



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/28 (2020.02); C07K 14/79 (2020.02); A61K 39/395 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2018101978, 22.06.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.06.2016

Дата регистрации:
06.08.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
24.06.2015 EP 15173508.1;
09.07.2015 EP 15176084.0

(43) Дата публикации заявки: 25.07.2019 Бюл. № 21

(45) Опубликовано: 06.08.2020 Бюл. № 22

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 24.01.2018

(86) Заявка РСТ:
EP 2016/064460 (22.06.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/207240 (29.12.2016)

Адрес для переписки:
197101, Санкт-Петербург, А/я 128, "АРС-
ПАТЕНТ", С. В. Новоселовой

(72) Автор(ы):

ДЕНГЛЬ, Стефан (DE),
ЖОРЖ, Ги (DE),
ГЁПФЕРТ, Ульрих (DE),
НИВЁНЕР, Йенс (DE),
ШЛОТАУЭР, Тильман (DE)

(73) Патентообладатель(и):

Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2439160 C1, 10.01.2012. AR
0000089010 A1, 29.07.2014. ZA 0201304726 A,
26.03.2014. NZ 0000594514 A, 28.06.2013.

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ ТРАНСФЕРРИНОВОГО РЕЦЕПТОРА, ОБЛАДАЮЩИЕ
ИНДИВИДУАЛИЗИРОВАННОЙ АФФИННОСТЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к гуманизированному антителу, которое специфично связывается с человеческим трансферриновым рецептором. Также раскрыты челночный модуль и фармацевтическая композиция, содержащие указанные антитела.

Раскрыты способ лечения с помощью указанного челночного модуля и применение указанного антитела челночного модуля. Изобретение позволяет эффективно лечить неврологическое расстройство. 7 н. и 9 з.п. ф-лы, 14 пр., 6 табл., 3 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)*C07K 14/79* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 25/28* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 16/28 (2020.02); C07K 14/79 (2020.02); A61K 39/395 (2020.02)(21)(22) Application: **2018101978, 22.06.2016**(24) Effective date for property rights:
22.06.2016Registration date:
06.08.2020

Priority:

(30) Convention priority:
24.06.2015 EP 15173508.1;
09.07.2015 EP 15176084.0(43) Application published: **25.07.2019 Bull. № 21**(45) Date of publication: **06.08.2020 Bull. № 22**(85) Commencement of national phase: **24.01.2018**(86) PCT application:
EP 2016/064460 (22.06.2016)(87) PCT publication:
WO 2016/207240 (29.12.2016)Mail address:
**197101, Sankt-Peterburg, A/ya 128, "ARS-
PATENT", S. V. Novoselovoj**

(72) Inventor(s):

DENGL, Stefan (DE),
ZHORZH, Gi (DE),
GEPFERT, Ulrikh (DE),
NIVENER, Jens (DE),
SHLOTAUER, Tilman (DE)

(73) Proprietor(s):

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)(54) **ANTIBODIES AGAINST TRANSFERRIN RECEPTOR HAVING INDIVIDUALIZED AFFINITY**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to a humanized antibody which specifically binds to a human transferrin receptor. Also disclosed are the shuttle module and the pharmaceutical composition containing said antibodies.

Disclosed is a method of treating using said shuttle module and using said shuttle module antibody.

EFFECT: invention provides effective treatment of neurological disorder.

16 cl, 14 ex, 6 tbl, 3 dwg

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам против трансферринового рецептора с запланированными скоростями диссоциации в отношении человеческого трансферринового рецептора и к их применению в качестве челночного модуля гематоэнцефалического барьера.

Предшествующий уровень техники

Проникновение в мозг лекарственных средств против неврологических расстройств, таких как большие биотерапевтические лекарственные средства или низкомолекулярные лекарственные средства, имеющие слабое проникновение в мозг, строго ограничивается обширным и непроницаемым гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ), наряду с другими клеточными компонентами в нейроваскулярной единице (НВЕ). Тестировали многие стратегии для преодоления этого препятствия, и одной из них является применение путей трансцитоза, опосредованных эндогенными рецепторами, экспрессируемыми на эндотелии мозговых капилляров (рецептор гематоэнцефалического барьера). Против данных рецепторов были сконструированы рекомбинантные белки, такие как моноклональные антитела или пептиды, для обеспечения опосредованной рецептором доставки биотерапевтических средств в мозг. Однако остаются неисследованными стратегии для максимизации поглощения в мозг при минимизации неправильной сортировки в пределах мозговых эндотелиальных клеток (МЭК) и степень накопления в пределах определенных органелл (особенно в органеллах, которые приводят к деградации биотерапевтического средства) в МЭК.

Моноклональные антитела и другие биотерапевтические средства имеют огромный терапевтический потенциал для лечения патологии в центральной нервной системе (ЦНС). Однако их доступ в мозг предотвращается ГЭБ. Предыдущие исследования проиллюстрировали то, что очень маленькая процентная доля (приблизительно 0,1%) IgG, инъецированного в кровоток, способна проникать в компартмент ЦНС (Felgenhauer, Klin. Wschr. 52 (1974) 1158-1164). Это будет определенно ограничивать любой фармакологический эффект из-за низкой концентрации антитела в пределах ЦНС.

Ранее было обнаружено то, что процентная доля антитела, которое распределяется в ЦНС, могла быть увеличена посредством применения рецепторов ГЭБ (т.е. трансферринового рецептора, инсулинового рецептора и тому подобных) (см., например, WO 95/02421).

Следовательно, существует потребность в системах доставки лекарственных средств против неврологических расстройств через ГЭБ для эффективной челночной доставки лекарственных средств в мозг.

В WO 2014/033074 описывается челнок гематоэнцефалического барьера.

В WO 2014/189973 описываются антитела против трансферринового рецептора и способы их применения. Кроме того, описывается то, что нацеливание на рецептор ГЭБ с использованием традиционного специфичного высокоаффинного антитела обычно приводило к ограниченному увеличению транспорта через ГЭБ. Позднее обнаружили то, что величина поглощения и распределения антитела в ЦНС обратно связана с его аффинностью связывания в отношении рецептора ГЭБ среди исследованных антител против ГЭБ. Например, низкоаффинное антитело к трансферриному рецептору (TfR), дозированное при терапевтических уровнях дозы, значительно улучшает транспорт через ГЭБ и удерживание в ЦНС антитела против TfR относительно более высокоаффинного антитела против TfR и делает возможным более легкое достижение терапевтических концентраций в ЦНС (Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43). Доказательство такого транспорта через ГЭБ было достигнуто

с использованием биспецифичного антитела, которое связывается и с TfR, и с β -секретазой (BACE1) - ферментом расщепления белка-предшественника амилоида (APP). Одна системная доза биспецифичного антитела против TfR/BACE1, сконструированного с использованием низкоаффинного антитела, не только приводила к значимому

5 поглощению антитела в мозг, но также кардинально уменьшала уровни мозгового A β 1-40 по сравнению с одним моноспецифичным антителом против BACE1, свидетельствуя о том, что проникновение через ГЭБ влияет на эффективность антитела против BACE1 (Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43; Yu et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra44).

10 Кроме того, тщательная неклиническая оценка безопасности моноклональных антител (mAb), предназначенных для терапевтического применения, является очень важной из-за увеличивающейся сложности аспектов инженерии антител и варьирования, вызванного разнообразием клеточных систем рекомбинантной продукции для получения антител. Кроме того, сложная структура, уникальные биологические функции и более

15 длительные периоды полувыведения mAb по сравнению с традиционными низкомолекулярными лекарственными средствами увеличивают внимание к безопасности, помимо опасений из-за длительного клинического применения mAb для лечения хронических заболеваний (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Kim, S.J., et al., Mol. Cells 20 (2005) 17-29).

20 Общей целью неклинических исследований в отношении mAb является определение токсикологических свойств рассматриваемого mAb и предоставление информации для разработки продукта. Главными целями неклинической оценки являются (1) идентификация органов-мишеней в отношении токсичности и определение того, является ли токсичность обратимой после лечения, (2) идентификация безопасной исходной дозы

25 для человеческих клинических испытаний Фазы I и последующих схем повышения дозы, (3) предоставление информации для отслеживания параметров безопасности в клинических испытаниях и (4) предоставление данных по безопасности для поддержки заявленного на этикетке продукта. Для достижения данных целей проводятся неклинические исследования как *in vitro*, так и *in vivo*, нацеленные на определение и

30 понимание фармакологических свойств антитела (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Cavagnaro, J.A., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.) "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals"; Hoboken, NJ: Wiley 2008; 45-65).

Для успешной неклинической оценки безопасности mAb следует выбирать самые релевантные виды животных для тестирования токсичности (Lynch, C.M., et al., mAbs

35 1 (2009) 2-11; Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126). Релевантным видом является вид, у которого антитело является фармакологически активным, должен присутствовать или экспрессироваться антиген-мишень, и профиль тканевой перекрестной реактивности должен быть аналогичным человеческому (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126;

40 Subramanyam, M. and Mertsching, E., In: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205; Hall, W.C., et al., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Посредством применения иммунохимических или функциональных анализов может быть идентифицирован релевантный вид животных, у которого экспрессируется

45 желательный эпитоп, и который демонстрирует профиль тканевой перекрестной реактивности, аналогичный человеческим тканям (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., et al., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Исследования перекрестной реактивности у видов,

которые являются полезными в данном процессе, включают иммуногистохимический обзор тканей от разных видов с использованием имеющихся в продаже многовидовых тканевых микрочипов (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., et al., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). В качестве альтернативы, оценка связывания антител с клетками от данных животных посредством сортировки флюоресцентно-активированных клеток (FACS) типично является более чувствительной, чем иммуногистохимический анализ срезов тканей (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. and Mertsching, E., In: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205). Следует сравнить последовательности ДНК и аминокислот антигена-мишени среди видов; следует определить гомологию между видами (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. and Mertsching, E., In: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205).

Кроме того, биораспределение, функция и структура антигена должны быть сравнимыми между релевантными видами животных и человеком для обеспечения оценки токсичности, возникающей из-за связывания антитела с антигеном-мишенью, которую называют токсичностью на мишени (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; 19,20). Кроме того, сильные сходства в тканевом распределении антигена-мишени у видов животных и человека делают более вероятным то, что органы-мишени токсичности, идентифицированные у животных, будут прогнозировать потенциальные токсичности у человека. Отсутствие сходства в тканевом распределении антигена между видом животного и человеком не полностью исключает применение данного вида животного для исследований токсичности, но данные различия должны приниматься во внимание для оценки риска у человека. В том, что касается плотности или аффинности антигена, абсолютная эквивалентность между животной моделью и человеком аналогичным образом не требуется. Обоснование релевантности выбранного вида для тестирования токсичности должно быть включено в документ для подачи в регулирующий орган. При использовании только одного вида для оценки безопасности оправданием служит краткое изложение экспериментов, которые демонстрируют отсутствие дополнительных релевантных видов (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11).

Если моноклональное антитело, предназначенное для терапевтического применения, не имеет перекрестной реактивности с видом животных, должно использоваться либо имитирующее антитело, либо другой вид в качестве модели. Таким образом, имитирующие антитела являются потенциальным решением в отношении возможного ограниченного тестирования безопасности с гуманизированными моноклональными антителами с ограниченной видовой перекрестной реактивностью. Однако в настоящее время нет определенных критериев, по которым следовало бы судить о потенциальном имитирующем антителе до его применения в определении вопросов безопасности в отношении клинического агента (Regulatory Toxicology and Pharmacology Volume 40, Issue 3, December 2004, Pages 219-226).

Таким образом, для идентификации животной модели для конкретного mAb следует принять во внимание приведенные выше соображения. Тем не менее необходимо, чтобы рассматриваемое mAb имело перекрестную реактивность с антигеном-мишенью тестируемого вида. В противном случае даже самые подходящие тестируемые виды не могут использоваться. Следовательно, имеется потребность в mAb, которые не имеют внутривидовой перекрестной реактивности, но имеют межвидовую перекрестную реактивность в отношении его мишени у человека и у вида, предназначенного для неклинических испытаний.

В EP 2708560 описывается антитело, специфично распознающее трансферриновый рецептор. В FR 2953841 описываются антитела против трансферринового рецептора и их применения для иммунотерапии железозависимых опухолей. В US 2009/162359 описываются двухвалентные биспецифичные антитела.

5 Краткое изложение сущности изобретения

Обнаружили то, что антитела против трансферринового рецептора, как описано в данном документе, можно использовать в качестве челночного модуля гематоэнцефалического барьера для доставки мозгового эффекторного соединения через гематоэнцефалический барьер в мозг. В некоторых воплощениях челночный
 10 модуль гематоэнцефалического барьера представляет собой одновалентное связывающее соединение, которое специфично связывается с трансферриновым рецептором. Антитела против трансферринового рецептора, как описано в данном документе, при использовании в качестве челночного модуля гематоэнцефалического барьера, являются полезными, например, для диагностики или лечения неврологических расстройств,
 15 таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера с сопутствующей болезнью Паркинсона.

