8 раза, и концентрация в спинномозговой жидкости через 24 часа была примерно в 10 или более раз выше для (de2)(StoP) дезамидированного биспецифического антитела по сравнению с моноспецифическим антителом. Кроме того, концентрация в головном мозге также возрастала примерно в 7,9 раза по данным площади под кривой (AUC) для (de2)(StoP) дезамидированного биспецифического антитела по сравнению с моноспецифическим антителом. На основании этого результата было подтверждено, что биспецифическое антитело по настоящему изобретению демонстрировало превосходную ГЭБ-проникающую способность благодаря введению в его состав (de2)(StoP) дезамидированного антитела к IGR1R.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где

переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 10, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2-7 и SEQ ID NO: 11-18, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 8-9 и SEQ ID NO: 19, и

переменная область легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 21-23, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 24-28 и SEQ ID NO: 29-31.

2. Антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознает и связывается с сайтом связывания SEQ ID NO: 174, при этом сайт связывания содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Y775, P776, F778, R650, S791, L798 и E779.

3. Антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознает и связывается с сайтом связывания SEQ ID NO: 174, при этом сайт связывания содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из L641, H808, E809 и L813.

4. Антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознает и связывается с сайтом связывания SEQ ID NO: 174, при этом сайт связывания содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V397, D435, W434, Y460 и C488.

5. Антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой

цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5-7, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 8-9, и переменная область легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22 и 23, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 26-28.

6. Антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменная область легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

7. Антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменная область легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2 легкой цепи (L-CDR2),

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

8. Антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменная область легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

9. Антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 43-87, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 88-132.

10. Антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97.

11. Антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из одноцепочечного Fv (scFv), (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' и F(ab')₂.

12. Полинуклеотид, кодирующий антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1.

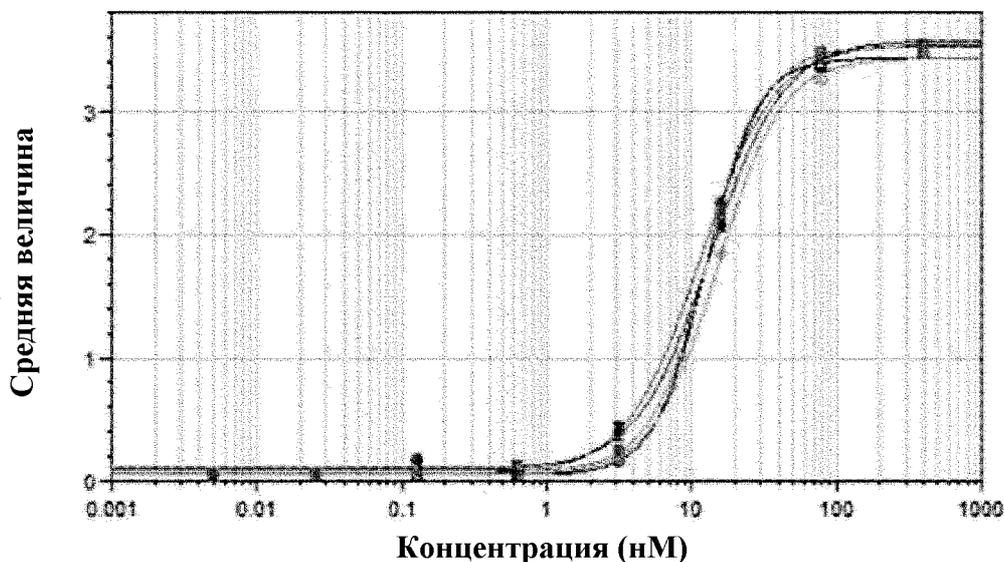
13. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 и разбавитель, носитель, солюбилизатор, эмульгатор, консервант или адъювант.

14. Способ доставки антитела индивидууму через гематоэнцефалический барьер, включающий введение индивидууму антитела к IGF1R по п. 1.

15. Способ по п. 14, где антитело вводят путем внутривенного введения.

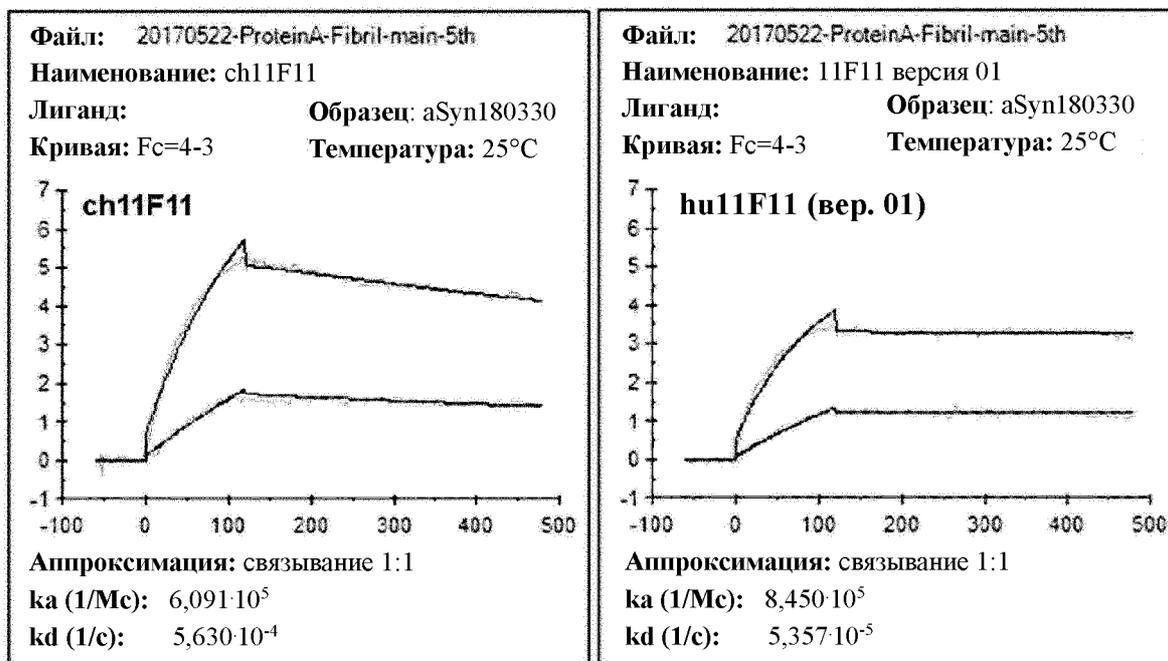
ФИГ. 1

Стандартная кривая

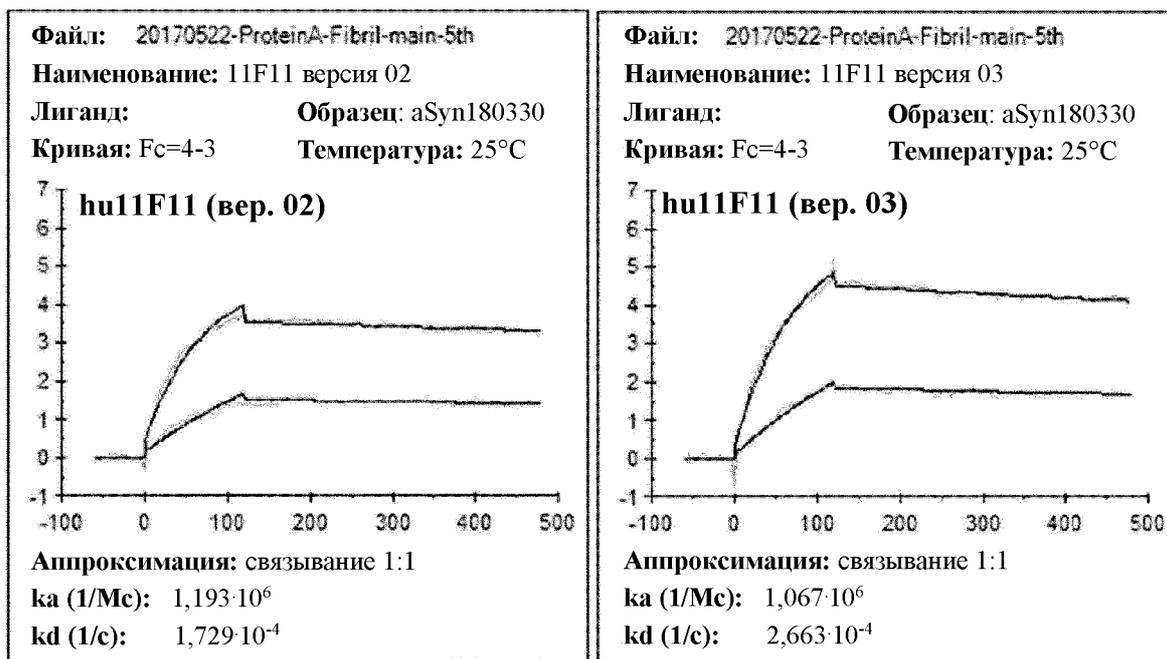


4-парам. аппрокс.: $y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$:	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
График №1 (ch11F11(-RD): средн. вел. от конц-и)	0,0493	2,44	12,5	3,43	1
График №3 (hu11F11(вер.1): средн. вел. от конц.)	0,0532	1,69	11,5	3,55	1
График №4 (hu11F11(вер.2): средн. вел. от конц.)	0,047	1,96	15,1	3,43	1
График №5 (hu11F11(вер.3): средн. вел. от конц.)	0,0958	1,71	13,4	3,58	0,999
График №6 (hu11F11(вер.4): средн. вел. от конц.)	0,0791	2,18	12,9	3,52	1

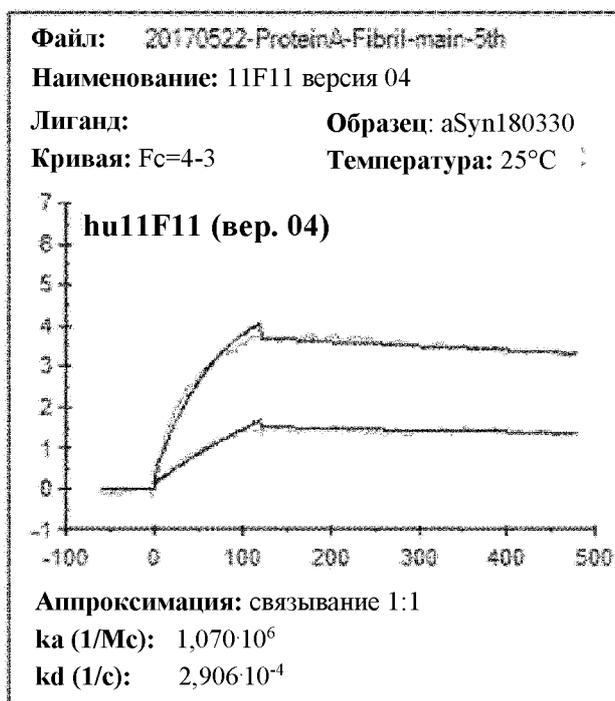
ФИГ. 2а



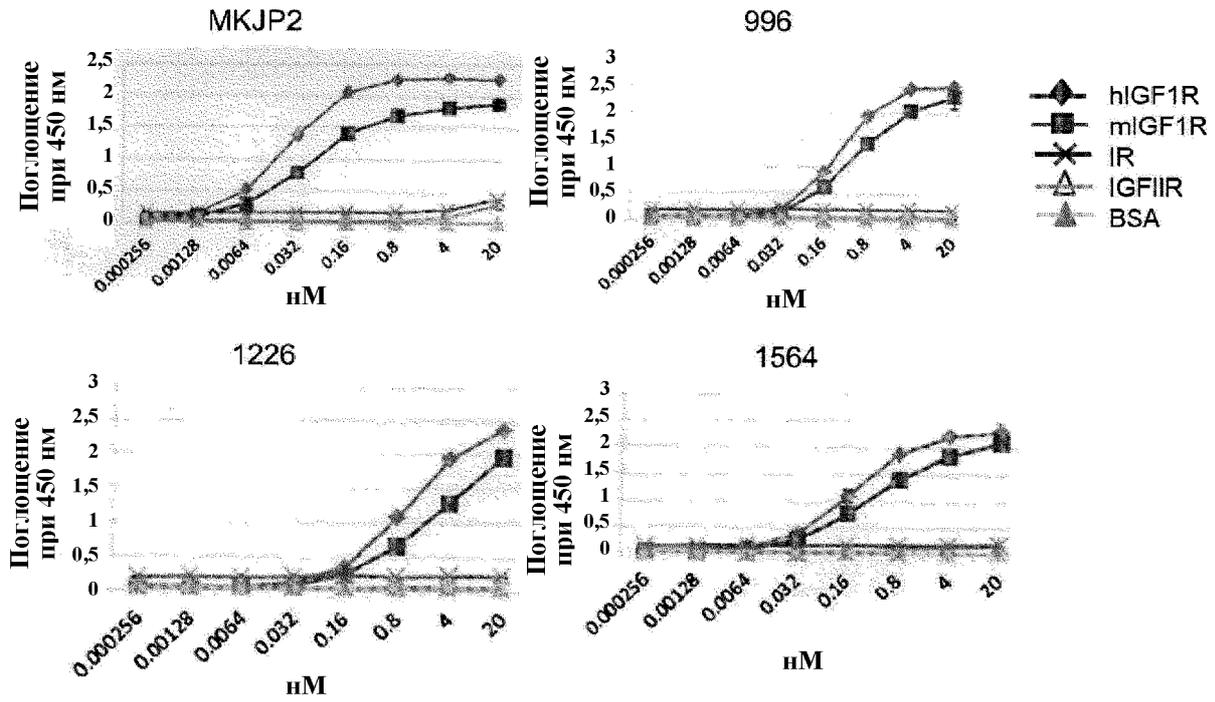
ФИГ. 2b



ФИГ. 2с

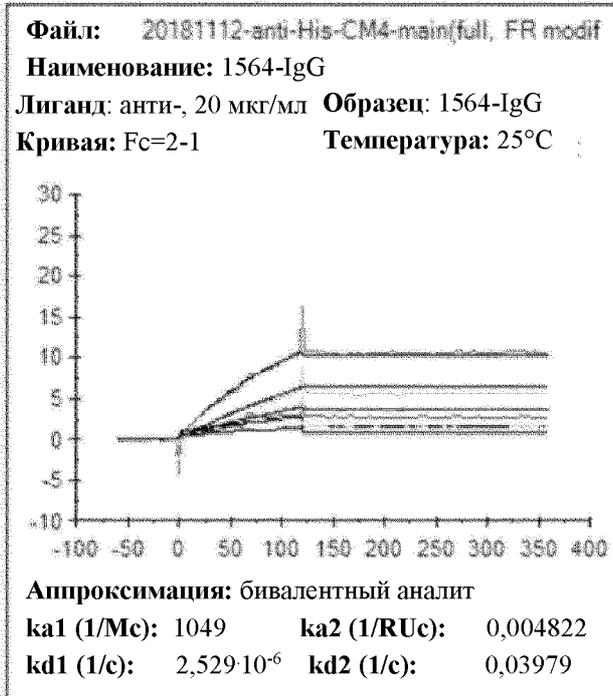
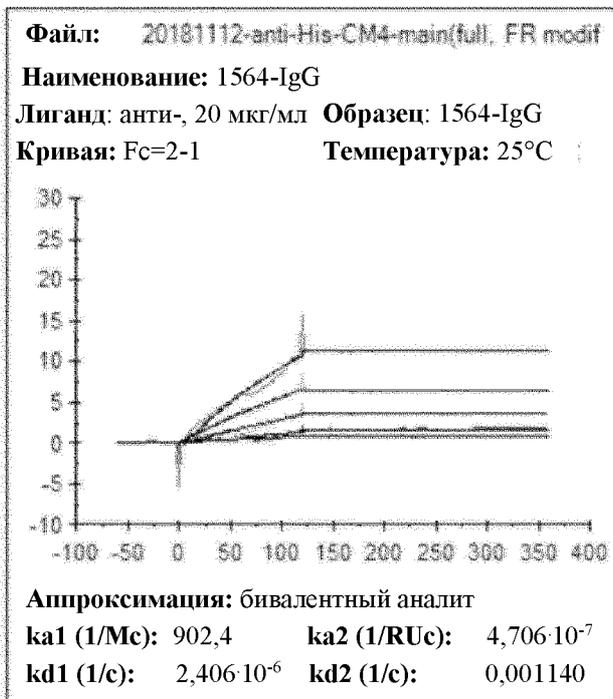


ФИГ. 3а

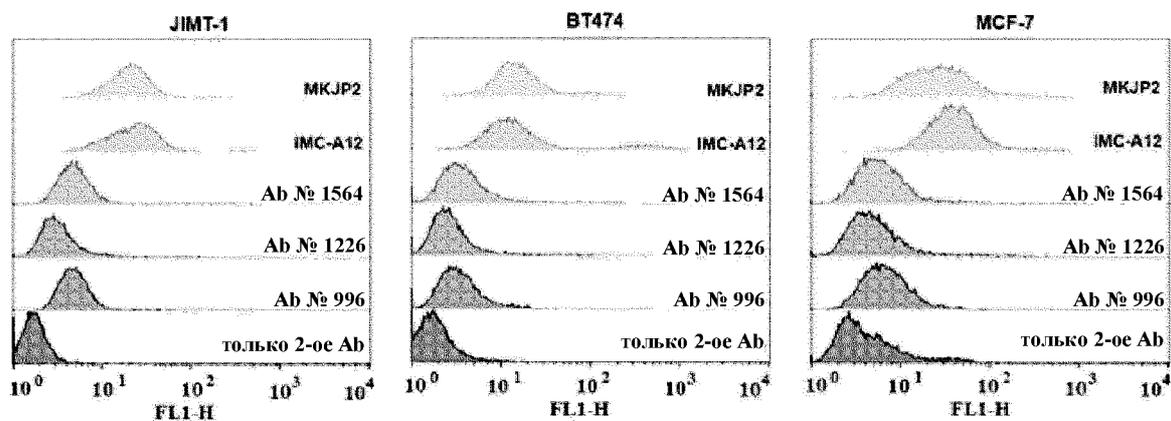


ФИГ. 3b

1564 IgG



ФИГ. 4а



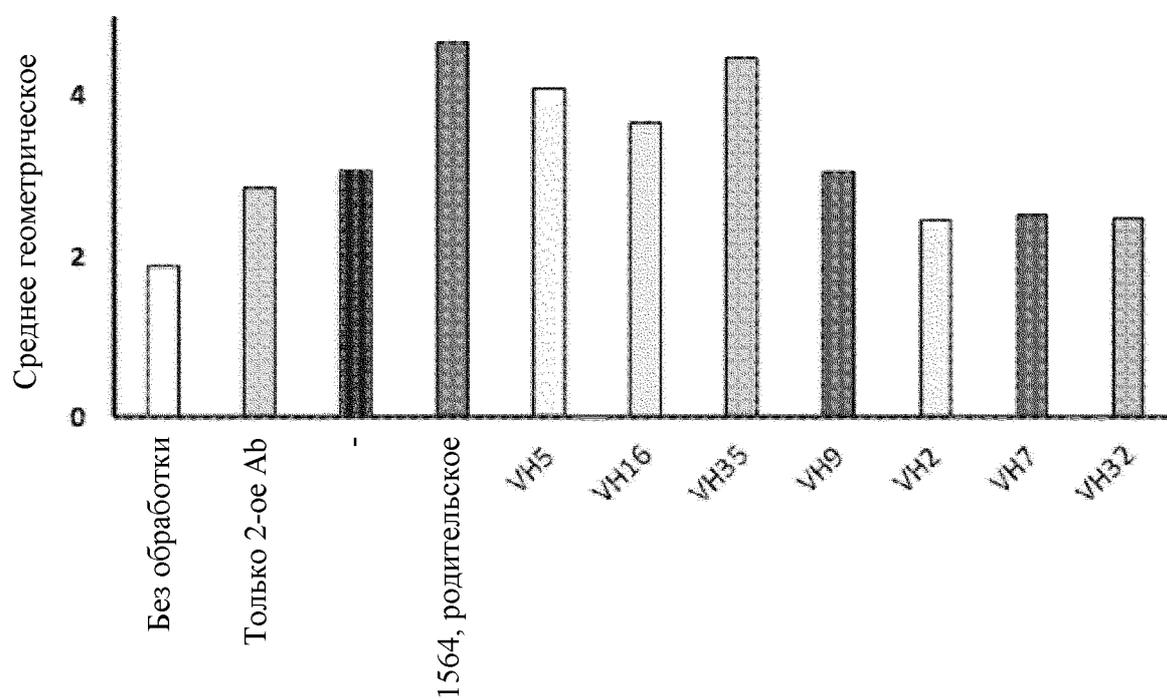
Интенсивность сигнала в канале флуоресценции 1

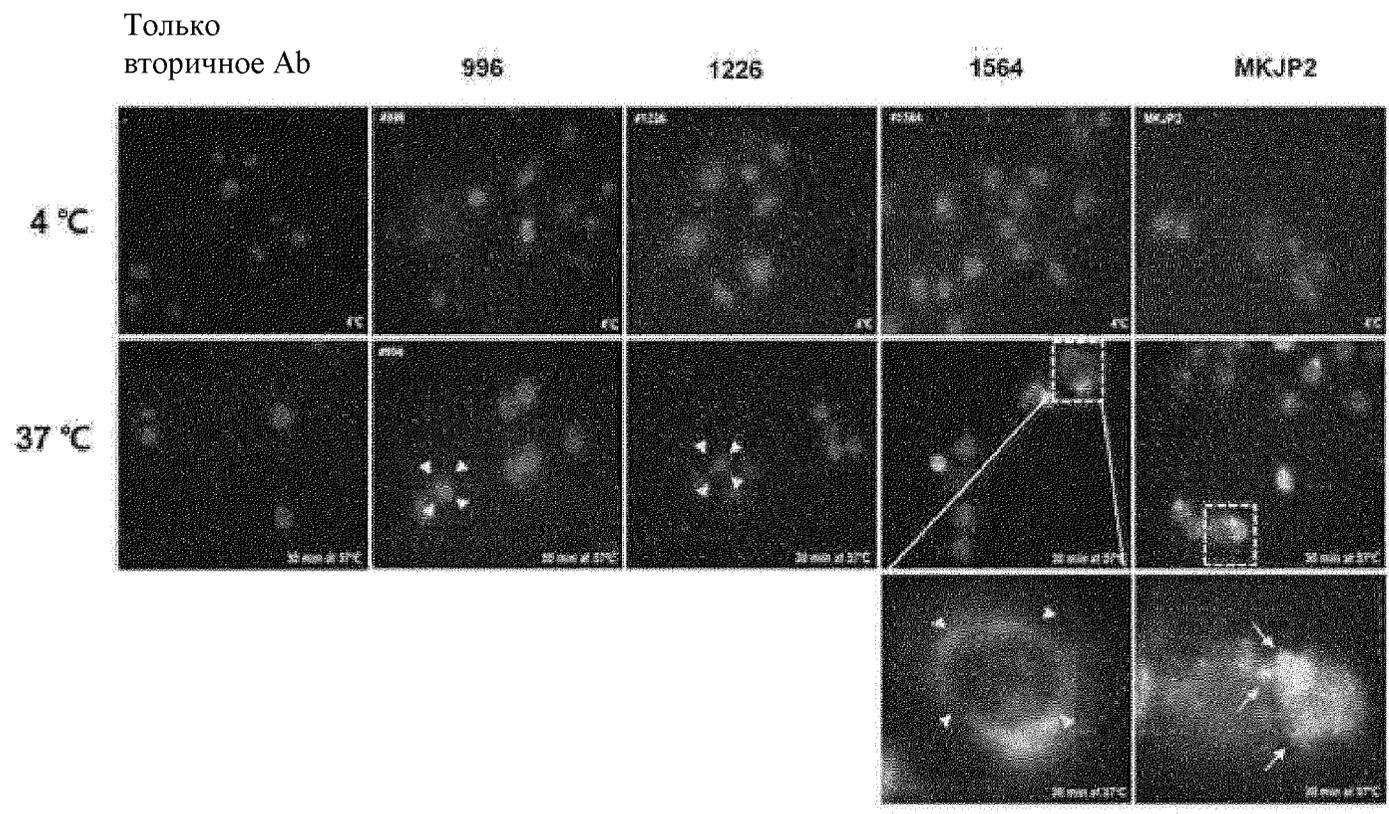
Название образца	MFI		
	JIMT-1	BT474	MCF7
Без обработки	1,36	1,8	2,51
Только 2-ое Ab	1,89	1,93	4,53
Ab № 996	5,03	3,51	7,07
Ab № 1226	3,50	3,01	5,60
Ab № 1564	5,16	3,95	6,34
IMC-A12	22,99	18,34	40,08
MKJP2	20,67	16,43	26,67

ФИГ. 4б

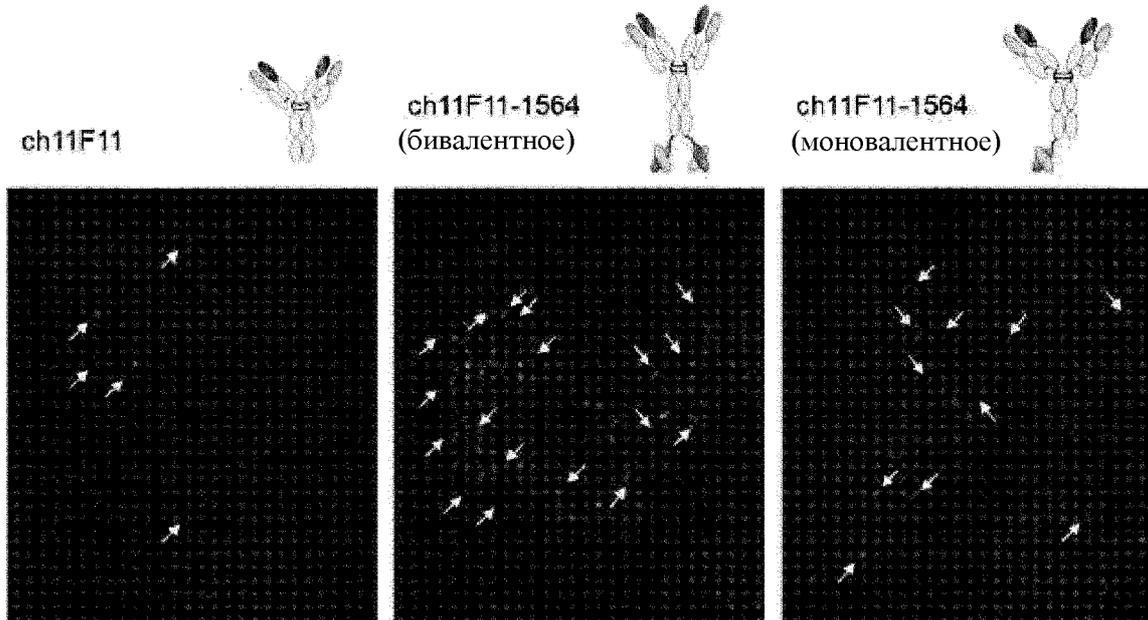
Образцы	MFI
Только вторичное Ab	3,20
ch11F11	3,26
ch11F11-1564	4,37
1564 IgG	7,55