В данном документе описываются антитела против трансферринового рецептора, которые специфично связываются с человеческим трансферриновым рецептором (huTfR) и трансферриновым рецептором яванского макака (cyTfR). В некоторых воплощениях
 20 антитело против трансферринового рецептора

- связывается с человеческим трансферриновым рецептором (huTfR) и трансферриновым рецептором яванского макака (cyTfR);
- имеет скорость диссоциации в отношении человеческого трансферринового рецептора, которая равна или меньше, чем (т.е. самое большее равна) скорости
 25 диссоциации антитела против трансферринового рецептора 128.1 в отношении трансферринового рецептора яванского макака, при этом скорости диссоциации определяются поверхностным плазменным резонансом, и при этом антитело против трансферринового рецептора 128.1 имеет вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 64 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 65;
- 30 - связывается со скоростью диссоциации в отношении человеческого трансферринового рецептора, которая составляет от 0,1 1/с до 0,005 1/с включительно.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является антитело против трансферринового рецептора, которое специфично связывается с человеческим трансферриновым рецептором и трансферриновым рецептором яванского макака,
 35 которое содержит:

- i) гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи, полученный из вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 01, и
- ii) гуманизированный вариабельный домен легкой цепи, полученный из вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO 26,
- 40 где данное антитело имеет скорость диссоциации в отношении человеческого трансферринового рецептора, которая равна или меньше, чем (т.е. самое большее равна) скорости диссоциации антитела против трансферринового рецептора 128.1 в отношении трансферринового рецептора яванского макака,
- при этом скорости диссоциации определяются поверхностным плазменным резонансом, и при этом антитело против трансферринового рецептора 128.1 имеет вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 64 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 65.

В одном воплощении скорость диссоциации в отношении человеческого

трансферринового рецептора составляет от 0,1 1/с до 0,005 1/с включительно.

В одном воплощении антитело имеет в положении 80 переменного домена легкой цепи аминокислотный остаток пролина (P) (нумерация согласно Kabat).

В одном воплощении антитело имеет в положении 91 переменного домена легкой цепи аминокислотный остаток аспарагина (N) (нумерация согласно Kabat).

В одном воплощении антитело имеет в положении 93 переменного домена легкой цепи аминокислотный остаток аланина (A) (нумерация согласно Kabat).

В одном воплощении антитело имеет в положении 100g переменного домена тяжелой цепи аминокислотный остаток серина (S) (нумерация согласно Kabat).

В одном воплощении антитело имеет в положении 100g переменного домена тяжелой цепи аминокислотный остаток глутамина (Q) (нумерация согласно Kabat).

В одном воплощении антитело имеет в положении 65 переменного домена тяжелой цепи аминокислотный остаток серина (S) (нумерация согласно Kabat).

В одном воплощении антитело имеет в положении 105 переменного домена тяжелой цепи аминокислотный остаток глутамина (Q) (нумерация согласно Kabat).

В одном воплощении антитело имеет в положении 80 переменного домена легкой цепи аминокислотный остаток пролина (P), в положении 91 переменного домена легкой цепи аминокислотный остаток аспарагина (N), в положении 93 переменного домена легкой цепи аминокислотный остаток аланина (A), в положении 100g переменного домена тяжелой цепи аминокислотный остаток серина (S), в положении 65 переменного домена тяжелой цепи аминокислотный остаток серина (S) и в положении 105 переменного домена тяжелой цепи аминокислотный остаток глутамина (Q) (нумерация согласно Kabat).

В одном воплощении антитело имеет в положении 80 переменного домена легкой цепи аминокислотный остаток пролина (P), в положении 91 переменного домена легкой цепи аминокислотный остаток аспарагина (N), в положении 93 переменного домена легкой цепи аминокислотный остаток аланина (A), в положении 100g переменного домена тяжелой цепи аминокислотный остаток глутамина (Q), в положении 65 переменного домена тяжелой цепи аминокислотный остаток серина (S) и в положении 105 переменного домена тяжелой цепи аминокислотный остаток глутамина (Q) (нумерация согласно Kabat).

Одним аспектом, как описано в данном документе, является антитело против трансферринового рецептора, содержащее: (а) HVR-H1 (гиперпеременная область 1 тяжелой цепи), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 66; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 68; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 71, 72 или 73; (г) HVR-L1 (гиперпеременная область 1 легкой цепи), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 75; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 76; и (е) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 78.

В одном предпочтительном воплощении антитело против трансферринового рецептора содержит (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 66; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 68; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 72; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 75; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 76; и (е) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 78.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является антитело против

трансферринового рецептора, которое специфично связывается с человеческим трансферриновым рецептором (huTfR), содержащее:

i) последовательность варибельного домена тяжелой цепи (VH), имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 24, и

ii) варибельный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 37,

где данное антитело имеет примерно такую же скорость диссоциации, что и антитело, содержащее варибельный домен тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO 24 и варибельный домен легкой цепи (VL) последовательности SEQ ID NO 37.

В одном воплощении скорость диссоциации в отношении человеческого трансферринового рецептора составляет от 0,1 1/с до 0,005 1/с включительно.

Одним предпочтительным аспектом, как описано в данном документе, является антитело против трансферринового рецептора, которое специфично связывается с человеческим трансферриновым рецептором (huTfR), содержащее:

i) последовательность варибельного домена тяжелой цепи (VH), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 24, и

ii) варибельный домен легкой цепи (VL), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 37.

В одном воплощении всех аспектов данное антитело представляет собой мультиспецифичное антитело, имеющее по меньшей мере одну специфичность связывания в отношении трансферринового рецептора и по меньшей мере одну специфичность связывания в отношении терапевтической мишени. В одном воплощении антитело содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с трансферриновым рецептором, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с мозговым антигеном. В другом воплощении мозговой антиген выбран из группы, состоящей из человеческого Абета, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), человеческого рецептора 2 эпидермального фактора роста (HER2), человеческого альфа-синуклеина, человеческого тау, который фосфорилирован на остатке тирозина или серина, человеческого CD20, белка-предшественника амилоида (APP) и человеческой глюкоцереброзидазы. В одном предпочтительном воплощении данное мультиспецифичное антитело связывается с обоими из следующих:

i) трансферриновый рецептор и Абета, или

ii) трансферриновый рецептор и CD20, или

iii) трансферриновый рецептор и альфа-синуклеин, или

iv) трансферриновый рецептор и фосфо-тау, или

v) трансферриновый рецептор и HER2, или

vi) трансферриновый рецептор и глюкоцереброзидаза.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 81 и варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO 82 сайта связывания в отношении человеческого Абета.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания

в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 79 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 80 сайта связывания в отношении человеческого CD20. В одном воплощении переменная область тяжелой цепи содержит замену аминокислотного остатка в
 5 положении 11 по Kabat на любую аминокислоту, но не лейцин. В одном воплощении данная замена включает замену аминокислотного остатка в положении 11 по Kabat на неполярную аминокислоту. В одном предпочтительном воплощении данная замена включает замену аминокислотного остатка в положении 11 по Kabat в переменном домене тяжелой цепи SEQ ID NO 79 на аминокислотный остаток, выбранный из группы,
 10 состоящей из валина, лейцина, изолейцина, серина и фенилаланина.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару переменного
 15 домена тяжелой цепи SEQ ID NO 83 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 84 сайта связывания в отношении человеческого альфа-синуклеина.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания
 20 в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару гуманизированного переменного домена тяжелой цепи, полученного из SEQ ID NO 85, и гуманизированного переменного домена легкой цепи, полученного из SEQ ID NO 86, сайта связывания в отношении человеческого альфа-синуклеина.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару
 25 гуманизированного переменного домена тяжелой цепи, полученного из SEQ ID NO 87, и гуманизированного переменного домена легкой цепи, полученного из SEQ ID NO 88, сайта связывания в отношении человеческого альфа-синуклеина.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару
 35 гуманизированного переменного домена тяжелой цепи, полученного из SEQ ID NO 89, и гуманизированного переменного домена легкой цепи, полученного из SEQ ID NO 90, сайта связывания в отношении человеческого альфа-синуклеина.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару
 40 гуманизированного переменного домена тяжелой цепи, происходящего из SEQ ID NO 91, и гуманизированного переменного домена легкой цепи, происходящего из SEQ ID NO 92, сайта связывания в отношении человеческого альфа-синуклеина.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару

гуманизированного переменного домена тяжелой цепи, происходящего из SEQ ID NO 93, и гуманизированного переменного домена легкой цепи, происходящего из SEQ ID NO 94, сайта связывания в отношении человеческого альфа-синуклеина.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и сайт связывания в отношении i) глюкоцереброзидазы, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO 97, или ii) функционального варианта SEQ ID NO 97, имеющего по меньшей мере 70%-ную идентичность последовательности, или iii) функционального варианта SEQ ID NO 97, имеющего одну или более чем одну мутацию, делецию или вставку аминокислоты, или iv) усеченного функционального варианта SEQ ID NO 97, имеющего по меньшей мере один аминокислотный остаток на N-конце или C-конце или в пределах удаленной аминокислотной последовательности, или v) комбинацию iii) и iv).

В одном воплощении всех аспектов данное антитело содержит

i) гомодимерную область Fc человеческого подкласса IgG1, возможно с мутациями P329G, L234A и L235A или

ii) гомодимерную область Fc человеческого подкласса IgG4, возможно с мутациями P329G, S228P и L235E или

iii) гетеродимерную область Fc, в которой

а) один полипептид области Fc содержит мутацию T366W, и другой полипептид области Fc содержит мутации T366S, L368A и Y407V или

б) один полипептид области Fc содержит мутации T366W и Y349C, и другой полипептид области Fc содержит мутации T366S, L368A, Y407V и S354C, или

в) один полипептид области Fc содержит мутации T366W и S354C, и другой полипептид области Fc содержит мутации T366S, L368A, Y407V и Y349C,

или

iv) гетеродимерную область Fc человеческого подкласса IgG4, в которой оба полипептида области Fc содержат мутации P329G, L234A и L235A, и

а) один полипептид области Fc содержит мутацию T366W, и другой полипептид области Fc содержит мутации T366S, L368A и Y407V или

б) один полипептид области Fc содержит мутации T366W и Y349C, и другой полипептид области Fc содержит мутации T366S, L368A, Y407V и S354C, или

в) один полипептид области Fc содержит мутации T366W и S354C, и другой полипептид области Fc содержит мутации T366S, L368A, Y407V и Y349C,

или

v) гетеродимерную область Fc человеческого подкласса IgG4, в которой оба полипептида области Fc содержат мутации P329G, S228P и L235E, и

а) один полипептид области Fc содержит мутацию T366W, и другой полипептид области Fc содержит мутации T366S, L368A и Y407V или

б) один полипептид области Fc содержит мутации T366W и Y349C, и другой полипептид области Fc содержит мутации T366S, L368A, Y407V и S354C, или

в) один полипептид области Fc содержит мутации T366W и S354C, и другой полипептид области Fc содержит мутации T366S, L368A, Y407V и Y349C.

В одном воплощении всех аспектов антитело представляет собой CrossMab.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является антитело против трансферринового рецептора, содержащее:

i) переменный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID

NO 52, 53, 54, 55, 56, 57 и 58, и вариабельный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO 60, 61, 62 и 63,

или

- ii) вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25, и вариабельный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 и 47.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является фармацевтический препарат, содержащий антитело, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является антитело, как описано в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является применение антитела, как описано в данном документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения неврологического расстройства.

В одном воплощении неврологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства, связанного с глазным заболеванием, конвульсивного расстройства, лизосомальной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, поведенческого расстройства, воспаления ЦНС, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, рассеянного склероза, CD20-позитивного рака с метастазами в мозг и Her2-позитивного рака с метастазами в мозг.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является применение антитела, как описано в данном документе, в изготовлении лекарственного средства для транспортировки одного или более чем одного соединения через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

Описание графических материалов

Фиг. 1: схема анализа транцитоза.

Фиг. 2: скорости диссоциации разных антител против трансферринового рецептора, определенные при 25°C с использованием BIAcore; 1: 128.1; 2: 128.1, слитое с антителом mAb86 против pTau; 3: 567; 4: 932; 5: 567, слитое с антителом mAb86 против pTau; 6: 1026; 7: 1027; квадраты: связывание с трансферриновым рецептором яванского макака; круг: связывание с человеческим трансферриновым рецептором; ордината: скорость диссоциации [1/c].

Фиг. 3: скорости диссоциации разных антител против трансферринового рецептора, определенные при 37°C с использованием BIAcore; 1: 128.1; 2: 932; 3: 1026; 4: 1027; квадраты: связывание с трансферриновым рецептором яванского макака; круг: связывание с человеческим трансферриновым рецептором; ордината: скорость диссоциации [1/c].

Подробное описание воплощений изобретения

В данном документе описан гуманизированный вариант кроличьего антитела 299, демонстрирующий сильный транцитоз в анализе транцитоза согласно Примеру 8, который имеет перекрестную реактивность в отношении трансферринового рецептора человека и яванского макака, т.е. специфично связывается с обоими ортологами трансферринового рецептора, который демонстрирует хорошее окрашивание клеток, и который имеет аналогичный период полувыведения (отражаемый скоростью диссоциации), что и мышинное антитело 128.1 в отношении трансферринового рецептора яванского макака и трансферринового рецептора человека.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является гуманизированное антитело, которое специфично связывается с трансферриновым рецептором человека, где данное антитело содержит:

в вариабельном домене тяжелой цепи HVR (гипервариабельная область) SEQ ID NO 66, 68 и 72,

и

в вариабельном домене легкой цепи HVR SEQ ID NO 75, 76 и 78.

В одном воплощении гуманизированное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 37.

В одном воплощении у гуманизированного антитела исключена эффекторная функция.

В одном воплощении гуманизированное антитело специфично связывается с трансферриновым рецептором человека и с трансферриновым рецептором яванского макака.

В одном воплощении гуманизированное антитело представляет собой:

а) полноразмерное антитело человеческого подкласса IgG1 или

б) полноразмерное антитело человеческого подкласса IgG4, или

в) полноразмерное антитело человеческого подкласса IgG1 с мутациями L234A, L235A и P329G,

г) полноразмерное антитело человеческого подкласса IgG4 с мутациями S228P, L235E и, возможно, P329G,

д) полноразмерное антитело человеческого подкласса IgG1 с мутациями L234A, L235A и P329G в обеих тяжелых цепях, и с мутациями T366W и S354C в одной тяжелой цепи и мутациями T366S, L368A, Y407V и Y349C в соответствующей другой тяжелой цепи, или

е) полноразмерное антитело человеческого подкласса IgG4 с мутациями S228P, L235E и, возможно, P329G в обеих тяжелых цепях, и с мутациями T366W и S354C в одной тяжелой цепи и мутациями T366S, L368A, Y407V и Y349C в соответствующей другой тяжелой цепи.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является биспецифичное антитело, содержащее:

i) первый сайт связывания, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 37,

и

ii) второй сайт связывания, выбранный из следующих:

а) вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 81 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 82, или

б) вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 83 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 84, или

в) вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 85 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 86, или

г) вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 87 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 88, или

д) вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 91 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 92, или

е) вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 89 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 90, или

ж) вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 93 и вариабельный домен легкой

цепи SEQ ID NO 94, или

з) вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 79 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 80.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является фармацевтический препарат, содержащий антитело, как описано в данном документе, и, возможно, фармацевтически приемлемый носитель.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является антитело, как описано в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является антитело, как описано в данном документе, для применения в лечении неврологического расстройства.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является применение антитела, как описано в данном документе, в изготовлении лекарственного средства.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является способ лечения, включающий введение антитела, как описано в данном документе, для лечения неврологического расстройства.

I. Определения

Термин «акцепторная человеческая каркасная область» для целей данного документа представляет собой каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области вариабельного домена легкой цепи (VL) или каркасной области вариабельного домена тяжелой цепи (VH), происходящую из каркасной области человеческого иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной области, как определено ниже. Акцепторная человеческая каркасная область, «происходящая из» каркасной области человеческого иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной области, может содержать такую же аминокислотную последовательность, как и они, или она может содержать изменения аминокислотной последовательности. В некоторых воплощениях число изменений аминокислот составляет 10 или меньше, 9 или меньше, 8 или меньше, 7 или меньше, 6 или меньше, 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, или 2 или меньше. В некоторых воплощениях акцепторная человеческая каркасная область VL является идентичной по последовательности последовательности каркасной области VL человеческого иммуноглобулина или последовательности человеческой консенсусной каркасной области.

Термин «аффинность» относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером связывания (например, антигеном). Если не указано иное, термин «аффинность связывания» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к собственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_d). Аффинность может быть измерена обычными способами, известными в данной области, включающими способы, описанные в данном документе. Конкретные иллюстративные и типичные воплощения для измерения аффинности связывания описываются далее.

Термин антитело «с созревшей аффинностью» относится к антителу с одним или более чем одним изменением в одной или более чем одной гипервариабельной области (HVR) по сравнению с родительским антителом, которое не обладает такими изменениями, причем такие изменения приводят к улучшению аффинности антитела в отношении антигена.

Термин «антитело» используется в данном документе в самом широком смысле и охватывает разные структуры антител, включая моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител, но не ограничиваясь ими, при условии, что они

демонстрируют желательную активность связывания антигена.

Термин «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител (например, scFv) и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител, но не ограничиваются ими.

Термин «химерное» антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из конкретного источника или вида, тогда как остальная тяжелая и/или легкая цепь происходит из другого источника или вида.

«Класс» антитела относится к типу константного домена или константной области, которым обладает его тяжелая цепь. Существуют пять главных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и несколько из них могут дополнительно подразделяться на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют разным классам иммуноглобулинов, называются α, δ, ε, γ и μ соответственно.

Термин «эффекторная функция» относится к тем биологическим активностям, приписываемым области Fc антитела, которые варьируют в зависимости от класса антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание с C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов поверхности клетки (например, рецептора В-клеток) и активацию В-клеток.

«Эффективное количество» агента, например, фармацевтического препарата, относится к эффективному количеству в необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени для достижения желательного терапевтического или профилактического результата.

Термин «область Fc» используется в данном документе для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Данный термин включает области Fc с природной последовательностью и варианты области Fc. В одном воплощении область Fc тяжелой цепи человеческого IgG простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) области Fc может присутствовать или может отсутствовать. Если в данном документе не определено иначе, нумерация аминокислотных остатков в области Fc или в константной области осуществляется согласно системе нумерации EU, также именуемой индекс EU, как описано в Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

«Каркасная область» или «FR» относится к остаткам варибельного домена, отличным от остатков гиперварибельной области (HVR). FR варибельного домена обычно состоит из четырех FR доменов: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности HVR и FR обычно появляются в VH (или VL) в следующей последовательности: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «полное антитело»

используются в данном документе взаимозаменяемо для названия антитела, имеющего по существу аналогичную структуру структуре природного антитела, или имеющего тяжелые цепи, которые содержат область Fc, как определено в данном документе.

Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев»
 5 используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформантов» и «трансформированные клетки», которые включают первичные трансформированные клетки и потомство, полученное от них, независимо от числа пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным родительской
 10 клетке по содержанию нуклеиновых кислот, но может содержать мутации. Сюда включено мутантное потомство, которое имеет такую же функцию или биологическую активность, на которую осуществляется скрининг или отбор у исходно трансформированной клетки.

«Человеческая консенсусная каркасная область» представляет собой каркасную
 15 область, которая представляет собой чаще всего встречающиеся аминокислотные остатки в наборе последовательностей каркасных областей VL или VH человеческого иммуноглобулина. В общем, набор последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина происходит из подгруппы последовательностей варибельного домена. Обычно данная подгруппа последовательностей представляет собой такую
 20 же подгруппу, что и в Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3. В одном воплощении для VL данной подгруппой является подгруппа каппа I, такая же, как и в Kabat et al., выше. В одном воплощении для VH данной подгруппой является подгруппа III, такая же, как и в Kabat et al., выше.

Термин «гуманизированное» антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из HVR, не являющихся человеческими, и аминокислотные
 25 остатки из человеческих FR. В некоторых воплощениях гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного и типично двух варибельных доменов, в которых все или по существу все из HVR (например, CDR
 30 (область, определяющая комплементарность)) соответствуют HVR антитела, не являющегося человеческим, и все или по существу все FR соответствуют FR человеческого антитела. Гуманизированное антитело возможно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящей из человеческого антитела. Термин «гуманизированная форма» антитела, например, антитела, не
 35 являющегося человеческим, относится к антителу, которое подверглось гуманизации.

Термин «гиперварибельная область» или «HVR» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к каждой из областей варибельного домена антитела, которые являются гиперварибельными по последовательности («области, определяющие комплементарность» или «CDR») и образуют структурно
 40 определенные петли («гиперварибельные петли»), и/или содержат остатки, контактирующие с антигеном («контакты с антигеном»). В общем, антитела содержат шесть HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3).

HVR в данном документе включают:

(а) гиперварибельные петли, находящиеся в аминокислотных остатках 26-32 (L1),
 45 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917);

(б) CDR, находящиеся в аминокислотных остатках 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological

Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242);

(в) контакты с антигеном, находящиеся в аминокислотных остатках 27с-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); и

(г) комбинации (а), (б) и/или (в), включающие аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

Если не указано иное, остатки HVR и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки FR) нумеруются в данном документе согласно Kabat et al., выше.

«Индивид» или «субъект» представляет собой млекопитающее. Млекопитающие включают домашних животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, человека и приматов, не являющихся человеком, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс), но не ограничиваются ими. В некоторых воплощениях индивид или субъект представляет собой человека.

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было отделено от компонента его природного окружения. В некоторых воплощениях антитело очищают до чистоты, большей, чем 95% или 99% при определении, например, электрофоретическими (например, SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия), изоэлектрофокусировка (IEF), капиллярный электрофорез) или хроматографическими (например, ионообменная ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) или ВЭЖХ с обращенной фазой) способами. Относительно обзора способов оценки чистоты антител, см., например, Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87.

Термин «выделенная» нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонента ее природного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат данную молекулу нуклеиновой кислоты, но данная молекула нуклеиновой кислоты присутствует внехромосомно или в участке хромосомы, который отличается от ее природного хромосомного участка.

Термин «моноклональное антитело» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными и/или связываются с тем же самым эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, например, содержащих встречающиеся в природе мутации или возникающих во время получения препарата моноклонального антитела, причем такие варианты обычно присутствуют в минорных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые типично включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело препарата моноклональных антител направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, модификатор «моноклональный» указывает на характер антитела как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующий продукции антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, подлежащие применению согласно настоящему изобретению, можно получать целым рядом методик, включающих способ гибридомы, способы генной инженерии, способы фагового дисплея и способы с использованием трансгенных животных, содержащих все локусы человеческого иммуноглобулина или их часть, но не ограничивающихся ими, причем такие способы и другие типичные

способы для получения моноклональных антител описываются в данном документе.

Термин «природные антитела» относится к встречающимся в природе молекулам иммуноглобулинов с варьирующими структурами. Например, природные антитела IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Дальтон, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, которые связаны дисульфидными связями. От N- до C-конца каждая тяжелая цепь имеет вариабельную область (VH), также именуемую вариабельный тяжелый домен или вариабельный домен тяжелой цепи, с последующими тремя константными доменами (CH1, CH2 и CH3). Аналогичным образом, от N- до C-конца каждая легкая цепь имеет вариабельную область (VL), также именуемую вариабельный легкий домен или вариабельный домен легкой цепи, с последующим константным легким доменом (CL). Легкая цепь антитела может быть приписана к одному из двух типов, именуемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности ее константного домена.

Термин «листок-вкладыш в упаковке» используется для названия инструкций, традиционно включаемых в имеющиеся в продаже упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях, касающихся применения таких терапевтических продуктов.

«Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» по отношению к контрольной последовательности полипептида определяется как процентная доля аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые являются идентичными аминокислотным остаткам в контрольной последовательности полипептида, после выравнивания данных последовательностей и, если необходимо, введения пробелов для достижения максимального процента идентичности последовательности, и не рассматривая любые консервативные замены как часть идентичности последовательности. Выравнивание для целей определения процента идентичности аминокислотной последовательности может достигаться разными способами, которые находятся в пределах квалификации в данной области, например, с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Для целей данного документа, однако, значения % идентичности аминокислотной последовательности получаются с использованием компьютерной программы сравнения последовательностей ALIGN-2. Авторство компьютерной программы сравнения последовательностей ALIGN-2 принадлежит Genentech, Inc., и исходный код с пользовательской документацией был подан в Бюро регистрации авторских прав США, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под регистрационным № авторского права США TXU510087. Программа ALIGN-2 является общедоступной от Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния, или может быть составлена из исходного кода. Программу ALIGN-2 следует составлять для применения в операционной системе UNIX, включая цифровую UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей устанавливаются программой ALIGN-2 и не варьируют.

В ситуациях, когда ALIGN-2 применяется для сравнений аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотной последовательности данной аминокислотной последовательности А с или относительно данной аминокислотной

последовательности Б (что может быть альтернативно сформулировано как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности с или относительно данной аминокислотной последовательности Б) рассчитывается следующим образом:

100 умножить на долю X/Y

где X представляет собой число аминокислотных остатков, подсчитанных как идентичные совпадения, посредством программы выравнивания последовательностей ALIGN-2 в выравнивании А и Б данной программой, и где Y представляет собой общее число аминокислотных остатков в Б. Будет понятно то, что когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности Б, % идентичности аминокислотной последовательности А с Б не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности Б с А. Если конкретно не утверждается иное, все значения % идентичности аминокислотной последовательности, используемые в данном документе, как описано в непосредственно предшествующем абзаце, получены с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

Термин «фармацевтический препарат» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечивать эффективную биологическую активность содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому вводился бы препарат.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтическом препарате, отличному от активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант, но не ограничивается ими.