ФИГ. 4с

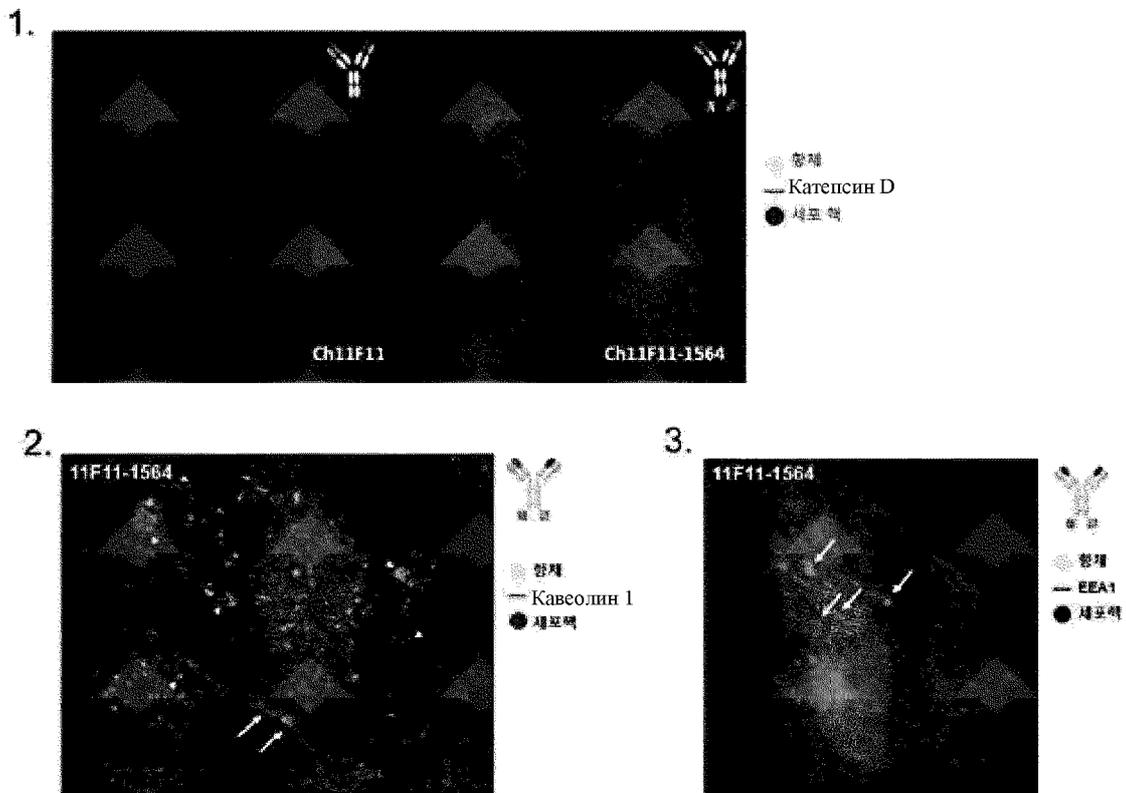




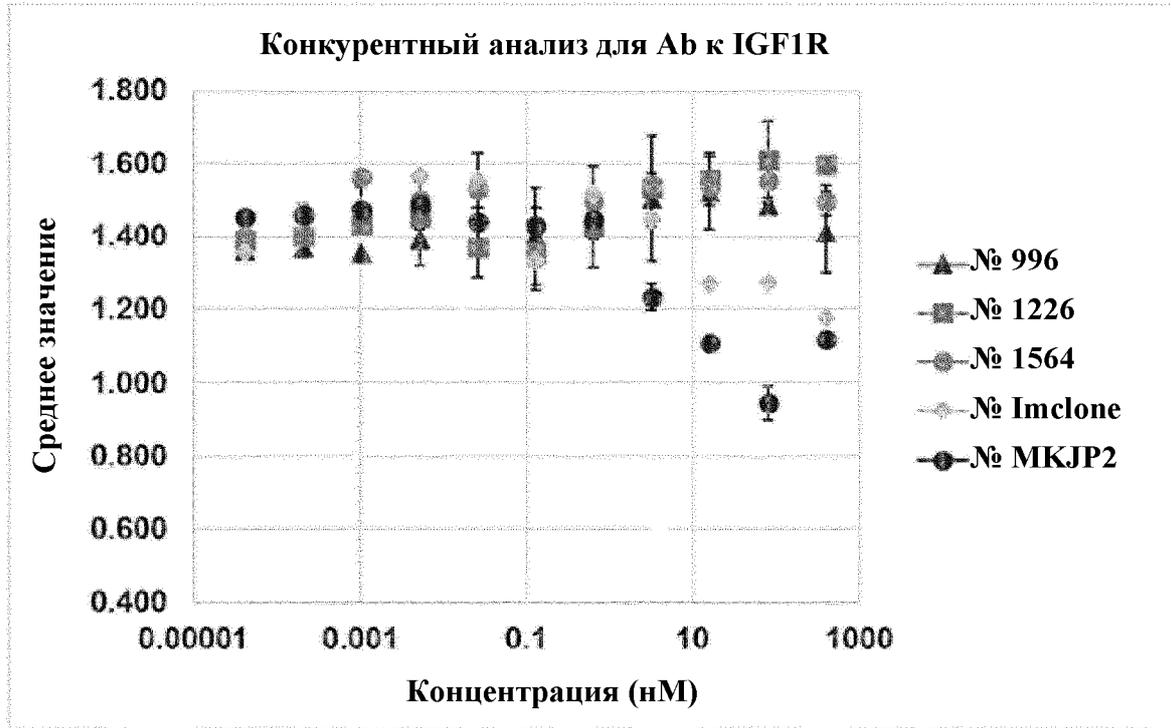
ФИГ. 5b



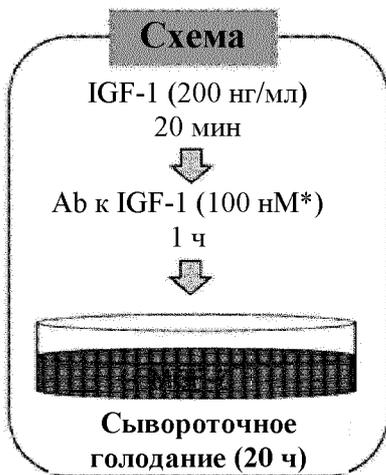
ФИГ. 5c



ФИГ. 6а

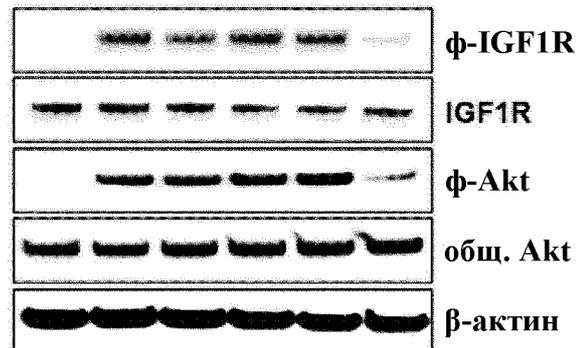


ФИГ. 6б

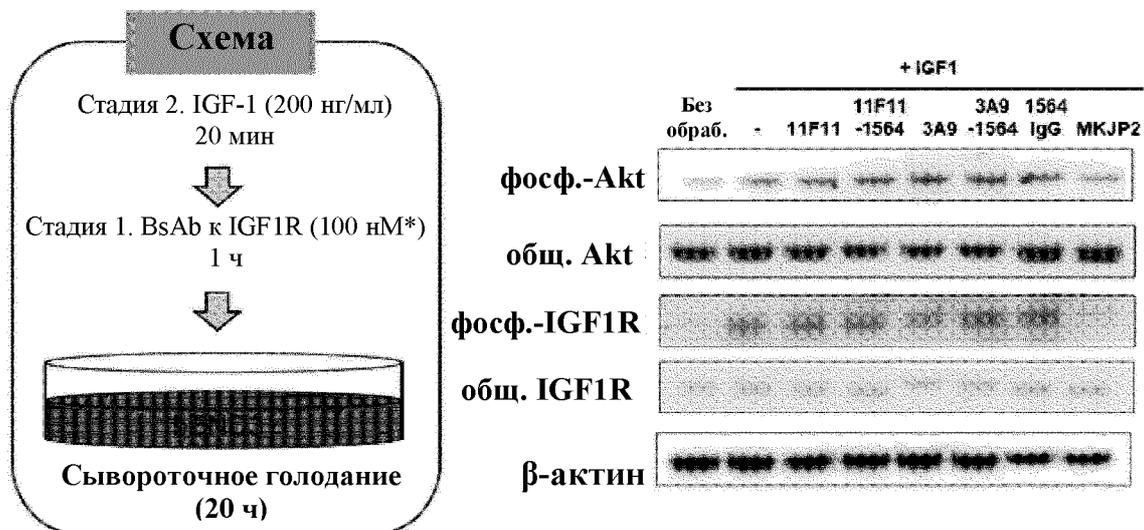


*концентрация Аб (100 нМ)
: № 996, № 1226, № 1564 (scFv-Fc, 10 мкг/мл),
МКJP2 (IgG, 15 мкг/мл)

IGF-1	-	+	+	+	+	+
№ 996	-	-	+	-	-	-
№ 1226	-	-	-	+	-	-
№ 1564	-	-	-	-	+	-
МКJP2	-	-	-	-	-	+



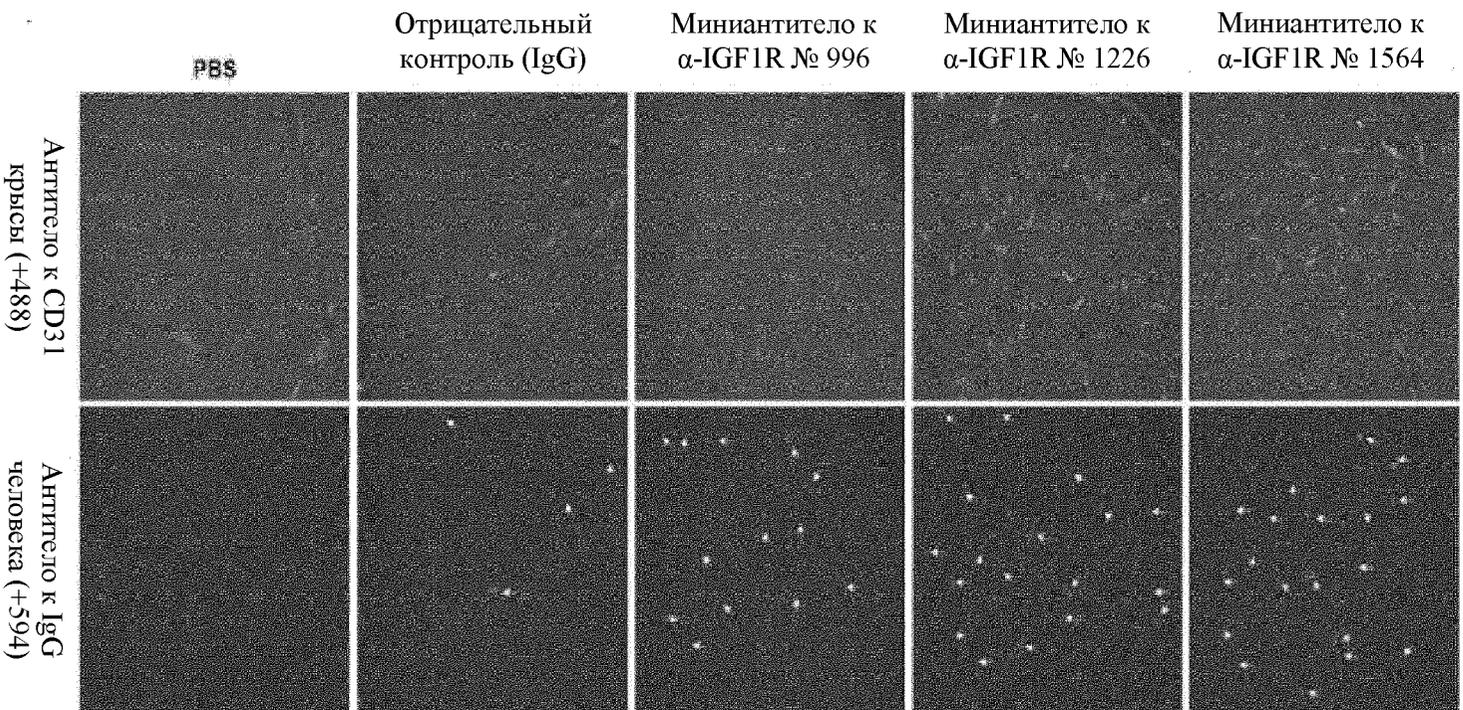
ФИГ. 6с



*концентрация Аб (100 нМ)
: IgG (15 мкг/мл), IgG-scFv (20 мкг/мл)

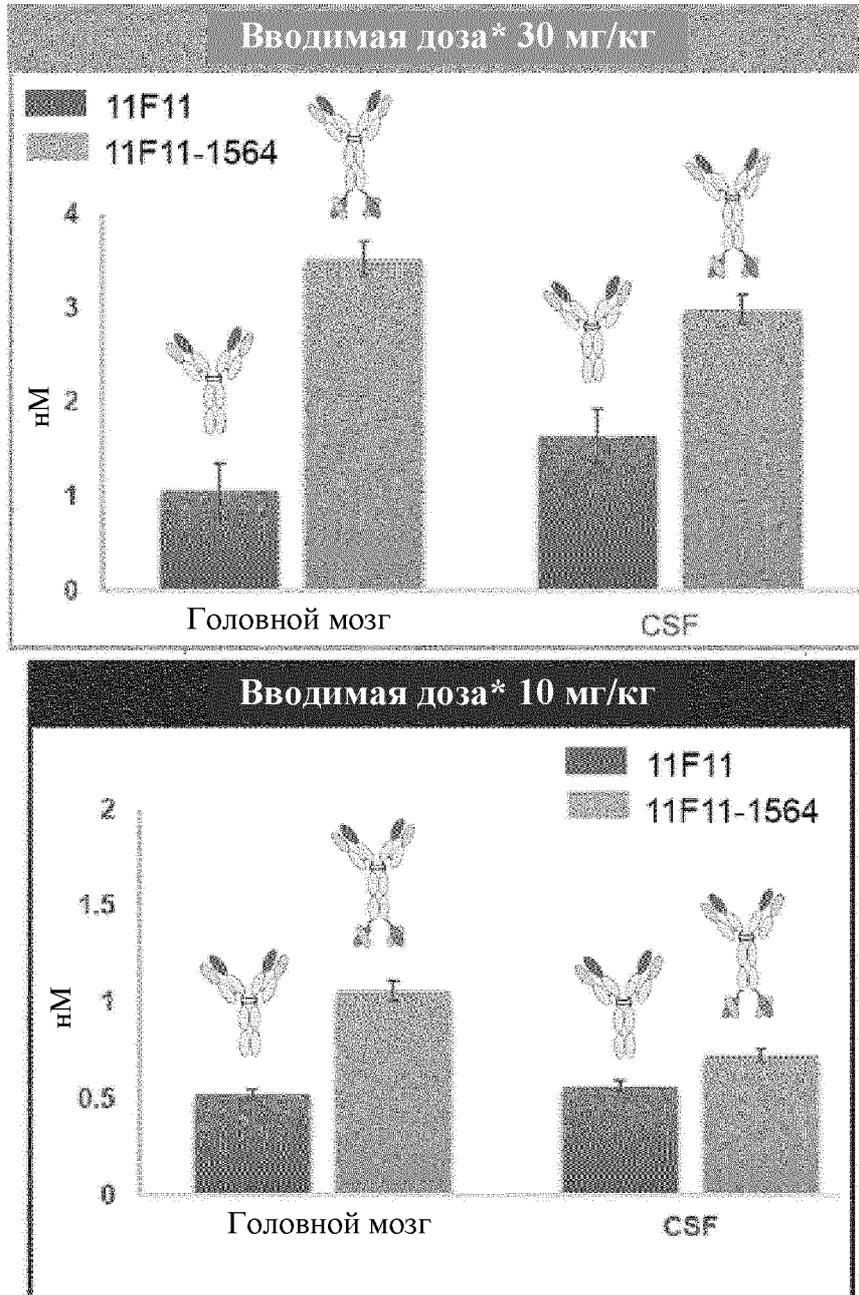
ch11F11, остов ch3A9

ФИГ. 7а

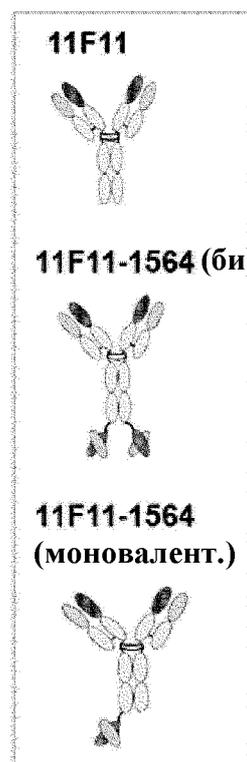
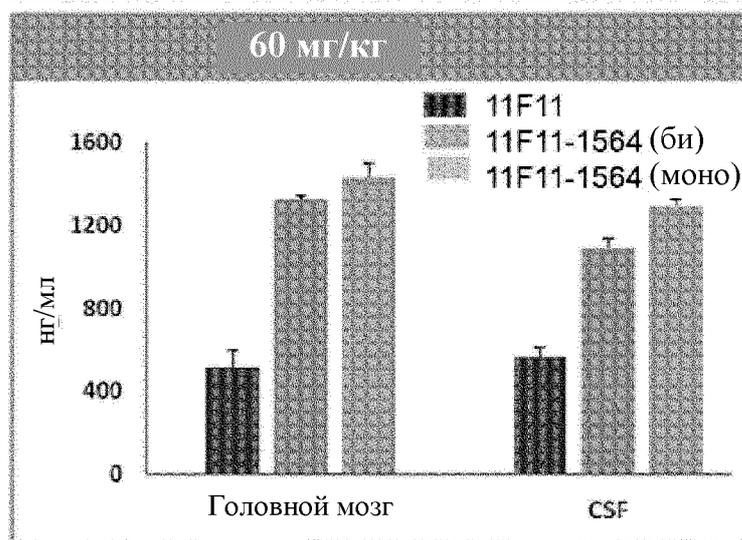
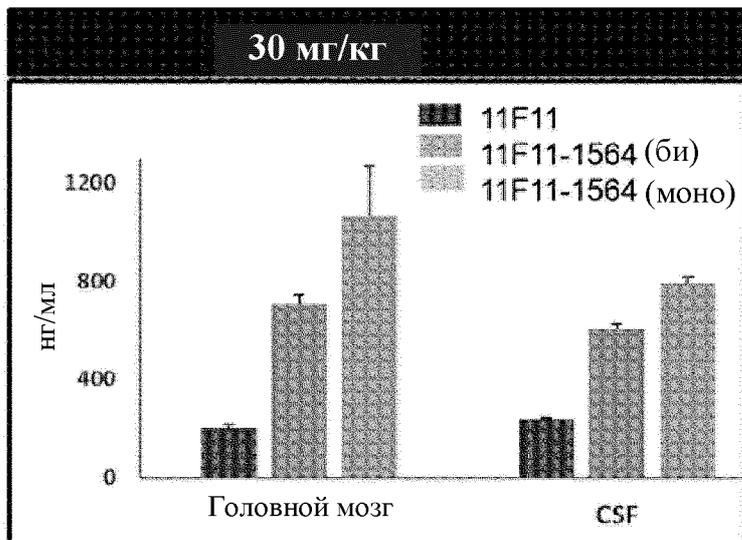


Фиксированные срезы головного мозга: CD31: маркер сосудов (зеленым); Ab маркер (красным)

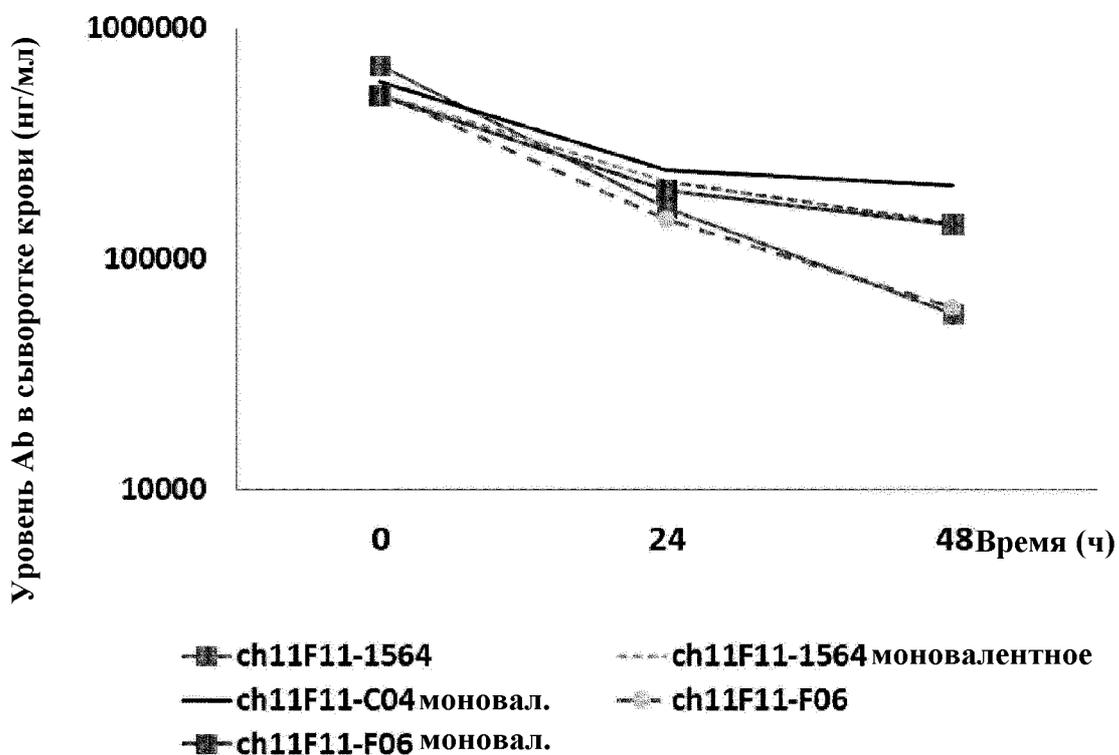
ФИГ. 7b



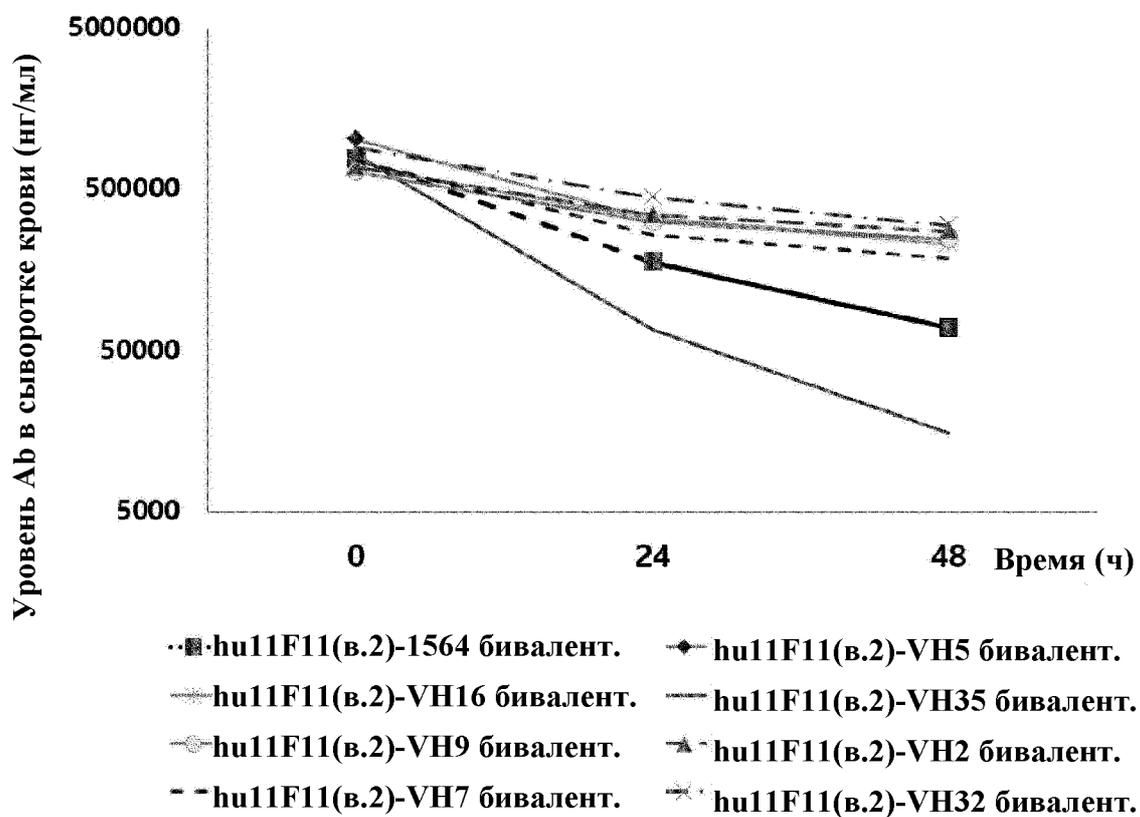
ФИГ. 7с

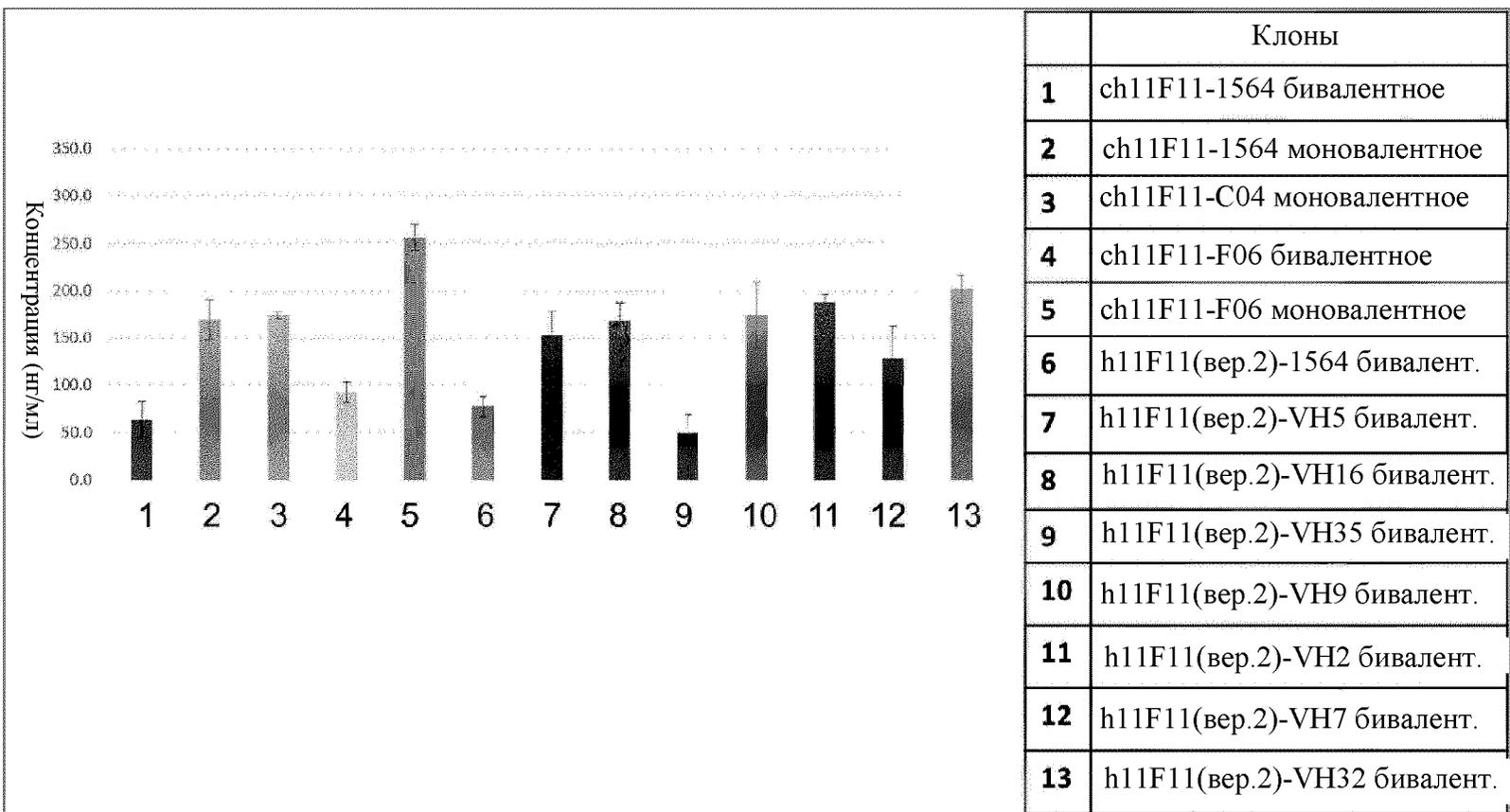


ФИГ. 7d



ФИГ. 7e

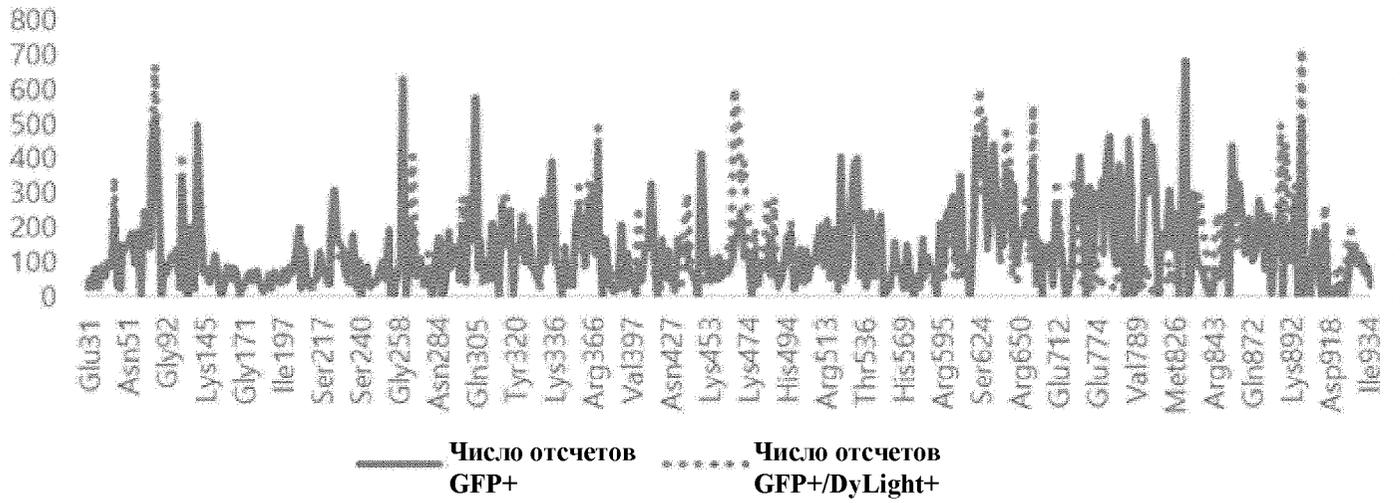




ФИГ. 8

Локализация в антителе 1564	Сайт	Температура (°C)	Модификация	Содержание (%)
LCDR1	scFV(483-511)	4	Немодифицир.	99.2
			Дезамидирован.	0.8
LCDR1	scFV(483-511)	40	Немодифицир.	99.0
			Дезамидирован.	1.0
LCDR2	scFV(512-527)	4	Немодифицир.	84.7
			Дезамидирован.	15.3
LCDR2	scFV(512-527)	40	Немодифицир.	83.1
			Дезамидирован.	16.9
LCDR3	scFV(546-571)	4	Немодифицир.	95.4
			Дезамидирован.	4.6
LCDR3	scFV(546-571)	40	Немодифицир.	90.2
			Дезамидирован.	9.8
HCDR2	scFV(639-660)	4	Немодифицир.	55.8
			Дезамидирован.	44.2
1564_Каркас	scFV(639-660)	40	Немодифицир.	52.7
			Дезамидирован.	47.3
1564_Каркас	scFV(672-682)	4	Немодифицир.	95.6
			Дезамидирован.	4.4
1564_Каркас	scFV(672-682)	40	Немодифицир.	95.7
			Дезамидирован.	4.3