Термин «лечение» (и его грамматические вариации, такие как «лечить» или «осуществление лечения») в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к клиническому вмешательству в попытке изменить природный ход индивида, которого лечат, и оно может осуществляться либо для профилактики, либо по ходу клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают предупреждение появления или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или опосредованных патологических последствий заболевания, предупреждение метастазов, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или улучшенный прогноз, но не ограничиваются ими. В некоторых воплощениях антитела по изобретению используются для задержки развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) природного антитела обычно имеют аналогичные структуры, причем каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три гипервариабельные области (HVR). (См., например, Kindt, T.J., et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), страница 91). Один домен VH или VL может быть достаточным для придания специфичности связывания с антигеном. Кроме того, антитела, которые связываются с конкретным антигеном, могут быть выделены с использованием домена VH или VL из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH соответственно. См., например, Portolano, S. et al., *J. Immunol.* 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., *Nature* 352 (1991) 624-628). Нумерация

аминокислотных остатков в вариабельной области (вариабельной области легкой цепи и тяжелой цепи) будет осуществляться согласно Kabat (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3).

Термин «вектор» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножить другую нуклеиновую кислоту, с которой он связан. Данный термин включает вектор в качестве структуры самореплицирующейся нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Определенные векторы способны управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они связаны функциональным образом. Такие векторы называются в данном документе «экспрессионными векторами».

Термин «гематоэнцефалический барьер» (ГЭБ) обозначает физиологический барьер между периферическим кровообращением и мозгом и спинным мозгом, который образуется посредством плотных контактов в пределах плазматических мембран эндотелия капилляров мозга, создающих плотный барьер, который ограничивает транспорт молекул в мозг, даже очень маленьких молекул, таких как мочевины (60 Дальтон). ГЭБ в пределах мозга, гематоспинномозговой барьер в пределах спинного мозга и гематоретинальный барьер в пределах сетчатки представляют собой смежные капиллярные барьеры в пределах ЦНС, и в данном документе они совокупно называются гематоэнцефалический барьер или ГЭБ. ГЭБ также охватывает барьер между кровью и ЦСЖ (цереброспинальная жидкость) (хориоидное сплетение), где данный барьер состоит из эпендимных клеток, а не из эндотелиальных клеток капилляров.

Термин «центральная нервная система» (ЦНС) обозначает комплекс нервных тканей, который контролирует функции организма, и включает мозг и спинной мозг.

Термин «рецептор гематоэнцефалического барьера» (РГЭБ) обозначает внеклеточный мембраносвязанный рецепторный белок, экспрессируемый на эндотелиальных клетках мозга, который способен транспортировать молекулы через ГЭБ или использоваться для транспорта экзогенно введенных молекул. Примеры РГЭБ включают рецептор трансферрина (TfR), рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-R), рецепторы липопротеинов низкой плотности, включающие, без ограничения, белок 1, родственник рецептору липопротеинов низкой плотности (LRP1), белок 8, родственник рецептору липопротеинов низкой плотности (LRP8), и гепаринсвязывающий фактор роста, подобный эпидермальному фактору роста (HB-EGF), но не ограничиваются ими. Типичный РГЭБ представляет собой трансферриновый рецептор (TfR).

Термин «мозговое эффекторное соединение» обозначает молекулу, которая подлежит транспортировке в мозг через ГЭБ. Данное эффекторное соединение типично имеет характерную терапевтическую активность, которую желательно доставлять в мозг. Эффекторные соединения включают лекарственные средства против неврологических расстройств и цитотоксические агенты, такие как, например, полипептиды и антитела, в частности, моноклональные антитела или их фрагменты, направленные на мозговую мишень.

Термин «одновалентное связывающее соединение» обозначает молекулу, способную специфично связываться в режиме одновалентного связывания с РГЭБ. Гематоэнцефалический челночный модуль и/или конъюгат, как описано в данном документе, характеризуются присутствием одной единицы одновалентного связывающего соединения, т.е. гематоэнцефалический челночный модуль и/или конъюгат

по настоящему изобретению содержит точно одну единицу одновалентного связывающего соединения. Одновалентное связывающее соединение включает полипептиды, полноразмерные антитела, фрагменты антител, включающие фрагменты Fab, Fab', Fv, молекулы одноцепочечных антител, такие как, например, одноцепочечные Fab, scFv, но не ограничивается ими. Одновалентное связывающее соединение, например, может представлять собой каркасный белок, сконструированный с использованием технологий современного уровня техники, подобных фаговому дисплею или иммунизации. Одновалентное связывающее соединение также может представлять собой полипептид. В некоторых воплощениях одновалентное связывающее соединение содержит домен Ig CH2-CH3 и одноцепочечный Fab (scFab), направленный на рецептор гематоэнцефалического барьера. scFab связан с С-концевым концом домена Ig CH2-CH3 посредством линкера. В некоторых воплощениях scFab направлен на трансферриновый рецептор.

Термин «режим одновалентного связывания» обозначает специфичное связывание с РГЭБ, где взаимодействие между одновалентным связывающим соединением и РГЭБ происходит через один одиночный эпитоп. Режим одновалентного связывания предотвращает любую димеризацию/мультимеризацию РГЭБ из-за одной точки взаимодействия с эпитопом. Режим одновалентного связывания предотвращает то, что изменяется внутриклеточная сортировка РГЭБ.

Термин «эпитоп» обозначает любую полипептидную детерминанту, способную к специфичному связыванию с антителом. В некоторых воплощениях эпитопные детерминанты включают химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорил или сульфонил, и, в некоторых воплощениях, могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп представляет собой область антигена, с которой связывается антитело.

«Рецептор трансферрина» (TfR) представляет собой трансмембранный гликопротеин (с молекулярной массой примерно 180000 Да), который состоит из двух связанных дисульфидной связью субъединиц (каждая с кажущейся молекулярной массой примерно 90000 Да), и он участвует в поглощении железа у позвоночных. В одном воплощении TfR в данном документе представляет собой человеческий TfR, содержащий аминокислотную последовательность, как описано в Schneider et al. (Nature 311 (1984) 675-678).

Термин «визуализирующий агент» обозначает соединение, которое имеет одно или более чем одно свойство, которое обеспечивает выявление его присутствия и/или локализации прямо или опосредованно. Примеры таких визуализирующих агентов включают белки и низкомолекулярные соединения, включающие меченое соединение, которое обеспечивает выявление.

Термины «антиген ЦНС» и «мозговая мишень» обозначают антиген и/или молекулу, экспрессируемую в ЦНС, включая мозг, которые могут служить в качестве мишени для антитела или маленькой молекулы. Примеры такого антигена и/или молекулы включают, без ограничения: бета-секретазу 1 (BACE1), амилоид бета (Абета), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), человеческий рецептор 2 эпидермального фактора роста (HER2), Тау, аполипопротеин Е4 (АроЕ4), альфа-синуклеин, CD20, хантингтин, прионный белок (PrP), киназу 2 с повторами, обогащенными лейцином (LRRK2), паркин, пресенилин 1, пресенилин 2, гамма-секретазу, рецептор смерти 6 (DR6), белок-предшественник амилоида (APP), рецептор нейротрофина (p75NTR), глюкоцереброзидазу и каспазу 6.

Термин «который специфично связывается» обозначает антитело, селективно или предпочтительно связывающееся с антигеном. Аффинность связывания обычно определяется с использованием стандартного анализа, такого как анализ Скэтчарда или методика поверхностного плазменного резонанса (например, с использованием

5 BIACORE®).

Термин «соединение CH2-CH3 Ig» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к белковому соединению, происходящему из доменов CH2 или CH3 иммуноглобулина. «Соединение CH2-CH3 Ig» содержит два полипептида «CH2-CH3», образующих димер. Данный иммуноглобулин может представлять собой IgG, IgA, IgD, IgE или IgM. В одном воплощении соединение CH2-CH3 Ig было получено из иммуноглобулина IgG и называется в данном документе «соединение CH2-CH3 IgG». Данный термин включает природную последовательность доменов CH2-CH3 и варианты доменов CH2-CH3. В одном воплощении «соединение CH2-CH3 Ig» происходит из домена CH2-CH3 тяжелой цепи человеческого IgG, который простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако С-концевой лизин (Lys447) области Fc может присутствовать или может не присутствовать. Если в данном документе не определено иначе, нумерация аминокислотных остатков в области домена CH2-CH3 или константной области осуществляется согласно системе нумерации EU, также именуемой индекс EU, как описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

«Конъюгат» представляет собой слитый белок по настоящему изобретению, конъюгированный с одной или более чем одной гетерологичной молекулой, включающей метку, лекарственное средство против неврологического расстройства или цитотоксический агент, но не ограничивающейся ими.

Термин «линкер» обозначает химический линкер или одноцепочечный пептидный линкер, который ковалентно связывает разные соединения челночного модуля гематоэнцефалического барьера и/или слитый полипептид, и/или конъюгат, как описано в данном документе. Линкер, например, соединяет мозговое эффекторное соединение с одновалентным связывающим соединением. Например, если одновалентное связывающее соединение содержит соединение CH2-CH3 Ig и scFab, направленный на рецептор гематоэнцефалического барьера, тогда линкер конъюгирует scFab с С-концевым концом соединения CH2-CH3 Ig. Линкер, конъюгирующий мозговое эффекторное соединение с одновалентным связывающим соединением (первый линкер), и линкер, соединяющий scFab с С-концевым концом домена CH2-CH3 Ig (второй линкер), могут быть одинаковыми или разными.

Можно использовать одноцепочечные пептидные линкеры, содержащие от одного до двадцати аминокислотных остатков, связанных пептидными связями. В некоторых воплощениях аминокислоты выбраны из двадцати встречающихся в природе аминокислот. В некоторых других воплощениях одна или более чем одна аминокислота выбрана из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. В других воплощениях линкер представляет собой химический линкер. В некоторых воплощениях линкер представляет собой одноцепочечный пептидный линкер с аминокислотной последовательностью с длиной по меньшей мере 25 аминокислотных остатков, в одном предпочтительном воплощении - с длиной от 32 до 50 аминокислотных остатков. В одном воплощении пептидный линкер представляет собой линкер (GxS)_n с G - глицином, S - серином, (x равен 3, n равен 8, 9 или 10) или (x равен 4, n равен 6, 7 или 8), в одном воплощении с x, равным 4, n, равным 6 или 7, в одном предпочтительном воплощении

с х, равным 4, n, равным 7. В одном воплощении линкер представляет собой (G4S)₄ (SEQ ID NO 95). В одном воплощении линкер представляет собой (G4S)₆G2 (SEQ ID NO 96).

Конъюгирование может проводиться с использованием целого ряда химических линкеров. Например, одновалентное связывающее соединение или слитый полипептид и мозговое эффекторное соединение могут быть конъюгированы с использованием целого ряда бифункциональных белковых связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональных производных имидоэфиров (таких как диметиладипимидат HCl), активных сложных эфиров (таких как дисукцинимидилсуберат), альдегидов (таких как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазониябензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Линкер может представлять собой «расщепляемый линкер», облегчающий высвобождение эффекторного соединения при доставке в мозг. Например, могут использоваться кислотолабильный линкер, пептидазочувствительный линкер, фотолабильный линкер, диметильный линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., Cancer Res. 52 (1992) 127-131; US 5208020).

Ковалентное конъюгирование может быть либо непосредственным, либо через линкер. В некоторых воплощениях непосредственное конъюгирование осуществляется путем конструирования полипептидного слияния (т.е. посредством генетического слияния двух генов, кодирующих одновалентное связывающее соединение в отношении РГЭБ и эффекторное соединение, и экспрессируемого в виде одного полипептида (полипептидной цепи)). В некоторых воплощениях непосредственное конъюгирование осуществляется путем образования ковалентной связи между реакционноспособной группой на одной из двух частей одновалентного связывающего соединения в отношении РГЭБ и соответствующей группой или акцептором на мозговом эффекторном соединении. В некоторых воплощениях непосредственное конъюгирование осуществляется путем модификации (т.е. генетической модификации) одной из двух молекул, подлежащих конъюгированию, для включения реакционноспособной группы (в качестве неограничивающих примеров сульфгидрильной группы или карбоксильной группы), которая образует ковалентное присоединение к другой молекуле, подлежащей конъюгированию при подходящих условиях. В качестве одного неограничивающего примера молекула (т.е. аминокислота) с желательной реакционноспособной группой (т.е. остатком цистеина) может быть введена, например, в одновалентное связывающее соединение к антителу против РГЭБ, и дисульфидная связь образуется с неврологическим лекарственным средством. Способы ковалентного конъюгирования нуклеиновых кислот с белками также известны в данной области (т.е. фотопоперечное связывание, см., например, Zatsepin et al. Russ. Chem. Rev. 74 (2005) 77-95). Конъюгирование также может осуществляться с использованием целого ряда линкеров. Например, одновалентное связывающее соединение и эффекторное соединение могут быть конъюгированы с использованием целого ряда бифункциональных белковых связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)

гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-дiazониябензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные фторные соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Также могут использоваться пептидные линкеры, содержащие от одного до двадцати аминокислотных остатков, связанных пепидными связями. В некоторых таких воплощениях аминокислотные остатки выбраны из двадцати встречающихся в природе аминокислот. В некоторых других таких воплощениях один или более чем один аминокислотный остаток выбран из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. Линкер может представлять собой «расщепляемый линкер», облегчающий высвобождение эффекторного соединения при доставке в мозг. Например, могут использоваться кислотолabile линкер, пептидазочувствительный линкер, фотолabile линкер, диметильный линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al, Cancer Res. 52 (1992) 127-131; US 5208020).