Подсчет вариантов IGF1R

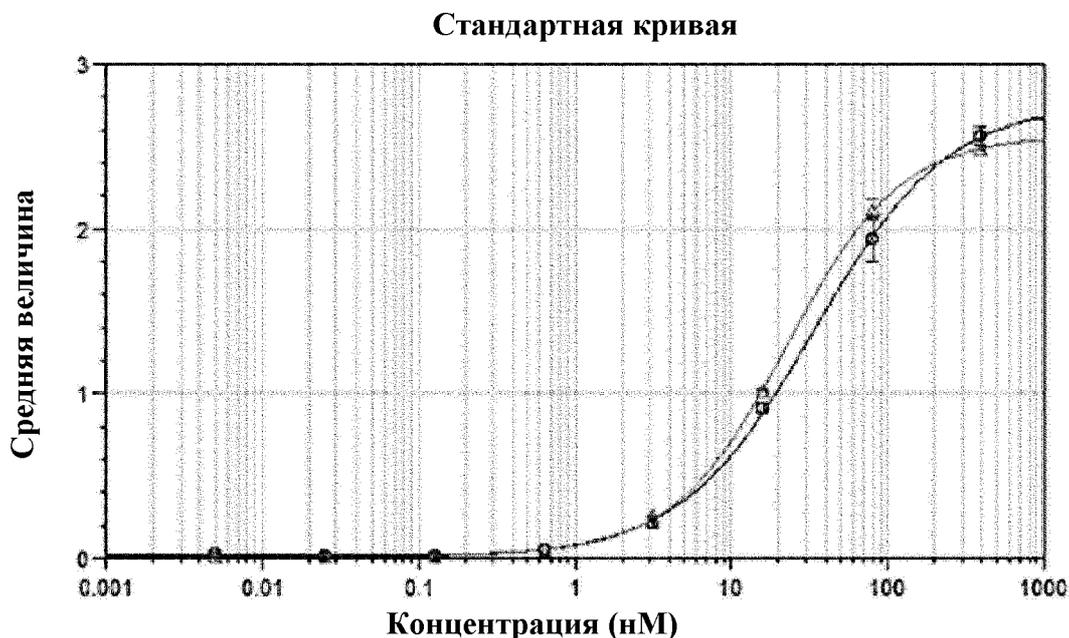


Участок связывания клона 1564

В пределах FN2

Y775, P776, F778, R650, S791, L798 и Glu779

ФИГ. 10а

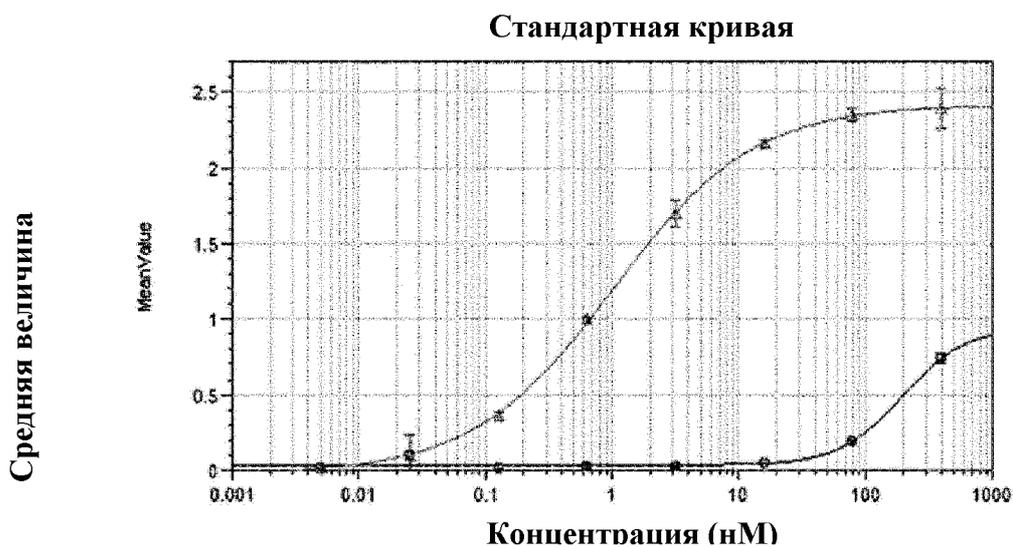


4-парам. аппрокс.: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$:

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
График №1 (ch11F11: средн. величина от конц.)	0,00522	1,02	33,8	2,77	1
График №3 (ch11F11-1564: средн. вел. от конц.)	0,0159	1,2	22,7	2,57	1

Способ аппроксимации кривой - с фиксированными значениями весов

ФИГ. 10б



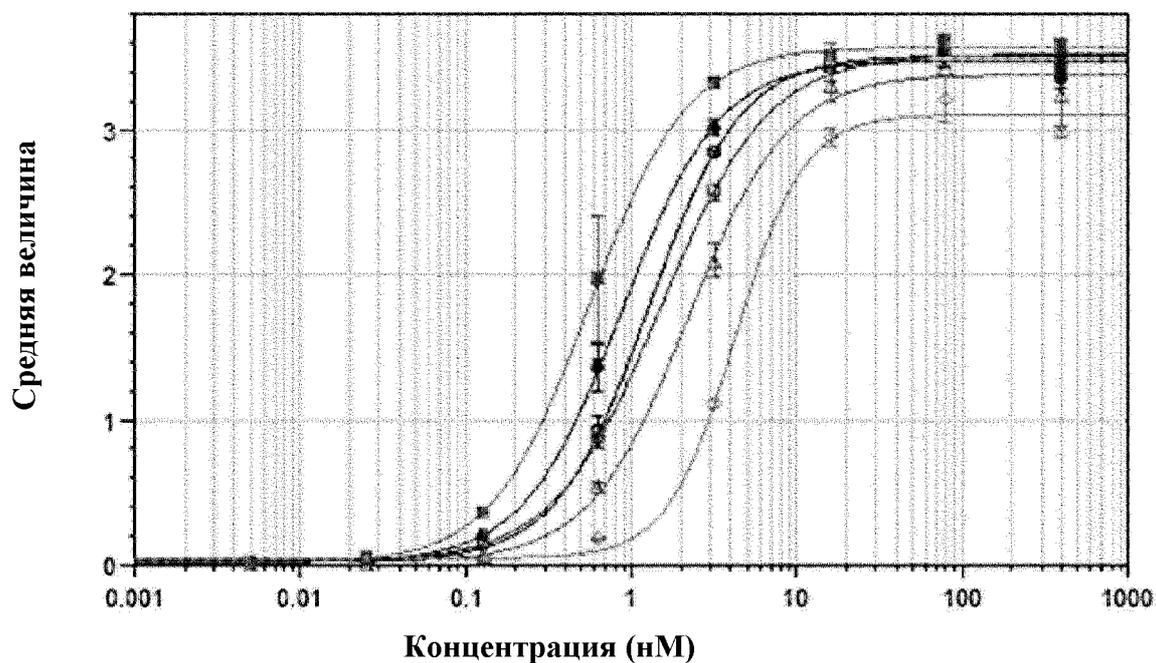
4-парам. аппрокс.: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$:

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
График №1 (ch11F11: средн. величина от конц.)	0,0321	1,73	196	0,945	0,985
График №3 (ch11F11-1564: средн. вел. от конц.)	-0,0248	0,781	1,01	2,42	1

Способ аппроксимации кривой - с фиксированными значениями весов

ФИГ. 10с

Стандартная кривая

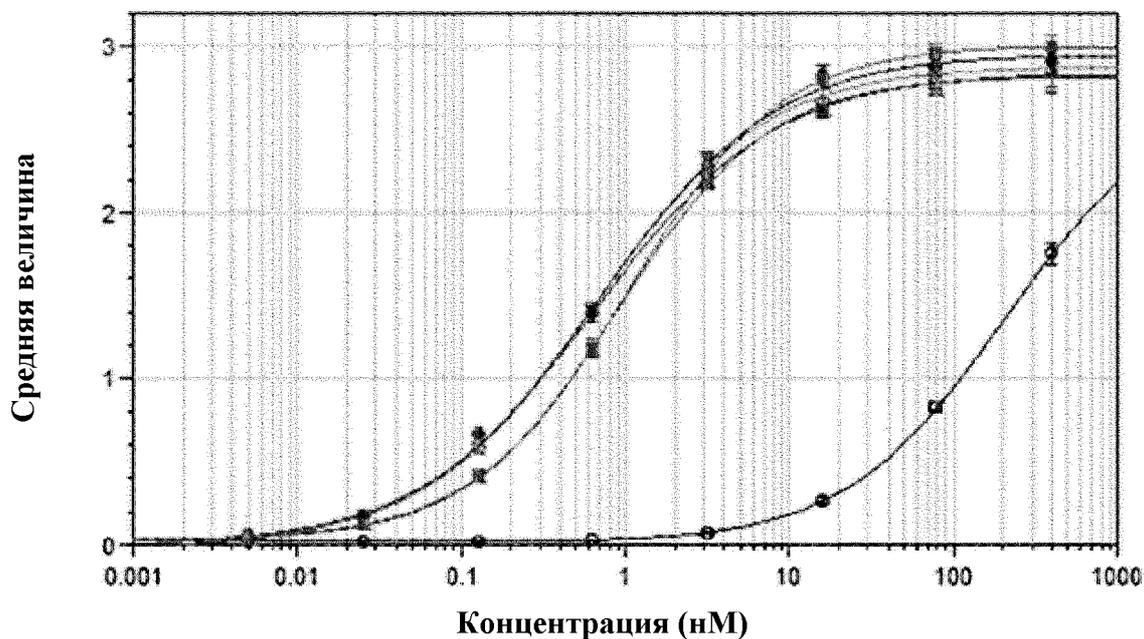


4-парам. аппрокс.: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$:	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
○ График №4 (ch11F11(-RD): средн. величина от конц.)	0,0238	1,56	1,27	3,51	0,999
□ График №1 (ch11F11-1564(-RD): средн. вел. от конц.)	0,0186	1,34	1,5	3,52	0,999
△ График №2 (ch11F11-1564(-RD) моно: ср. вел. от конц.)	0,02	1,45	2,21	3,39	0,998
◇ График №3 (hu11F11-1564(вер.2): средн. вел. от конц.)	0,0445	2,11	4,27	3,11	0,997
● График №5 (hu11F11-1564(вер.3): средн. вел. от конц.)	0,0138	1,47	0,874	3,48	0,999
■ График №6 (hu11F11-1564(вер.3) моно: ср. вел. от конц.)	0,00929	1,48	0,559	3,57	1

Способ аппроксимации кривой - с фиксированными значениями весов

ФИГ. 10d

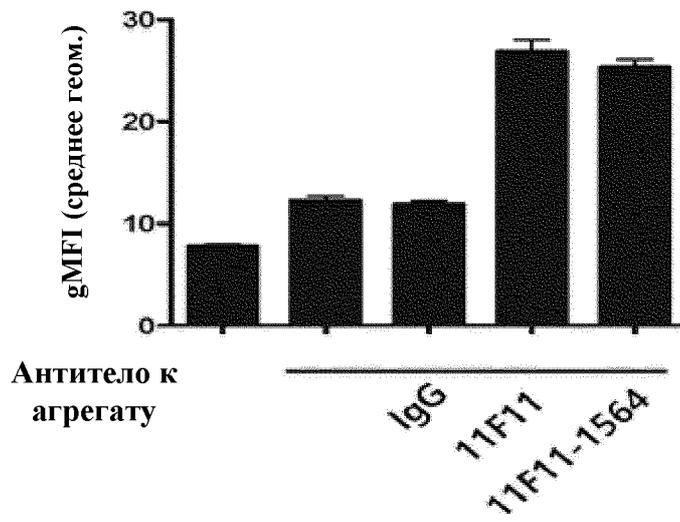
Стандартная кривая

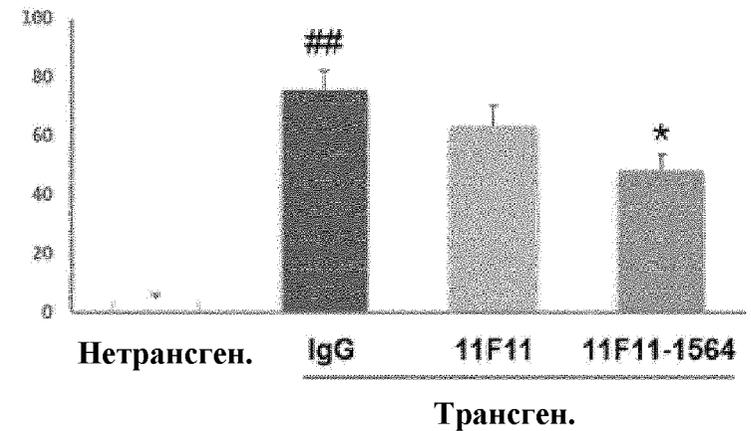
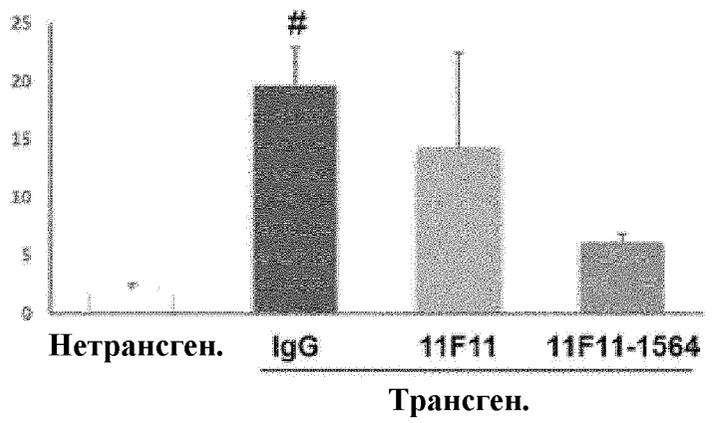
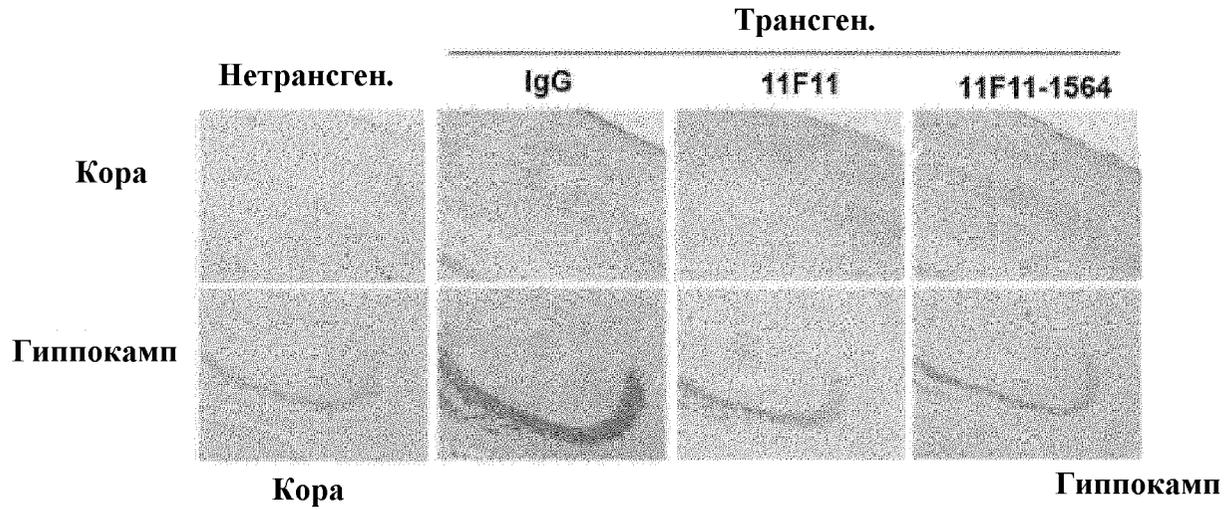