II. Композиции и способы

Для описания молекулярных взаимодействий обычно используются равновесные константы диссоциации (K_D). Она используется как мера силы взаимодействия (например, аффинности) двух молекул друг с другом. Таким образом, значение K_D представляет собой меру силы двухмолекулярного взаимодействия.

Но значение K_D , как таковое, не описывает кинетику молекулярного взаимодействия, т.е. из значения K_D нельзя вывести, с одной стороны, как быстро две молекулы связываются друг с другом (константа скорости ассоциации или «скорость ассоциации») и, с другой стороны, как быстро молекулы диссоциируют (константа скорости диссоциации или «скорость диссоциации»). Характеристика бимолекулярных взаимодействий только по их значению K_D пренебрегает тем фактом, что идентичное значение K_D может быть составлено крайне разными (разные порядки значения) скоростями ассоциации и диссоциации, так как значение K_D представляет собой их отношение.

Но скорости ассоциации и диссоциации являются важными для описания характеристик связывания молекул. Скорость диссоциации является особенно важной, так как она характеризует продолжительность связывания, например, антитела с его антигеном. Длительная скорость диссоциации коррелирует с медленной диссоциацией образовавшегося комплекса, тогда как короткая скорость диссоциации коррелирует с быстрой диссоциацией.

Для того чтобы иметь долговременное (т.е. требующее менее частого дозирования) или индивидуализированное (например, зависящее от окружающих условий) взаимодействие, скорости диссоциации должны быть определены экспериментально. Это даже более важно, так как практически невозможно прогнозировать скорость диссоциации. Кроме того, корреляция между скоростью диссоциации и аффинностью связывания является плохой, как описано выше. Например, из-за того, что значение K_D является отношением скорости ассоциации и диссоциации, даже слабые связывающие агенты могут оставаться длительно связанными с их мишенями, тогда как сильные связывающие агенты могут быстро диссоциировать.

Типичным бутылочным горлышком в проектах получения антител является ранжирование многих кандидатов, полученных после пэннинга, на основе силы связывания антитела. В идеале, такой способ будет работать без предшествующего мечения антигенов и с неочищенными бактериальными лизатами. Ylera, F., et al. (Anal.

Biochem. 441 (2013) 208-213) описали способ скрининга скорости диссоциации для отбора высокоаффинных антител против лекарственного средства неочищенных лизатов *Escherichia coli*, содержащих одновалентные фрагменты Fab. Они имеют выбранную скорость диссоциации в качестве параметра ранжирования, так как скорость диссоциации, среди других вещей, является зависимой от концентрации. Они выбрали одновалентный формат для избежания эффектов авидности во время ранжирования скорости диссоциации и определения аффинности в том виде, в котором они наблюдались бы с полноразмерным IgG. Ylera et al. обнаружили то, что клон с наилучшей скоростью диссоциации был идентифицирован посредством стадии ранжирования k_{off} , но не был идентифицирован с использованием только силы сигнала ELISA в качестве критерия селекции.

Murray, J.B., et al. (J. Med. Chem. 57 (2014) 2845-2850) описали скрининг скорости диссоциации (ORS) посредством поверхностного плазмонного резонанса в качестве эффективного способа кинетического отбора наилучших образцов для ведущего химического пространства из неочищенных продуктов реакции. Описывается то, что константа скорости диссоциации - k_d (скорость диссоциации) является компонентом связывания лиганд-белок с наиболее значимым потенциалом для увеличения эффективности соединения. Авторы действительно описывают то, что кинетическое измерение аффинности во всей программе открытия лекарственных средств является более информативным, чем равновесное определение аффинности в стационарном состоянии. Например, соединение с 10-кратно меньшей скоростью ассоциации и диссоциации не распознавалось бы как отличное при оценке посредством равновесных измерений аффинности. Кроме того, авторы обнаружили то, что данные, определенные с использованием прибора BIAcore T200, демонстрируют среднее различие k_d между неочищенными и очищенными образцами 19%, аналогичным образом, данные, определенные с использованием более старого прибора BIAcore T100, имели 15% различие. Авторы наблюдают то, что k_d отличаются в среднем только на 30% при сравнении между инструментами и во времени. Это демонстрирует то, что загрязнение следами предыдущего образца, долговременное хранение и отличающееся оборудование имеют умеренный эффект на наблюдаемые k_d . В самом деле, эти маленькие отклонения k_d близко отражают различия, наблюдаемые в исследованиях во многих лабораториях, где было описано то, что варьирование составляет от 14% до 40%, в зависимости от системы (Murray, J.B., et al., J. Med. Chem. 57 (2014) 2845-2850; Katsamba, P.S., et al., Anal. Biochem. 352 (2006) 208-221).

В WO 2014/189973 описаны антитела против трансферринового рецептора и способы их применения. Дополнительно описано то, что нацеливание на рецептор ГЭБ традиционного специфичного высокоаффинного антитела обычно приводило к ограниченному увеличению транспорта через ГЭБ. Позднее обнаружили то, что величина поглощения антитела в и распределения в ЦНС обратно связана с его аффинностью связывания в отношении рецептора ГЭБ среди исследованных антител против ГЭБ. Например, малоаффинное антитело к трансферриному рецептору (TfR), дозированное при терапевтических уровнях дозы, значительно увеличивает транспорт через ГЭБ и удержание в ЦНС антитела против TfR относительно более высокоаффинного антитела против TfR и делает возможным более легкое достижение терапевтических концентраций в ЦНС (Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43). Доказательства такого транспорта через ГЭБ добивались с использованием биспецифичного антитела, которое связывается и с TfR, и с расщепляющим ферментом белка-предшественника амилоида (APP) - β -секретазой (BACE1). Одна системная доза

биспецифичного антитела против TfR/BACE1, сконструированного с использованием низкоаффинного антитела, не только приводила к значимому поглощению антитела в мозг, но также кардинально уменьшала уровни мозгового A β 1-40 по сравнению с одним моноспецифичным антителом против BACE1, свидетельствуя о том, что проникновение через ГЭБ влияет на эффективность антитела против BACE1 (Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43; Yu et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra44).

Доступные данные и эксперименты подчеркивают несколько причинных механизмов, лежащих в основе возрастающего поглощения антитела в ЦНС с использованием подхода с менее аффинным антителом.

Во-первых, высокоаффинные антитела против рецептора ГЭБ (РГЭБ) (например, антитело против TfR из Atwal et al. и Yu et al., выше) ограничивают поглощение в мозг посредством быстрого насыщения РГЭБ в сосудистой системе мозга, таким образом, уменьшая общее количество антитела, поглощенного в мозг, и также ограничивая его распределение в сосудистой системе. Удивительно то, что уменьшение аффинности в отношении РГЭБ улучшает поглощение в мозг и распределение в мозге с надежным сдвигом, наблюдаемым в локализации от сосудистой системы к нейронам и ассоциированным нейропилям в пределах ЦНС. Обнаружили то, что аффинность должна быть ниже определенного верхнего уровня и выше определенного нижнего уровня.

Во-вторых, предполагается то, что меньшая аффинность антитела в отношении РГЭБ ухудшает способность антитела возвращаться на сосудистую сторону ГЭБ через РГЭБ со стороны ЦНС мембраны, так как общая аффинность антитела в отношении РГЭБ является низкой, и местная концентрация антитела на стороне ЦНС ГЭБ является ненасыщающей из-за быстрого рассеивания антитела в компартменте ЦНС.

В третьих, *in vivo*, и как наблюдалось для системы TfR, антитела с меньшей аффинностью в отношении РГЭБ не подвергаются клиренсу из системы также эффективно, как и антитела с большей аффинностью в отношении РГЭБ и, таким образом, остаются в более высоких концентрациях в системе кровообращения, чем их более высокоаффинные аналоги. Это имеет преимущество, так как уровни менее аффинного антитела в системе кровообращения поддерживаются на терапевтических уровнях в течение более длительного периода времени, чем более высокоаффинного антитела, что, следовательно, улучшает поглощение антитела в мозг в течение более длительного периода времени. Кроме того, это улучшение в площади под кривой концентрации относительно времени как в плазме, так и в мозгу может уменьшать частоту дозирования в клинике, что имело бы потенциальную пользу не только для соблюдения пациентом схемы и режима лечения, и удобства пациента, но также и в уменьшении любых потенциальных побочных эффектов или эффектов вне мишени антитела и/или терапевтического соединения, связанного с ним.

В этих предыдущих исследованиях использовались мышинные антитела, которые специфично связывались с мышинным TfR, но которые специфично не распознавали TfR примата или человека. Соответственно, в данном документе предложены антитела и их функциональные части, которые действительно специфично распознают и TfR примата, особенно яванского макака, и TfR человека для того, чтобы облегчать исследования безопасности и эффективности у приматов с использованием антител до терапевтического или диагностического применения у людей.

Тщательная неклиническая оценка безопасности моноклональных антител (mAb), предназначенных для терапевтического применения, является очень важной из-за возрастающей сложности аспектов инженерии антител и изменчивости, индуцированной

разнообразием клеточных систем рекомбинантной продукции для получения антител. Кроме того, сложная структура, уникальные биологические функции и более продолжительные периоды полувыведения mAb по сравнению с традиционными низкомолекулярными лекарственными средствами усиливают факторы, которые необходимо учитывать в связи с безопасностью, помимо опасений из-за длительного клинического применения mAb для лечения хронических заболеваний (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Kim, S.J., et al., Mol. Cells 20 (2005) 17-29).

Общей целью неклинических исследований в отношении mAb является определение токсикологических свойств рассматриваемого mAb и предоставление информации для разработки продукта. Главными целями неклинической оценки являются (1) идентификация органов-мишеней для токсичности и определение того, является ли токсичность обратимой после лечения, (2) идентификация безопасной исходной дозы для человеческих клинических испытаний Фазы I и последующих схем повышения дозы, (3) предоставление информации для отслеживания параметров безопасности в клинических испытаниях и (4) предоставление данных по безопасности для поддержки данных на этикетке продукта. Для того, чтобы достигнуть данных целей проводятся неклинические исследования как *in vitro*, так и *in vivo*, нацеленные на определение и понимание фармакологических свойств антитела (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Cavagnaro, J.A., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.) "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals"; Hoboken, NJ: Wiley 2008; 45-65).

Для успешной неклинической оценки безопасности mAb следует выбирать наиболее релевантные виды животных для тестирования токсичности (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126). Релевантным видом является вид, в котором антитело является фармакологически активным, должен присутствовать или экспрессироваться антиген-мишень, и профиль тканевой перекрестной реактивности должен быть аналогичным профилю у человека (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126; Subramanyam, M. and Mertsching, E., In: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205; Hall, W.C., et al., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). С использованием иммунохимических или функциональных анализов могут быть идентифицированы релевантные виды животных, которые экспрессируют желательный эпитоп и демонстрируют профиль тканевой перекрестной реактивности, аналогичный человеческим тканям (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., et al., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Исследования перекрестной реактивности у видов, которые являются полезными в данном способе, включают иммуногистохимический обзор тканей из целого ряда видов с использованием имеющихся в продаже многовидовых тканевых микрочипов (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., et al., In: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). В качестве альтернативы, оценка связывания антитела с клетками из данных животных посредством сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) типично является более чувствительной, чем иммуногистохимический анализ срезов тканей (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. and Mertsching, E., In: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205). Следует сравнивать среди видов последовательности ДНК и аминокислот антигена-мишени; следует определять гомологию между видами (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. and Mertsching, E., In: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of

biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205).

Кроме того, биораспределение, функция и структура антигена должны быть сравнимыми между релевантными видами животных и человеком для обеспечения оценки токсичности, возникающей в результате связывания антитела с антигеном-мишенью, которая называется токсичностью на мишени (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; 19, 20). Кроме того, сильные сходства в тканевом распределении антигена-мишени у видов животных и человека делают более вероятным то, что органы-мишени токсичности, идентифицированные у животных, будут прогнозировать потенциальные токсичности у человека. Недостаток сходства в тканевом распределении антигена между видами животных и человеком не исключает полностью виды животных для исследований токсичности, но данные различия должны быть приняты во внимание для оценки риска у человека. В том, что касается плотности или аффинности в отношении антигена, абсолютная эквивалентность между животной моделью и человеком аналогичным образом не требуется. Подтверждение релевантности видов, отобранных для тестирования токсичности, должно быть включено в документ для подачи в регулирующий орган. При использовании для оценки безопасности только одного вида, требуется краткое изложение экспериментов, которые демонстрируют отсутствие дополнительных релевантных видов (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11).

Если моноклональное антитело, предназначенное для терапевтического применения, не имеет видовой перекрестной реактивности, следует использовать либо имитирующее антитело, либо другой вид в качестве модели. Таким образом, имитирующие антитела являются потенциальным решением в отношении возможного ограниченного тестирования безопасности с гуманизированными моноклональными антителами с ограниченной видовой перекрестной реактивностью. Однако в настоящее время нет определенных критериев, посредством которых следовало бы судить о потенциальном имитирующем антителе до его применения в определении вопросов безопасности в отношении клинического агента (Regulatory Toxicology and Pharmacology, том 40, номер 3, декабрь 2004, страницы 219-226).

Таким образом, для идентификации животной модели для конкретного mAb следует принять во внимание приведенные выше соображения. Но тем не менее, необходимо, чтобы рассматриваемое mAb имело перекрестную реактивность с антигеном-мишенью тестируемого вида. В противном случае, не могут использоваться даже самые подходящие тестируемые виды. Следовательно, имеется потребность в mAb, у которых нет внутривидовой перекрестной реактивности, но имеется межвидовая перекрестная реактивность в отношении их мишени у человека и вида, предназначенного для неклинических испытаний.

А. Типичные антитела против трансферрина

В данном документе описываются антитела против трансферринового рецептора, которые имеют скорость диссоциации в отношении связывания с человеческим трансферриновым рецептором, которая находится в пределах определенного интервала, для того чтобы обеспечивать надлежащий челночный перенос через ГЭБ. Обнаружили то, что данный интервал, с одной стороны, определяется скоростью диссоциации мышинового антитела 128.1 против трансферринового рецептора (аминокислотные последовательности варибельного домена приводятся в SEQ ID NO 64 и 65), определенной поверхностным плазменным резонансом, в отношении трансферринового рецептора яванского макака, и, с другой стороны, 5% данной скорости диссоциации (т.е. в 20 раз более медленная диссоциация). В одном воплощении скорость диссоциации в отношении человеческого трансферринового рецептора составляет от 0,1 1/с до 0,005

1/с включительно.

Гуманизированные антитела клона 299, как описано в данном документе, не были доступными посредством применения стандартных методик гуманизации. В аминокислотную последовательность требовалось ввести нестандартные мутации для того, чтобы получить гуманизированное антитело со скоростями диссоциации в отношении трансферринового рецептора в пределах намеченного интервала от 0,1 1/с до 0,005 1/с включительно. Это особенно важно, поскольку антитела, как описано в данном документе, разрабатываются для перечечения человеческого гематоэнцефалического барьера для челночного переноса терапевтического груза в мозг.

Обнаружили то, что для получения подходящего и возможного для разработки гуманизированного антитела два аминокислотных остатка цистеина в легкой цепи родительского кроличьего антитела должны были быть заменены аминокислотным остатком пролина и аспарагина соответственно. Кроме того, для нахождения в пределах данного интервала скорости диссоциации, остаток серина, присутствующий в середине кроличьей CDRL3, должен быть заменен остатком аланина.

Дополнительно было обнаружено то, что полезно изменять аминокислотные остатки в тяжелой цепи в положениях 65, 100g и 105 (нумерация согласно Kabat).

Вся нумерация в том виде, в котором она используется в данном документе, основывается на схеме нумерации переменного домена Kabat.

Клон 299 кроличьего антитела против трансферрина демонстрировал сравнимые свойства со свойствами антитела 128.1 против трсферринового рецептора. Это можно видеть из следующей Таблицы.

источник	загрузка транскитоza [пг]	транскитоз, % базо- латерального	общий базо- латеральный [пг]	общий апикальный [пг]	сумма транспор- тированного [пг]
mAb 128.1	2226	34	757	1229	1986
клон-299	2773	36	998	1346	2344
источник	% относительно mAb 128.1	общий базо- латеральный % относительно mAb 128.1	общий апикальный % относительно mAb 128.1	сумма транспор- тированного % относительно mAb 128.1	EC50 [нг/мл] FACS hTfR- CHO
mAb 128.1	100	100	100	100	96
клон-299	125	132	110	118	275
источник	максимальное среднее геометрическое hTfR-CHO	EC50 [нг/мл] FACS cyTfR	максимальное среднее геометрическое TfR яванского макака-CHO	отношение EC50 яванского макака/ человека	максималь- ное отношение яванского макака/ человека
mAb 128.1	78200	314	52100	3,3	0,6
клон-299	55600	241	52000	0,9	1,0
источник	BIACore, скорость диссоциации huTfR [1/c]	BIACore, t1/2 huTfR [мин]	BIACore, скорость диссоциации cyTfR [1/c]	BIACore, t1/2 TfR яванского макака [мин]	отношение t1/2 человека/ яванского макака
mAb 128.1	6,06E-04	19	5,47E-02	0,2	90,2
клон-299	6,16E-04	19	2,77E-04	42	0,4

В следующей Таблице показаны скорости диссоциации гуманизированных вариантов переменного домена кроличьей легкой цепи клона 299 в комбинации с гуманизированными вариантами переменного домена кроличьей тяжелой цепи клона 299. Партнером связывания (определяется при 25°C) был человеческий трансферриновый

рецептор.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

VH→ VL↓	0 (крол.)	1	2	5	6	7	8	9	11	12
0 (крол.)	4,34E-04	9,08E-04	8,06E-04	7,72E-04	6,63E-04	5,15E-04	4,06E-04	9,01E-04	9,05E-04	9,21E-04
1	5,69E-03	1,00E-03	1,00E-03	1,00E-03	1,00E-03	7,52E-03	3,19E-03	6,94E-03	1,00E-03	1,00E-03
2	1,25E-03	2,86E-03	2,75E-03	2,41E-03	1,87E-03	1,31E-03	1,01E-03	3,99E-03	3,85E-03	6,35E-03
3	1,32E-03	4,31E-03	3,84E-03	3,16E-03	2,82E-03	1,45E-03	1,00E-03	4,17E-03	5,65E-03	5,86E-03
4	1,36E-03	2,56E-03	2,63E-03	2,38E-03	1,87E-03	1,25E-03	7,88E-04	2,70E-03	3,88E-03	3,11E-03
5	1,94E-03	2,71E-03	2,62E-03	2,53E-03	1,66E-03	1,35E-03	1,07E-03	3,50E-03	4,56E-03	5,82E-03
6	1,90E-03	5,38E-03	5,55E-03	4,64E-03	3,06E-03	1,97E-03	1,40E-03	6,83E-03	6,71E-03	7,05E-03
7	4,63E-03	7,33E-03	7,50E-03	6,97E-03	5,63E-03	3,66E-03	2,31E-03	7,61E-03	7,81E-03	7,71E-03
8	1,39E-03	4,85E-03	3,94E-03	3,78E-03	3,01E-03	1,72E-03	1,16E-03	5,23E-03	5,52E-03	5,31E-03
9-NYA	1,41E-03	2,46E-03	2,21E-03	2,03E-03	1,41E-03	1,21E-03	1,01E-03	2,52E-03	2,42E-03	2,19E-03
10	1,88E-03	6,77E-03	6,49E-03	6,53E-03	4,55E-03	2,64E-03	1,73E-03	7,19E-03	7,16E-03	7,79E-03
12	5,41E-03	7,05E-03	8,14E-03	1,00E-03	7,78E-03	7,75E-03	6,72E-03	1,00E-03	7,87E-03	1,00E-03
14	1,78E-03	2,99E-03	2,44E-03	2,33E-03	2,20E-03	1,53E-03	1,04E-03	3,32E-03	3,51E-03	5,46E-03
15	6,63E-03	6,69E-03	6,38E-03	6,37E-03	4,21E-03	2,73E-03	1,81E-03	7,39E-03	7,09E-03	7,76E-03
17	1,49E-03	7,56E-03	7,12E-03	7,45E-03	7,17E-03	1,87E-03	1,12E-03	4,25E-03	7,55E-03	7,27E-03
VH→ VL↓	13	15	16	17	18	19	20	21	22	23-DANG
0 (крол.)	4,82E-03	7,63E-03	6,53E-03	4,13E-03	1,09E-03	1,00E-03	1,11E-03	5,65E-03	5,06E-03	3,38E-03

	04	04	04	04	03	03	03	04	04	-04
1	1,00E-03	7,72E-03	7,71E-03	4,33E-03	1,00E-03	1,00E-03	1,00E-03	7,71E-03	5,78E-03	2,80E-03
2	2,46E-03	2,16E-03	1,97E-03	1,05E-03	4,89E-03	7,69E-03	5,25E-03	1,38E-03	1,26E-03	7,15E-04
3	2,77E-03	2,07E-03	1,73E-03	8,43E-04	6,65E-03	1,00E-03	7,15E-03	1,94E-03	1,43E-03	7,83E-04
4	1,30E-03	1,34E-03	1,27E-03	7,23E-04	3,35E-03	1,00E-03	4,36E-03	1,46E-03	1,18E-03	7,61E-04
5	2,18E-03	2,14E-03	2,23E-03	1,23E-03	3,49E-03	1,00E-03	3,52E-03	1,37E-03	1,41E-03	8,80E-04
6	3,65E-03	3,50E-03	3,39E-03	1,71E-03	6,74E-03	1,00E-03	6,06E-03	2,07E-03	2,14E-03	1,16E-03
7	6,68E-03	5,43E-03	5,25E-03	2,33E-03	7,66E-03	1,00E-03	7,14E-03	2,38E-03	3,37E-03	1,55E-03
8	2,47E-03	2,09E-03	1,97E-03	1,11E-03	6,77E-03	6,71E-03	6,58E-03	1,74E-03	1,65E-03	9,41E-04
9-NYA	1,39E-03	1,42E-03	1,36E-03	9,34E-04	2,21E-03	6,17E-03	1,89E-03	1,13E-03	1,26E-03	7,69E-04
10	5,89E-03	3,99E-03	4,24E-03	1,88E-03	7,46E-03	1,00E-03	7,05E-03	2,11E-03	2,09E-03	1,20E-03
12	7,85E-03	7,64E-03	7,54E-03	2,84E-03	1,00E-03	1,00E-03	1,00E-03	7,54E-03	6,44E-03	1,87E-03
14	2,22E-03	1,94E-03	1,75E-03	1,05E-03	3,00E-03	7,96E-03	2,39E-03	1,03E-03	1,12E-03	7,33E-04
15	7,11E-03	6,03E-03	4,77E-03	1,56E-03	7,58E-03	1,00E-03	7,85E-03	1,92E-03	1,79E-03	9,86E-04
17	3,39E-03	1,69E-03	1,66E-03	9,88E-04	5,30E-03	1,00E-03	4,57E-03	9,97E-04	9,38E-04	6,94E-04

Комбинация VN23 с VL9 была выбрана в качестве исходной точки для дальнейшего конструирования для разработки сайта связывания, который более близко отражает свойства связывания антитела 128.1 с трансферриновым рецептором яванского макака, по отношению к связыванию с человеческим трансферриновым рецептором.

В следующей Таблице для сравнения показаны скорости диссоциации разных типичных вариантов VN23 и VL9, а также разных других гуманизированных вариантов переменного домена в отношении человеческого трансферринового рецептора (определенные согласно Примеру 14, 25°C).

		VK9- NYA	VK9- SYA	VK9- GYS	VK9- CYS	VH567- P...NY	VK12- HYS	VK17- TYS	VK15- AYS	VK2- SYS	VK6- SYS
	A										
5	VH23 - DAN G	8,83E- 03		3,96E- 03		4,62E- 03	1,53E- 02	2,29E- 03	6,97E- 03	5,22E- 03	1,32E- 02
10	VH23 - DAS G	3,95E- 02	4,84E- 04	3,73E- 03	2,33E- 03						
15	VH23 - DAQ G	1,49E- 02	7,55E- 04	3,75E- 03	1,51E- 03						
20	VH9- DAN G	1,82E- 03			6,52E- 03					4,02E- 02	
25	VH9- DAQ G	1,25E- 03									
30	VH7- DAN G									3,08E- 02	

контроль: 128.1 - 7,78E-02 (определено для трансферринового рецептора яванского макака).

В следующей Таблице для сравнения показаны кинетические данные разных типичных вариантов VH23 и VL9 (определенные согласно Примеру 13).

Анализ BIAcore, 25°C	TfR	kd [с ⁻¹]	ka [с ⁻¹ M ⁻¹]	kD [M]
mAb 128.1	яванского макака	7,33E-02	5,41E+05	1,36E-07
VH23-DASG/VL09-NYA	человека	3,95E-02	8,83E+04	4,47E-07
VH23-DAQG/VL09-NYA	человека	1,37E-02	1,21E+05	1,13E-07
VH23-DANG/VL09-NYA	человека	8,83E-03	1,55E+05	5,72E-08

В следующей Таблице показаны скорости диссоциации гуманизированных вариантов переменного домена мышинной легкой цепи клона 494 в комбинации с гуманизированными вариантами переменного домена мышинной тяжелой цепи клона 494. Партнером связывания был человеческий трансферриновый рецептор.