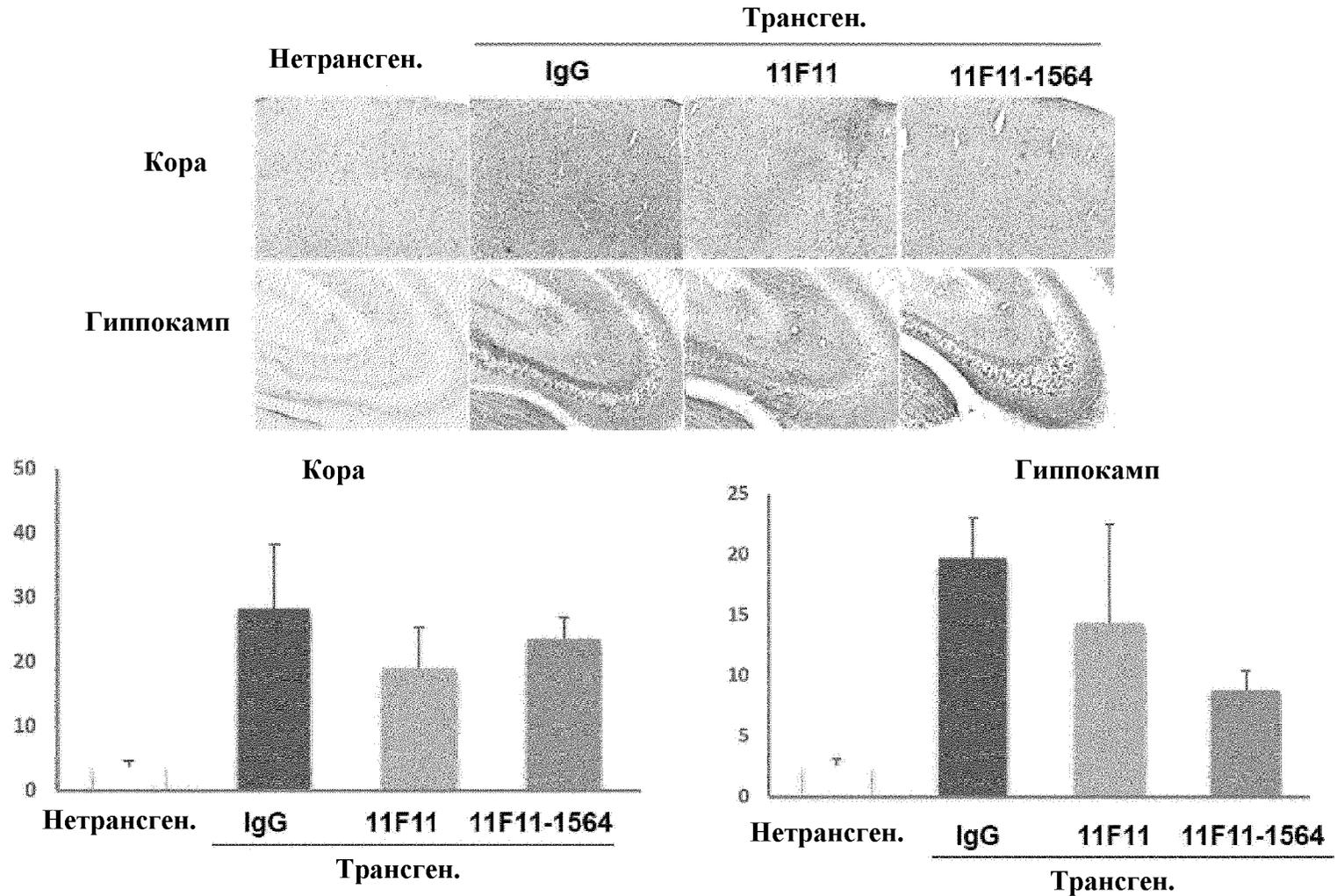
4-парам. аппрокс.: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$:	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
○ График №4 (ch11F11(-RD): средн. величина от конц.)	0,013	0,898	201	2,68	1
□ График №1 (ch11F11-1564(-RD): средн. вел. от конц.)	-0,0288	0,789	0,644	2,84	1
△ График №2 (ch11F11-1564(-RD) моно: ср. вел. от конц.)	0,029	0,942	0,904	2,82	0,999
◇ График №3 (hu11F11-1564(вер.2): средн. вел. от конц.)	-0,00338	0,84	0,649	2,88	1
● График №5 (hu11F11-1564(вер.3): средн. вел. от конц.)	-0,00109	0,812	0,687	2,96	0,999
■ График №6 (hu11F11-1564(вер.3) моно: ср. вел. от конц.)	0,0203	0,929	1,02	3,01	1

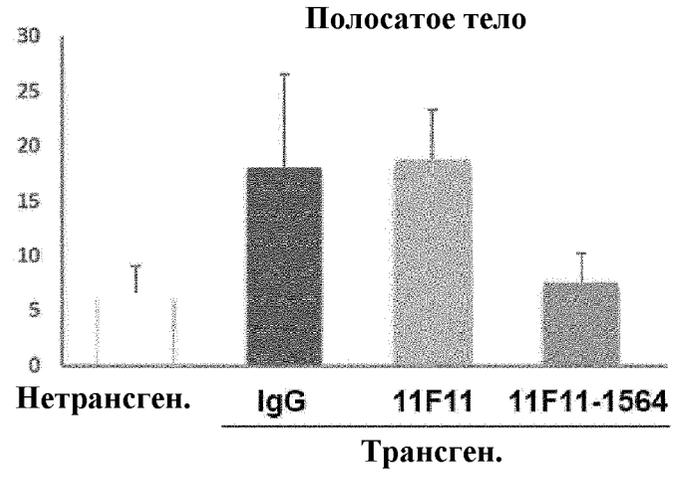
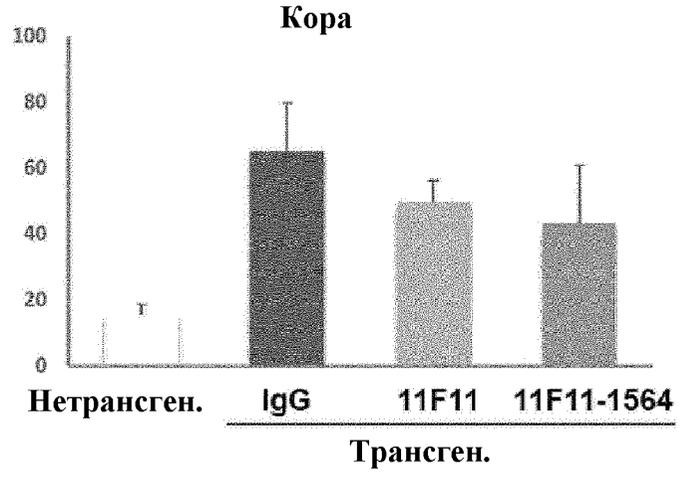
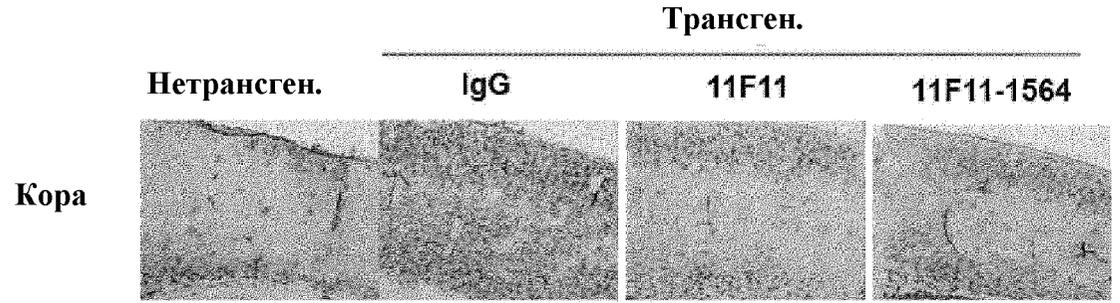
Способ аппроксимации кривой - с фиксированными значениями весов

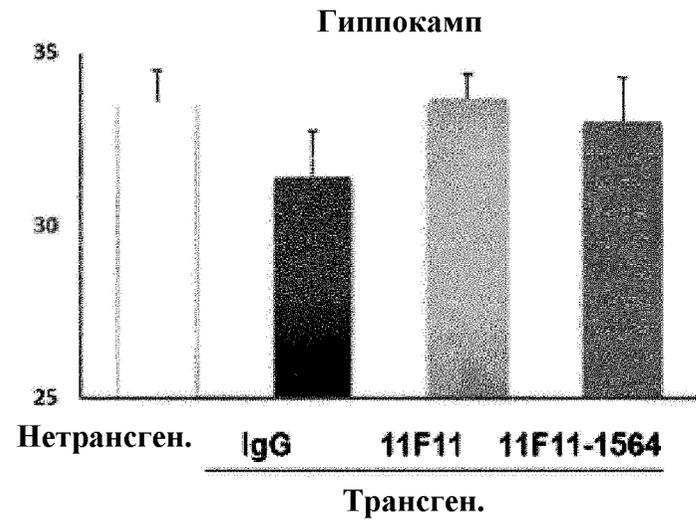
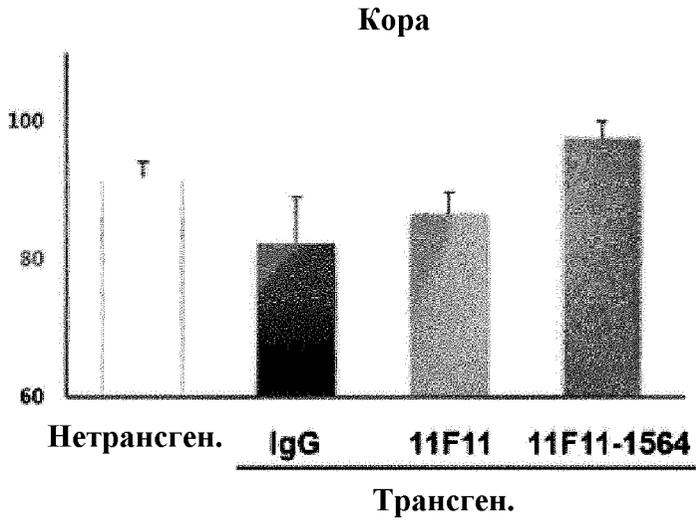
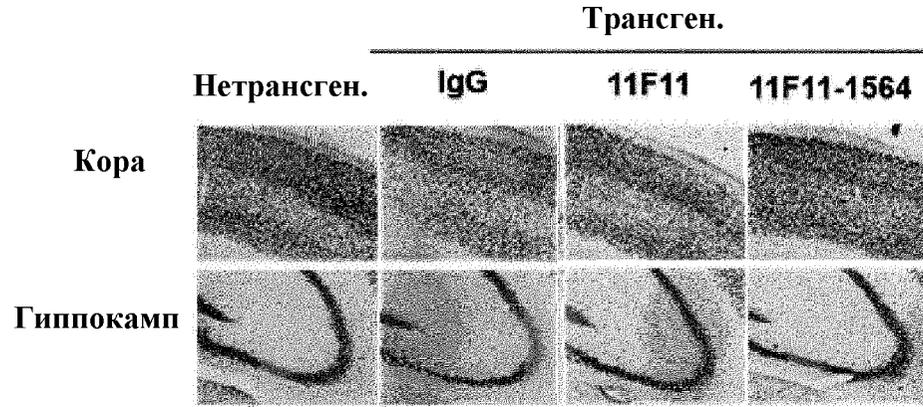
ФИГ. 10e