VH→ VL↓	0 (мыш.)	1	2	3	4
0 (мыш.)	1,36E-04	1,37E-04	1,56E-04	1,48E-04	1,77E-04
1	3,70E-04	4,10E-04	4,54E-04	4,76E-04	4,48E-04
2	3,64E-04	3,99E-04	4,26E-04	4,15E-04	4,38E-04
3	3,39E-04	3,86E-04	4,30E-04	4,34E-04	4,52E-04
4	5,42E-04	6,57E-04	7,03E-04	6,83E-04	7,05E-04
5	5,44E-04	6,84E-04	7,17E-04	7,17E-04	7,28E-04
6	3,81E-04	4,86E-04	5,27E-04	5,50E-04	5,52E-04
7	2,32E-04	2,74E-04	2,99E-04	3,06E-04	3,26E-04

Более подробно, в одном аспекте данное изобретение отчасти основано на данных о том, что антитело против трансферринового рецептора, как описано в данном документе, может быть использовано в качестве челночного модуля гематоэнцефалического барьера для доставки мозгового эффекторного соединения через гематоэнцефалический барьер в мозг. В некоторых воплощениях челночный модуль гематоэнцефалического барьера представляет собой одновалентное связывающее соединение, которое специфично связывается с трансферриновым рецептором. Антитела против трансферринового рецептора, как описано в данном документе, при использовании в качестве челночного модуля гематоэнцефалического барьера, являются полезными, например, для диагностики или лечения неврологических расстройств, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и совместное заболевание болезнью Альцгеймера с болезнью Паркинсона.

Обнаружили то, что антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 37, отражает по отношению к человеческому трансферриновому рецептору свойства связывания мышинового антитела 128.1 в отношении трансферринового рецептора яванского макака в том, что касается скорости диссоциации связывания.

Соответственно, один аспект, как описано в данном документе, представляет собой выделенное антитело, которое связывается с человеческим трансферриновым рецептором (huTfR) и трансферриновым рецептором яванского макака (суTfR), где данное антитело имеет определенную поверхностным плазменным резонансом скорость диссоциации в отношении человеческого трансферринового рецептора от 0,1 1/с до 0,005 1/с.

Другим аспектом, как описано в данном документе, является применение антитела или фрагмента антитела, которое связывается с человеческим трансферриновым рецептором (huTfR) и трансферриновым рецептором яванского макака (суTfR), где данное антитело имеет определенную поверхностным плазменным резонансом скорость диссоциации в отношении человеческого трансферринового рецептора от 0,1 1/с до 0,005 1/с, для доставки терапевтического соединения через гематоэнцефалический барьер.

В одном воплощении скорость диссоциации определяется при 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 и 0 нМ.

В одном воплощении скорость диссоциации определяется с использованием чипа поверхностного плазмонного резонанса с биотиновой поверхностью и подвижным

буфером 1×PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), дополненным 250 мМ хлоридом натрия, при скорости тока 10 мкл/мин.

В одном воплощении ассоциация отслеживается в течение 180 секунд, и диссоциация отслеживается в течение 600 секунд.

5 В одном воплощении скорость диссоциации определяется на BIAcore T200.

В одном воплощении скорость диссоциации составляет от 0,08 1/с до 0,008 1/с.

В одном воплощении всех аспектов скорость диссоциации определяется при 25°C.

В одном воплощении всех аспектов скорость диссоциации представляет собой скорость диссоциации, определенную при 25°C.

10 Одним аспектом, как описано в данном документе, является антитело против трансферринового рецептора, которое специфично связывается с человеческим трансферриновым рецептором (huTfR) и трансферриновым рецептором яванского макака (суTfR), которое содержит: i) гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи, полученный из вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 1, и ii)

15 гуманизированный вариабельный домен легкой цепи, полученный из вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO 26, где вариабельный домен легкой цепи имеет в положении 80 аминокислотный остаток пролина (P), в положении 91 аминокислотный остаток аспарагина (N) и в положении 93 аминокислотный остаток аланина (A) (нумерация согласно Kabat).

20 В одном воплощении данное антитело дополнительно имеет в вариабельном домене тяжелой цепи в положении 100g аминокислотный остаток серина (S) (нумерация согласно Kabat).

В одном воплощении данное антитело дополнительно имеет в вариабельном домене тяжелой цепи в положении 65 аминокислотный остаток серина (S) (нумерация согласно Kabat).

25 В одном воплощении данное антитело дополнительно имеет в вариабельном домене тяжелой цепи в положении 105 аминокислотный остаток глутамина (Q) (нумерация согласно Kabat).

Одним аспектом, как описано в данном документе, является антитело против трансферринового рецептора, которое специфично связывается с человеческим трансферриновым рецептором (huTfR) и трансферриновым рецептором яванского макака (суTfR), которое содержит: i) гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи, полученный из вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 1, и ii)

30 гуманизированный вариабельный домен легкой цепи, полученный из вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO 26, где данное антитело имеет скорость диссоциации в отношении человеческого трансферринового рецептора в единицах 1/с, которая равна или меньше, чем (т.е. самое большее составляет) скорость диссоциации антитела 128.1 против трансферринового рецептора в единицах 1/с в отношении трансферринового рецептора яванского макака, при этом скорости диссоциации определяются

35 поверхностным плазменным резонансом, и при этом антитело 128.1 против трансферринового рецептора имеет вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 64 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 65.

В одном воплощении данное антитело имеет скорость диссоциации в отношении человеческого трансферринового рецептора в единицах 1/с, которая i) равна или меньше, чем (т.е. самое большее составляет) скорость диссоциации в единицах 1/с антитела 128.1

45 против трансферринового рецептора в отношении трансферринового рецептора яванского макака, ii) равна или больше, чем (т.е. по меньшей мере составляет) 5% скорости диссоциации в единицах 1/с антитела 128.1 против трансферринового рецептора

в отношении трансферринового рецептора яванского макака.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является антитело против трансферринового рецептора, которое специфично связывается с человеческим трансферриновым рецептором (huTfR) и трансферриновым рецептором яванского макака (cyTfR). В некоторых воплощениях антитело против трансферринового рецептора

- связывается с человеческим трансферриновым рецептором (huTfR) и трансферриновым рецептором яванского макака (cyTfR);

- имеет скорость диссоциации в отношении человеческого трансферринового рецептора в единицах 1/с, которая равна или меньше, чем (т.е. самое большее составляет) скорость диссоциации антитела 128.1 против трансферринового рецептора в отношении трансферринового рецептора яванского макака, при этом скорости диссоциации определяются поверхностным плазменным резонансом, и при этом антитело 128.1 против трансферринового рецептора имеет вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 64 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 65;

- связывается с человеческим трансферриновым рецептором со скоростью диссоциации, которая составляет от 0,1 1/с до 0,005 1/с включительно.

В одном аспекте в данном документе предложено антитело против трансферринового рецептора, содержащее по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 66; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 68; (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 71, 72 или 73; (г) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 75; (д) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 76; и (е) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 78.

В одном аспекте согласно данному изобретению предложено антитело, содержащее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности HVR VH, выбранные из (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 66; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 68; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 71 или 72, или 73. В одном аспекте согласно данному изобретению предложено антитело, содержащее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности HVR VH, выбранные из (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 66; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 68; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 72.

В одном аспекте согласно данному изобретению предложено антитело, содержащее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности HVR VH, выбранные из (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 66; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 68; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 73. В одном воплощении антитело содержит HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 71 или 72, или 73. В другом воплощении антитело содержит HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 71 или 72, или 73, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 78. В другом воплощении антитело содержит HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 71 или 72, или 73, HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 78, и HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 68. В другом воплощении антитело содержит (а) HVR-

H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 66; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 68; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 72.

В другом аспекте согласно данному изобретению предложено антитело, содержащее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности HVR VL, выбранные из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 75; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 76; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 78. В одном воплощении антитело содержит (а) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 75; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 76; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 78.

В другом аспекте антитело по изобретению содержит (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности HVR VH, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 66; (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 68; и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO 71 или 72, или 73; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности HVR VL, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 75; (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 76; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 78.

В другом аспекте согласно изобретению предложено антитело, содержащее (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 66; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 68; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 72; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 75; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 76; и (е) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO 78.

В любом из приведенных выше воплощений антитело против трансферринового рецептора является гуманизированным. В одном воплощении антитело против трансферринового рецептора содержит такие же HVR, как и в любом из приведенных выше воплощений, и дополнительно содержит акцепторную человеческую каркасную область, например, каркасную область человеческого иммуноглобулина или человеческую консенсусную каркасную область.

В другом аспекте антитело против трансферринового рецептора содержит последовательность варибельного домена (VH) тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 24 и имеющую примерно такую же скорость диссоциации, что и антитело, содержащее последовательность варибельного домена тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO 24. В некоторых воплощениях последовательность VH, имеющая по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело против трансферринового рецептора, содержащее данную последовательность, сохраняет способность связываться с трансферриновым рецептором с такой же скоростью диссоциации. В некоторых воплощениях в SEQ ID

NO 24 всего было заменено, вставлено и/или подвергнуто делеции от 1 до 10 аминокислот. В некоторых воплощениях замены, вставки или делеции происходят в областях вне HVR (т.е. в FR). Возможно антитело против трансферринового рецептора содержит последовательность VH SEQ ID NO 24, включающую посттрансляционные модификации данной последовательности. В конкретном воплощении данная VH содержит одну, две или три HVR, выбранных из: (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 66; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 68; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 72.

В другом аспекте предложено антитело против трансферринового рецептора, где данное антитело содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 37, и имеющий примерно такую же скорость диссоциации, что и антитело, содержащее последовательность вариабельного домена легкой цепи (VL) SEQ ID NO 37. В некоторых воплощениях последовательность VL, имеющая по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело против трансферринового рецептора, содержащее данную последовательность, сохраняет способность связываться с трансферриновым рецептором с такой же скоростью диссоциации. В некоторых воплощениях в SEQ ID NO 37 всего было заменено, вставлено и/или подвергнуто делеции от 1 до 10 аминокислот. В некоторых воплощениях замены, вставки или делеции происходят в областях вне HVR (т.е. в FR). Возможно антитело против трансферринового рецептора содержит в SEQ ID NO 37 последовательность VL, включающую посттрансляционные модификации данной последовательности. В конкретном воплощении данная VL содержит одну, две или три HVR, выбранных из: (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 75; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 76; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 78.

В другом аспекте предложено антитело против трансферринового рецептора, где данное антитело содержит такой же VH, как и в любых из воплощений, предложенных выше, и такой же VL, как и в любых из воплощений, предложенных выше. В одном воплощении антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO 24 и SEQ ID NO 37 соответственно, включающие посттрансляционные модификации данных последовательностей.

В другом аспекте изобретения антитело против трансферринового рецептора согласно любому из приведенных выше воплощений представляет собой моноклональное антитело, включающее химерное, гуманизированное или человеческое антитело. В одном воплощении антитело против трансферринового рецептора представляет собой фрагмент антитела, например, фрагмент Fv, Fab, Fab', scFv, диатело или F(ab')₂. В другом воплощении данное антитело представляет собой полноразмерное антитело, например, интактное антитело IgG1 или другой класс, или изотип антитела, как определено в данном документе.

В одном воплощении всех аспектов антитело связано с терапевтическим соединением.

В другом воплощении всех аспектов антитело связано с визуализирующим агентом или с меткой.

В другом воплощении антитело представляет собой мультиспецифичное антитело, и терапевтическое соединение, возможно, образует одну часть мультиспецифичного антитела. В одном таком воплощении мультиспецифичное антитело содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с TfR, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с мозговым антигеном. В одном таком аспекте мозговой антиген выбран из группы, состоящей из следующих: бета-секретаза 1 (BACE1), Абета, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста (HER2), тау, аполипопротеин Е (АpoЕ), альфа-синуклеин, CD20, хантингтин, прионовый белок (PrP), киназа 2 с лейцинбогатыми повторами (LRRK2), паркин, пресенилин 1, пресенилин 2, гамма секретаза, рецептор смерти 6 (DR6), белок-предшественник амилоида (APP), рецептор нейротрофина р75 (p75NTR), глюкоцереброзидаза и каспаза 6. В другом воплощении мультиспецифичное антитело связывается и с TfR, и с BACE1. В другом воплощении мультиспецифичное антитело связывается и с TfR, и с Абета. В другом воплощении мультиспецифичное антитело связывается и с TfR, и с альфа-синуклеином. В другом воплощении мультиспецифичное антитело связывается и с TfR, и с CD20. В другом воплощении мультиспецифичное антитело связывается и с TfR, и с глюкоцереброзидазой. В другом воплощении терапевтическое соединение представляет собой лекарственное средство против неврологического расстройства.