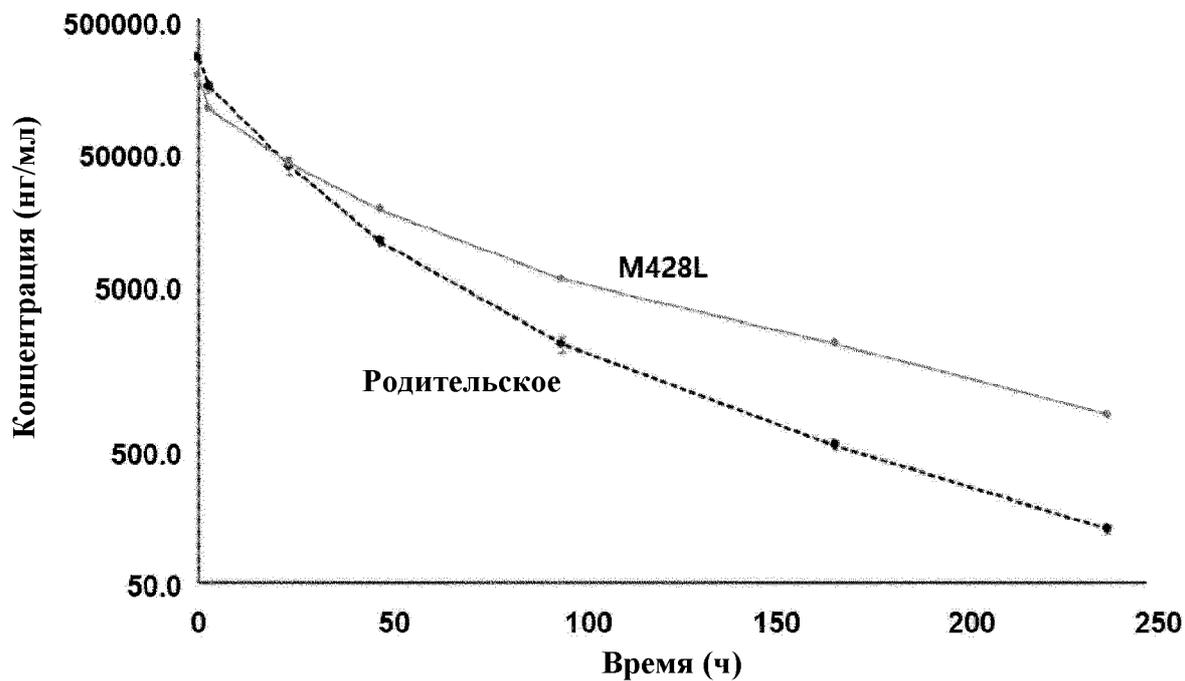




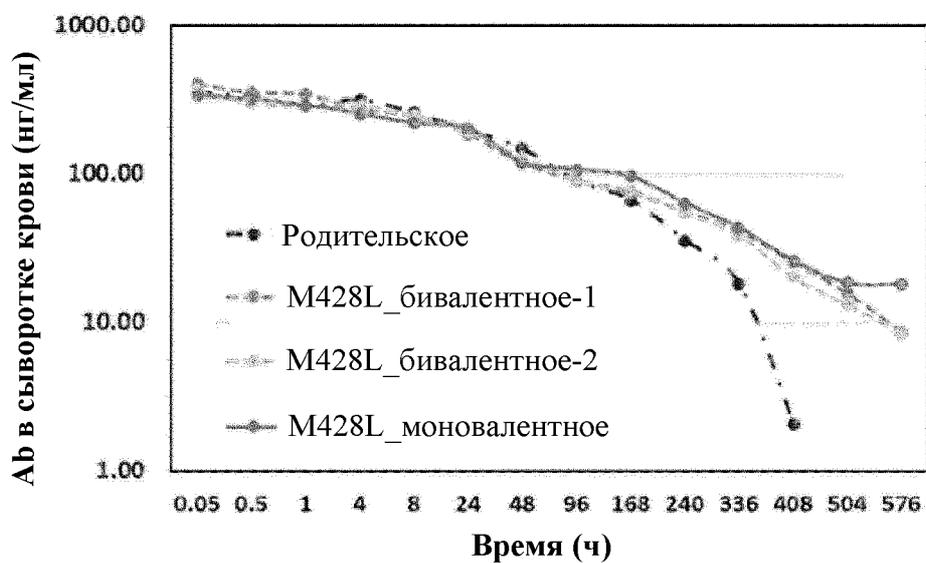




ФИГ. 12а

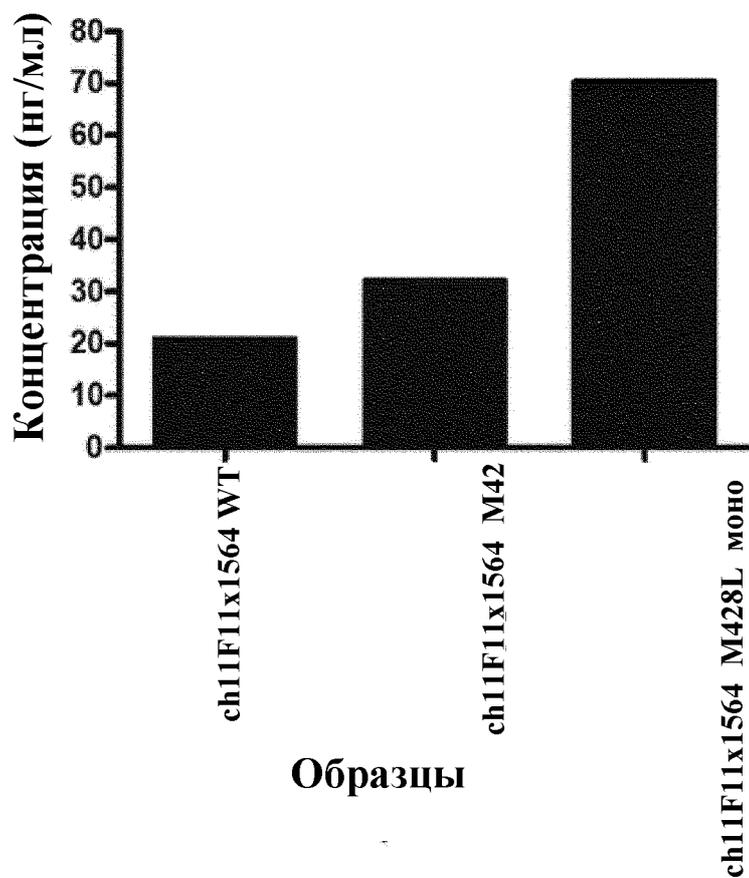


ФИГ. 12б

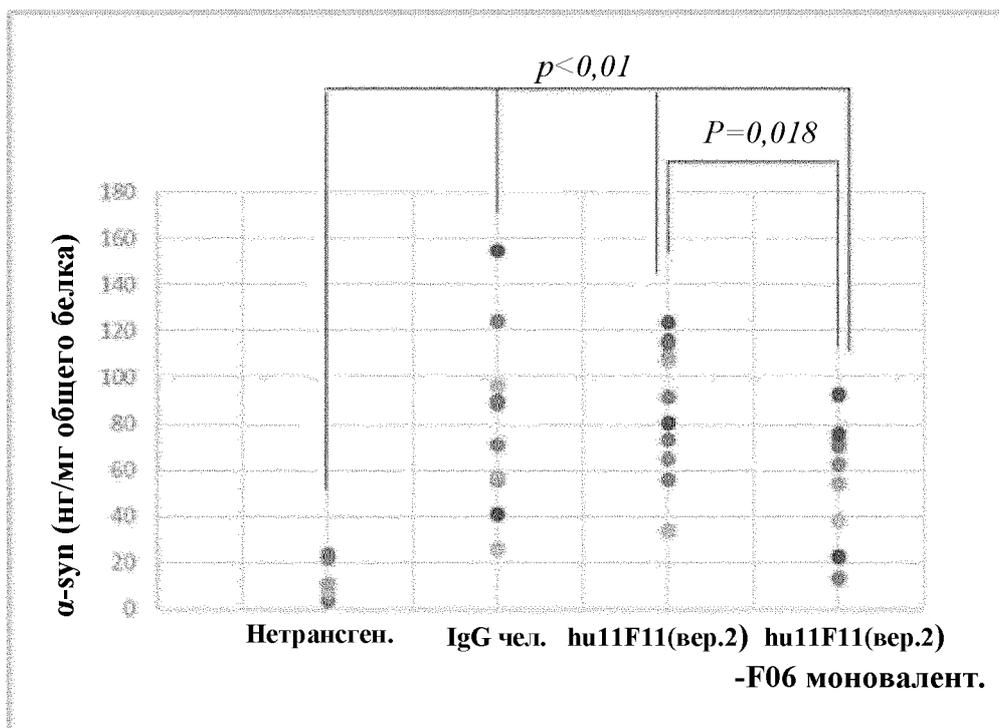


	Период полувыведения (сут)	Клиренс (мл/ч/кг)
Родительское	3,6	0,438
M428L_бивалентное	5,1	0,37
M428L_моновалентное	4,9	0,3155

ФИГ. 12с

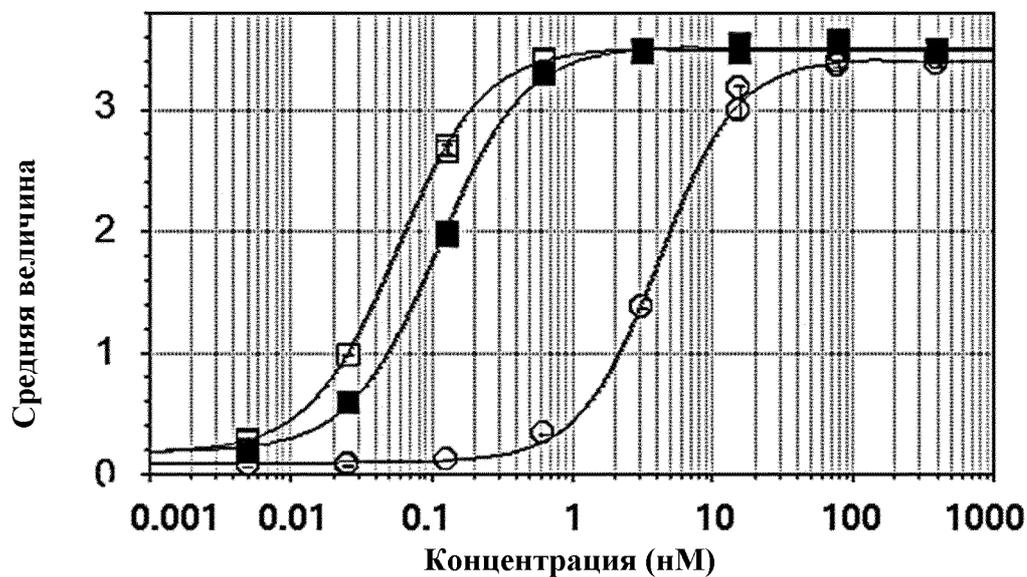


ФИГ. 13



ФИГ. 14а

Сравнение F06 моновалент., F06(de)(StoP) моновалент. и
F06(de2)(StoP)
Стандартная кривая



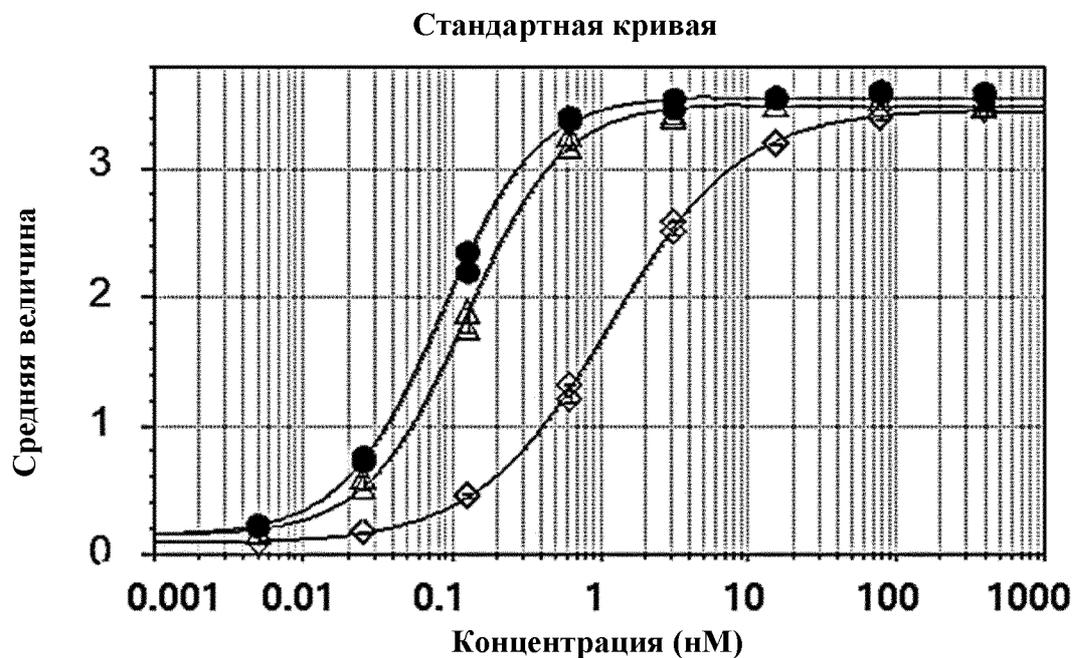
4-парам. аппрокс.: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$:

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
■ График №6 (hu11F11(в.2)-F06_моно.: ср. величина от конц.)	0,178	1,4	0,112	3,51	0,999
○ График №1 (hu11F11(в.2)-F06(de)(SP)_моно.: ср.вел. от конц.)	0,0921	1,55	4,24	3,41	0,999
□ График №2 (hu11F11(в.2)-F06(de2)(StoP)_моно.: ср.вел. от к.)	0,169	1,4	0,0575	3,5	1

Взвешивание: с фиксированными значениями

ФИГ. 14b

Сравнение VH5, VH5(de)(StoP) и VH5(de2)(StoP)



4-парам. аппрокс.: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$:

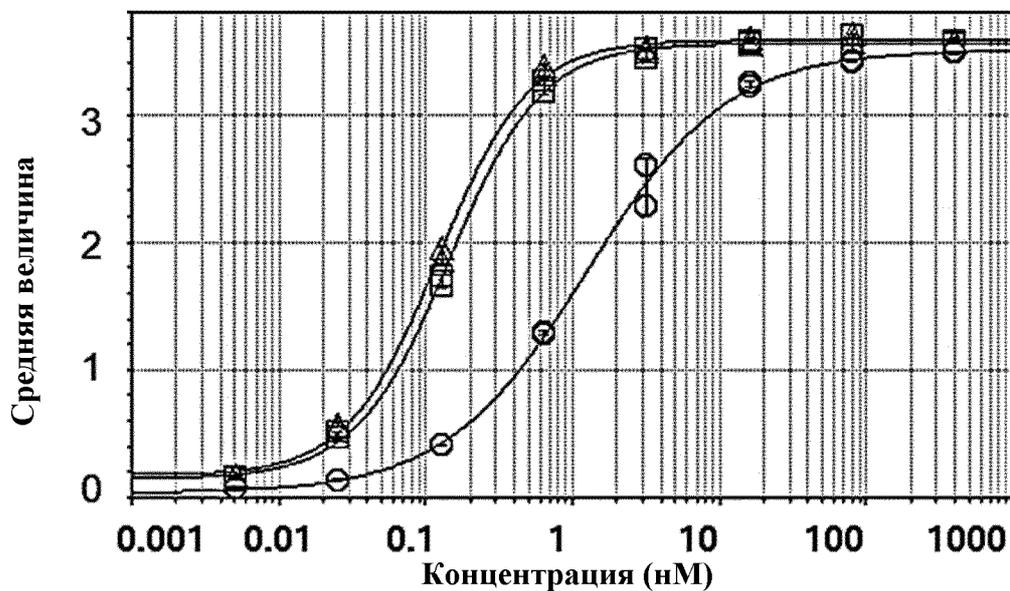
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
△ График №3 (hu11F11(в.2)-VH5: ср. величина от конц.)	0,138	1,32	0,125	3,5	0,999
◇ График №4 (hu11F11(в.2)-VH5(de)(SP): ср. вел. от конц.)	0,0762	0,972	1,19	3,45	1
● График №5 (hu11F11(в.2)-VH5(de2)(SP): ср. вел. от конц.)	0,137	1,32	0,0861	3,57	0,999

Взвешивание: с фиксированными значениями

ФИГ. 14с

Сравнение VH16, VH16(de)(StoP) и VH16(de2)(StoP)

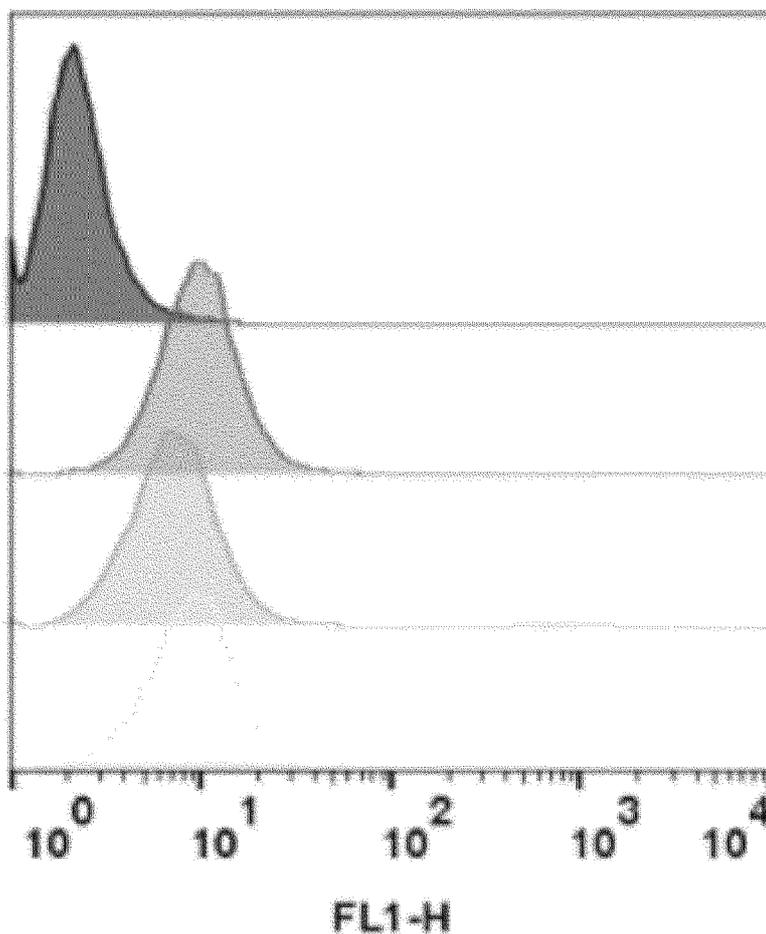
Стандартная кривая

4-парам. аппрокс.: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$:

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
□ График №2 (hu11F11(в.2)-VH16: ср. величина от конц.)	0,15	1,38	0,143	3,56	0,999
○ График №1 (hu11F11(в.2)-VH16(de)(StoP): ср. вел. от конц.)	0,0381	0,907	1,25	3,5	0,998
△ График №3 (hu11F11(в.2)-VH16(de2)(StoP): ср. вел. от конц.)	0,173	1,41	0,122	3,58	0,999

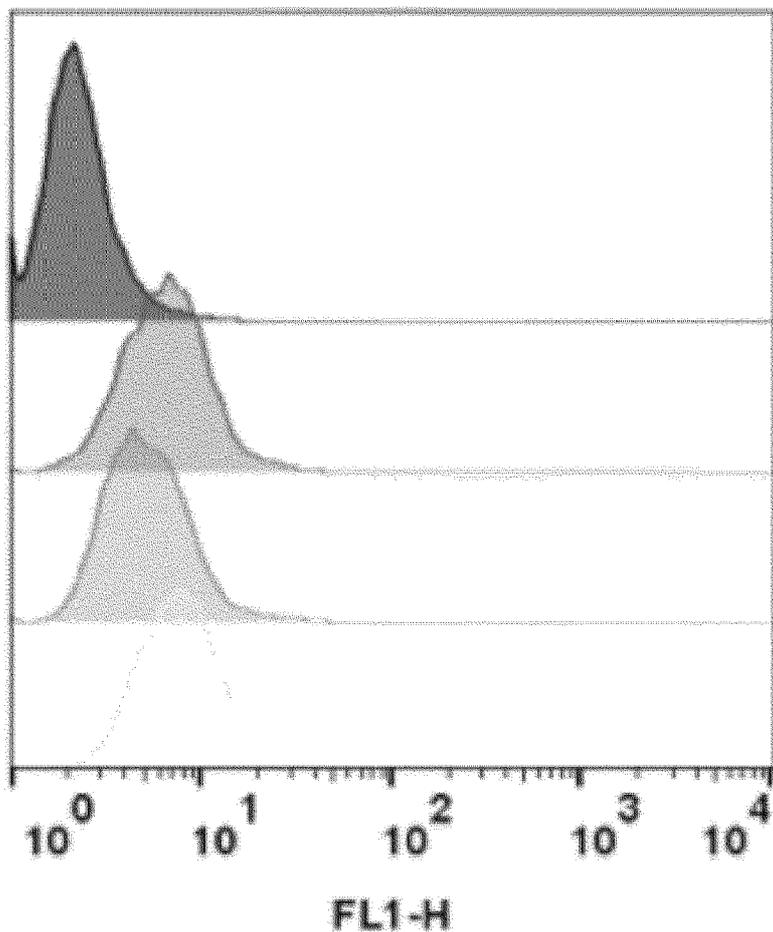
Взвешивание: с фиксированными значениями

ФИГ. 15а

F06 моновалентное

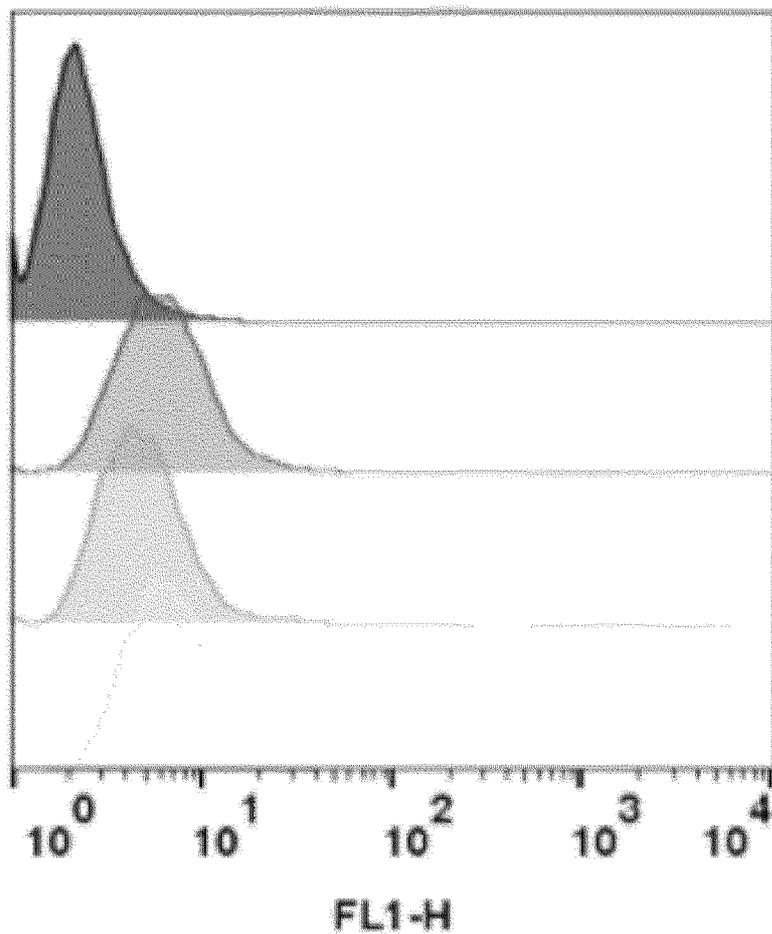
	Название образца	Среднее геом.: FL1-H
■	Только 2-ое Ab. 002	2,30
■	F06-моновалентное. 004	9,65
■	F06(de)(StoP)-моновалент. 005	7,10
□	F06(de2)(StoP)-моновалент.006	8,65

ФИГ. 15b

VH5

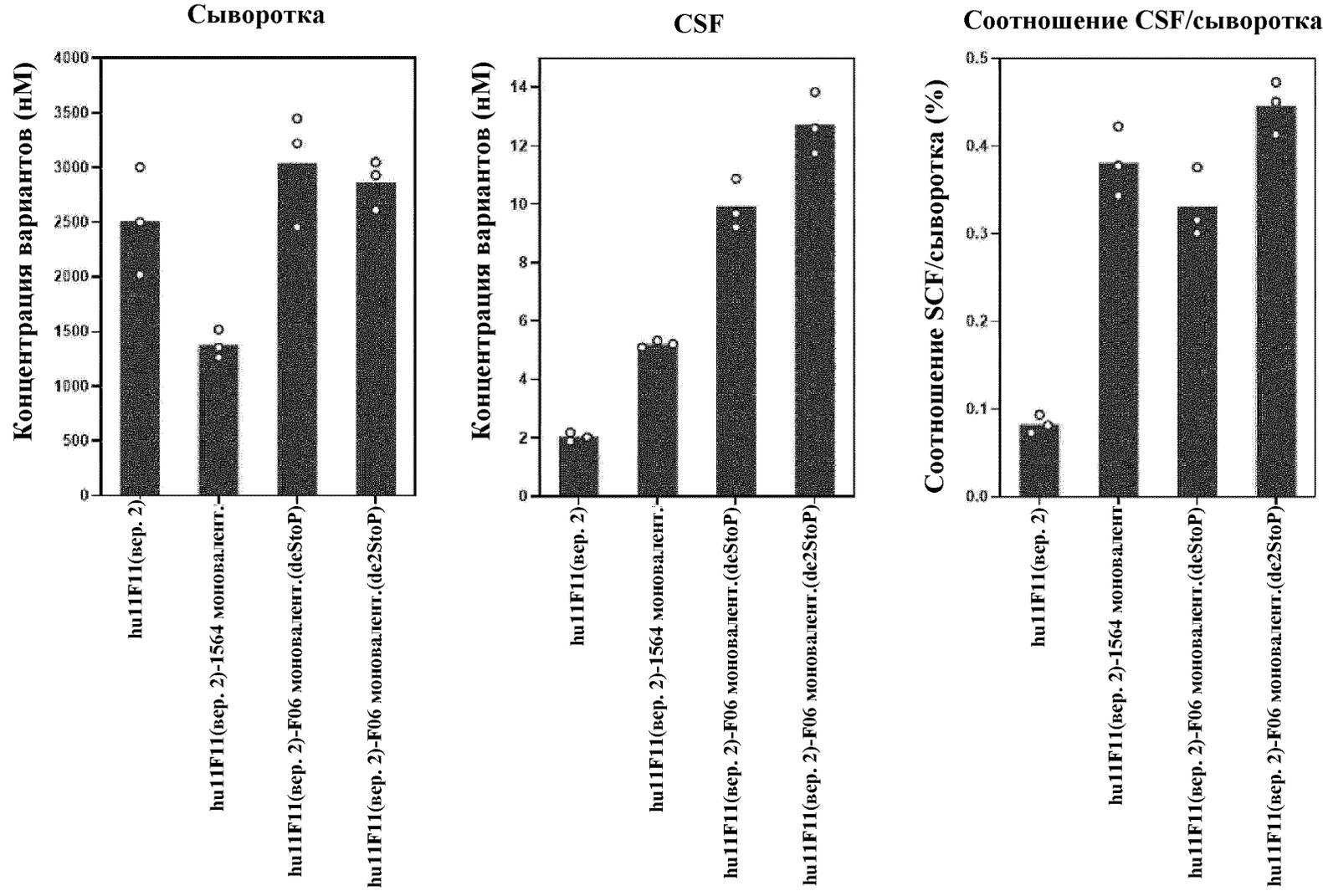
	Название образца	Среднее геом.: FL1-H
■	Только 2-ое Аб. 002	2,30
■	VH5.010	6,47
■	VH5(de)(StoP).011	5,27
■	VH5(de2)(StoP).012	8,07

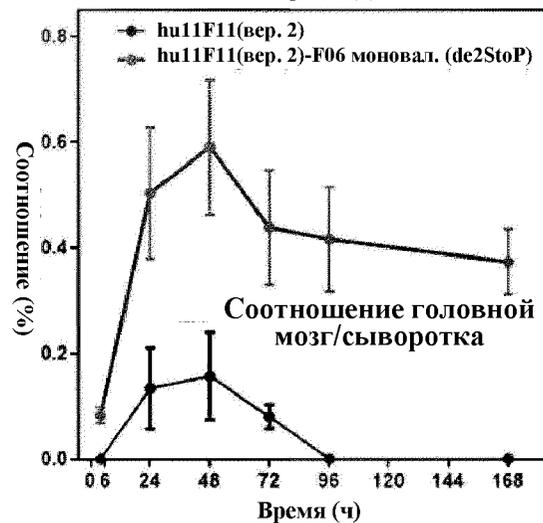
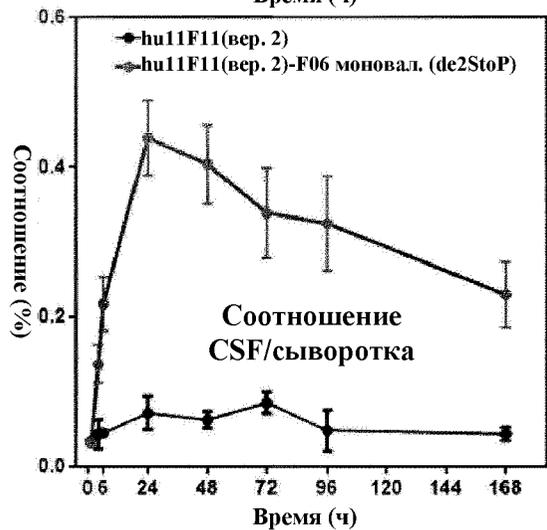
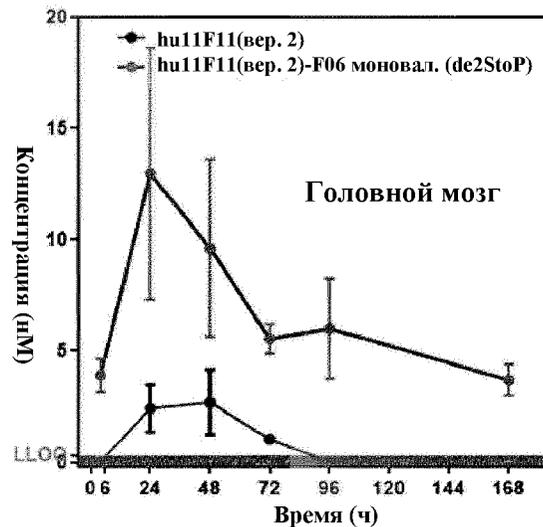
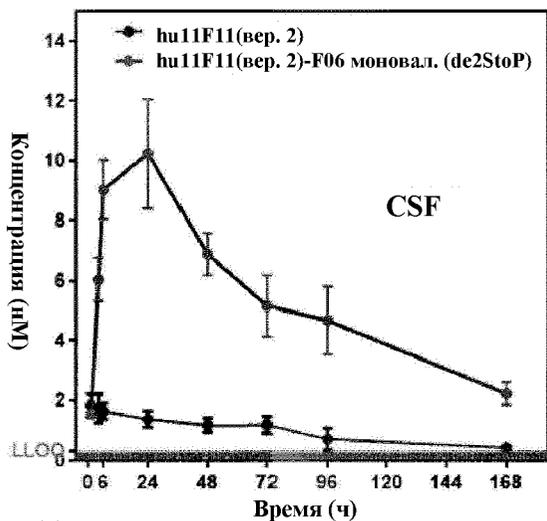
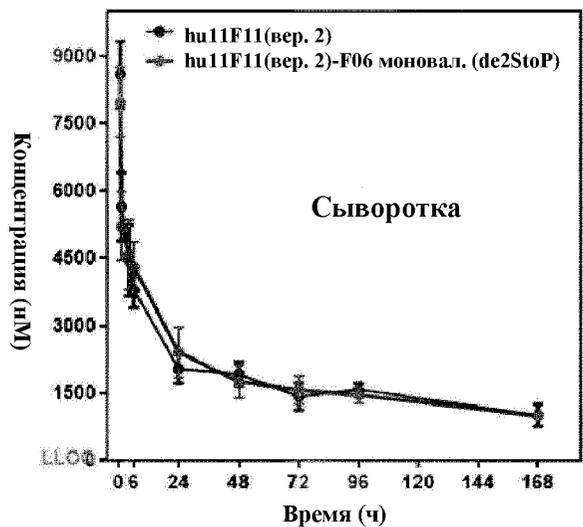
ФИГ. 15с

VH16

	Название образца	Среднее геом.: FL1-H
■	Только 2-ое Ab. 002	2,30
■	VH16.007	6,16
■	VH16(de)(StoP).008	4,83
■	VH16(de2)(StoP).009	6,45

ФИГ. 16





ФИГ. 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/007704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/18(2006.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/18; A61K 38/17; A61K 39/395; A61K 47/48; A61P 25/16; C07K 16/28; A61P 25/28; A61K 39/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: a-syn, IGF1R, bispecific monoclonal antibody

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019-023809 A1 (STRESSMARQ BIOSCIENCES INC.) 07 February 2019 See claims 1-25.	1-15
A	WO 2018-213316 A1 (ALECTOR LLC.) 22 November 2018 See the entire document.	1-15
A	US 2015-0093399 A1 (BIOASIS TECHNOLOGIES, INC.) 02 April 2015 See the entire document.	1-15
A	KR 10-2019-0057004 A (ABL BIO, INC.) 27 May 2019 See the entire document.	1-15
A	KR 10-2016-0127815 A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA) 04 November 2016 See the entire document.	1-15

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 SEPTEMBER 2020 (16.09.2020)

Date of mailing of the international search report

16 SEPTEMBER 2020 (16.09.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,
 Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/007704

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2019-023809 A1	07/02/2019	CN 111225923 A	02/06/2020
		EP 3661961 A1	10/06/2020
		KR 10-2020-0033880 A	30/03/2020
		US 10681034 B2	09/06/2020
		US 2019-0044940 A1	07/02/2019
WO 2018-213316 A1	22/11/2018	EP 3625258 A1	25/03/2020
US 2015-0093399 A1	02/04/2015	EP 3038657 A2	06/07/2016
		US 2019-0192683 A1	27/06/2019
		WO 2015-031673 A2	05/03/2015
		WO 2015-031673 A3	16/07/2015
KR 10-2019-0057004 A	27/05/2019	CN 111356701 A	30/06/2020
		WO 2019-098763 A2	23/05/2019
		WO 2019-098763 A3	11/07/2019
KR 10-2016-0127815 A	04/11/2016	CN 106459194 A	22/02/2017
		CN 106459194 B	18/10/2019
		EP 3114142 A1	11/01/2017
		EP 3114142 B1	05/06/2019
		JP 2017-514456 A	08/06/2017
		JP 6541235 B2	10/07/2019
		US 10106614 B2	23/10/2018
		US 2017-0015749 A1	19/01/2017
		WO 2015-131256 A1	11/09/2015