В одном аспекте приведенного выше воплощения согласно изобретению предложен фармацевтический препарат, содержащий любое из вышеупомянутых антител и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном аспекте приведенного выше воплощения согласно изобретению предложено любое из вышеупомянутых антител для применения в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте приведенного выше воплощения согласно изобретению предложено применение любого из вышеупомянутых антител в изготовлении лекарственного средства для лечения неврологического расстройства. В одном воплощении данное неврологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства, связанного с глазным заболеванием, эпилепсии, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления ЦНС.

В другом аспекте приведенного выше воплощения согласно изобретению предложено любое из вышеупомянутых антител для применения в лечении неврологического расстройства. В одном воплощении данное неврологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства, связанного с глазным заболеванием, эпилепсии, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления ЦНС.

В другом аспекте приведенного выше воплощения согласно изобретению предложено любое из вышеупомянутых антител для применения в транспортировке одного или более чем одного соединения через ГЭБ.

В другом аспекте приведенного выше воплощения предложено применение любого из вышеупомянутых антител в изготовлении лекарственного средства для транспортировки одного или более чем одного соединения через ГЭБ.

В одном аспекте приведенного выше воплощения предложен способ транспортировки соединения через ГЭБ у субъекта, включающий экспонирование любого из вышеупомянутых антител ГЭБ таким образом, что антитело транспортирует связанное

с ним соединение через ГЭБ. В одном воплощении ГЭБ находится у человеческого субъекта. В одном воплощении вводится антитело, связанное с соединением, в терапевтической дозе. В одном воплощении данная терапевтическая доза является насыщающей TfR. В другом воплощении введение антитела осуществляется в дозе и/или частота дозирования калибруется для минимизации острых клинических симптомов введения антитела.

В другом аспекте приведенного выше воплощения предложен способ увеличения экспонирования ЦНС субъекта соединению, включающий экспонирование любого из вышеупомянутых антител ГЭБ таким образом, что антитело транспортирует связанное с ним соединение через ГЭБ. В одном воплощении ГЭБ находится у человеческого субъекта. В одном воплощении вводится антитело, связанное с соединением, в терапевтической дозе. В одном воплощении данная терапевтическая доза является насыщающей TfR. В другом воплощении введение антитела осуществляется в дозе и/или частота дозирования калибруется для минимизации острых клинических симптомов введения антитела.

В одном аспекте приведенного выше воплощения предложен способ увеличения удерживания в ЦНС соединения, введенного субъекту, включающий экспонирование любого из вышеупомянутых антител ГЭБ таким образом, что увеличивается удерживание в ЦНС соединения. В одном воплощении вводится антитело, связанное с соединением, в терапевтической дозе. В одном воплощении данная терапевтическая доза является насыщающей TfR. В другом воплощении введение антитела осуществляется в дозе и/или частота дозирования калибруется для минимизации острых клинических симптомов введения антитела.

В одном аспекте приведенного выше воплощения предложен способ лечения неврологического расстройства у млекопитающего, включающий лечение млекопитающего любым из вышеупомянутых антител. В одном воплощении данное неврологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства, связанного с глазным заболеванием, эпилепсии, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления ЦНС. В одном воплощении неврологическое расстройство наблюдается у человеческого субъекта. В одном воплощении вводится антитело, связанное с соединением, в терапевтической дозе. В одном воплощении данная терапевтическая доза является насыщающей TfR. В другом воплощении введение антитела осуществляется в дозе и/или частота дозирования калибруется для минимизации острых клинических симптомов введения антитела.

В одном воплощении у антитела модифицируется одно или более чем одно свойство, выбранное из эффекторной функции области Fc антитела, функции активации комплемента антитела и аффинности антитела в отношении TfR.

В одном воплощении данное свойство представляет собой эффекторную функцию области Fc антитела.

В одном воплощении данное свойство представляет собой функцию активации комплемента антитела.

В одном воплощении данное свойство представляет собой аффинность антитела в отношении TfR.

В одном воплощении эффекторная функция или функция активации комплемента была уменьшена или устранена по отношению к антителу дикого типа того же самого изоформа. В одном воплощении эффекторная функция уменьшается или устраняется

способом, выбранным из уменьшения гликозилирования антитела, модификации изотипа антитела на изотип, который имеет пониженную или отсутствующую в природе эффекторную функцию, и модификации области Fc.

В одном воплощении эффекторная функция уменьшается или устраняется посредством уменьшения гликозилирования антитела. В одном воплощении гликозилирование антитела уменьшается способом, выбранным из следующих: продукция антитела в среде, которая не обеспечивает гликозилирование дикого типа; удаление углеводных групп, уже присутствующих на антителе; и модификация антитела таким образом, что гликозилирование дикого типа не происходит.

В одном воплощении гликозилирование антитела уменьшается продукцией антитела в среде, которая не обеспечивает гликозилирование дикого типа, такой как продукция в системе продукции, не являющейся клетками млекопитающего, или где антитело продуцируется синтетически. В одном воплощении антитело продуцируется в системе продукции, не являющейся клетками млекопитающего. В другом воплощении антитело производится синтетически.

В одном воплощении гликозилирование антитела уменьшается посредством модификации антитела таким образом, что гликозилирование дикого типа не происходит, как, например, при которой область Fc антитела содержит мутацию в положении 297 таким образом, что остаток аспарагина дикого типа в данном положении заменяется другой аминокислотой, которая препятствует гликозилированию в данном положении.

В одном воплощении эффекторная функция уменьшается или устраняется посредством по меньшей мере одной модификации области Fc. В одном воплощении эффекторная функция или функция активации комплемента уменьшается или устраняется делецией всей или части области Fc, или посредством инженерии антитела таким образом, что оно не включает область Fc или область, не являющуюся Fc, компетентную в отношении эффекторной функции или функции активации комплемента. В одном воплощении по меньшей мере одна модификация области Fc выбрана из следующих: точечная мутация области Fc для ухудшения связывания с одним или более чем одним рецептором Fc, выбранная из следующих положений: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 30 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438, и 439; точечная мутация области Fc для ухудшения связывания с C1q, выбранная из следующих положений: 270, 322, 329 и 321; устранение некоторой части или всей области Fc и точечная мутация в положении 132 домена CH1. В одном воплощении данная модификация представляет собой точечную мутацию области Fc для ухудшения связывания с C1q, выбранную из следующих положений: 270, 322, 329 и 321. В другом воплощении данной модификацией является устранение некоторой части или всей области Fc. В другом воплощении функция запуска комплемента уменьшается или 40 устраняется посредством делеции всей области Fc или ее части, или посредством инженерии антитела таким образом, что оно не включает область Fc, которая занята в пути комплемента. В одном воплощении антитело выбрано из Fab или одноцепочечного антитела. В другом воплощении модифицируется область антитела, не являющаяся Fc, с уменьшением или устранением активации пути комплемента антителом. В одном воплощении модификацией является точечная мутация области CH1 для ухудшения связывания с C3. В одном воплощении точечная мутация находится в положении 132 (см., например, Vidarte et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 38217-38223).

В одном аспекте приведенного выше воплощения аффинность антитела в отношении

TfR уменьшается при измерении относительно антитела дикого типа того же самого изотипа, не имеющего пониженную аффинность в отношении TfR. В одном таком аспекте антитело имеет K_D или IC_{50} (полумаксимальная ингибирующая концентрация) в отношении TfR от примерно 1 пМ до примерно 100 мкМ.

В одном воплощении у антитела, как описано в данном документе, исключена эффекторная функция. В одном воплощении антитело не имеет эффекторной функции. В одном воплощении антитело принадлежит к человеческому подклассу IgG1 и имеет мутации L234A, L235A и P329G в обеих тяжелых цепях (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В одном воплощении антитело представляет собой:

- а) полноразмерное антитело человеческого подкласса IgG1 или
- б) полноразмерное антитело человеческого подкласса IgG4, или
- в) полноразмерное антитело человеческого подкласса IgG1 с мутациями L234A, L235A и P329G,

г) полноразмерное антитело человеческого подкласса IgG4 с мутациями S228P, L235E и, возможно, P329G,

д) полноразмерное антитело человеческого подкласса IgG1 с мутациями L234A, L235A и P329G в обеих тяжелых цепях и мутациями T366W и S354C в одной тяжелой цепи и мутациями T366S, L368A, Y407V и Y349C в соответствующей другой тяжелой цепи, или

е) полноразмерное антитело человеческого подкласса IgG4 с мутациями S228P и, возможно, P329G в обеих тяжелых цепях и мутациями T366W и S354C в одной тяжелой цепи и мутациями T366S, L368A, Y407V и Y349C в соответствующей другой тяжелой цепи.

В одном аспекте приведенного выше воплощения согласно изобретению предложен фармацевтический препарат, содержащий любое из вышеупомянутых антител и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном аспекте приведенного выше воплощения согласно изобретению предложено любое из вышеупомянутых антител для применения в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте приведенного выше воплощения согласно изобретению предложено применение любого из вышеупомянутых антител в изготовлении лекарственного средства для лечения неврологического расстройства. В одном воплощении неврологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства, связанного с глазным заболеванием, эпилепсии, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления ЦНС.

В другом аспекте приведенного выше воплощения согласно изобретению предложено любое из вышеупомянутых антител для применения в лечении неврологического расстройства. В одном воплощении данное неврологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства, связанного с глазным заболеванием, эпилепсии, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления ЦНС.

В другом аспекте приведенного выше воплощения согласно изобретению предложено любое из вышеупомянутых антител для применения в транспортировке одного или более чем одного соединения через ГЭБ.

В другом аспекте приведенного выше воплощения предложено применение любого

из вышеупомянутых антител в изготовлении лекарственного средства для транспортировки одного или более чем одного соединения через ГЭБ.

В одном аспекте приведенного выше воплощения предложен способ транспортировки соединения через ГЭБ у субъекта, включающий экспонирование любого из
 5 вышеупомянутых антител ГЭБ таким образом, что антитело транспортирует связанное с ним соединение через ГЭБ. В одном воплощении ГЭБ находится у человеческого субъекта. В одном воплощении антитело, связанное с соединением, вводится в терапевтической дозе. В одном воплощении данная терапевтическая доза является насыщающей TfR. В другом воплощении введение антитела осуществляется в дозе и/
 10 или при частоте дозирования, откалиброванных для минимизации острых клинических симптомов введения антитела.

В другом аспекте приведенного выше воплощения предложен способ увеличения степени воздействия соединения на ЦНС субъекта, включающий экспонирование любого из вышеупомянутых антител ГЭБ таким образом, что антитело транспортирует
 15 связанное с ним соединение через ГЭБ. В одном воплощении ГЭБ находится у человеческого субъекта. В одном воплощении антитело, связанное с соединением, вводится в терапевтической дозе. В одном воплощении данная терапевтическая доза является насыщающей TfR. В другом воплощении введение антитела осуществляется в дозе и/или при частоте дозирования, откалиброванных для минимизации острых
 20 клинических симптомов введения антитела.

В одном аспекте приведенного выше воплощения предложен способ увеличения удерживания в ЦНС соединения, введенного субъекту, включающий экспонирование любого из вышеупомянутых антител ГЭБ таким образом, что увеличивается удерживание соединения в ЦНС. В одном воплощении ГЭБ находится у человеческого
 25 субъекта. В одном воплощении антитело, связанное с соединением, вводится в терапевтической дозе. В одном воплощении данная терапевтическая доза является насыщающей TfR. В другом воплощении введение антитела осуществляется в дозе и/или при частоте дозирования, откалиброванных для минимизации острых клинических симптомов введения антитела.

В одном аспекте приведенного выше воплощения предложен способ лечения неврологического расстройства у млекопитающего, включающий лечение млекопитающего любым из вышеупомянутых антител. В одном воплощении неврологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства, связанного с
 35 глазным заболеванием, эпилепсии, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления ЦНС. В другом таком аспекте неврологическое расстройство наблюдается у человеческого субъекта. В одном воплощении антитело, связанное с соединением, вводится в терапевтической дозе. В одном воплощении данная терапевтическая доза является насыщающей TfR. В другом воплощении введение антитела осуществляется в дозе и/или при частоте дозирования, откалиброванных для минимизации острых
 40 клинических симптомов введения антитела.

В другом воплощении предложен способ уменьшения клиренса соединения, введенного субъекту, где данное соединение связано с антителом, которое с низкой
 45 аффинностью связывается с TfR таким образом, что уменьшается клиренс соединения.

В другом воплощении предложен способ оптимизации фармакокинетики и/или фармакодинамики соединения для того, чтобы оно было эффективным в ЦНС субъекта, где данное соединение связано с антителом, которое с низкой аффинностью связывается

с TfR, и данное антитело выбрано таким образом, что его аффинность в отношении TfR после связывания с соединением приводит к такому уровню транспорта антитела, конъюгированного с соединением, через ГЭБ, который оптимизирует фармакокинетику и/или фармакодинамику соединения в ЦНС.

5 В другом аспекте антитело против трансферринового рецептора согласно любому из приведенных выше аспектов и воплощений может включать любую из характеристик, одиночно или в комбинации, как описано в Разделах 1-5 ниже.

1. Аффинность антитела

В одном воплощении Kd измеряется посредством анализа связывания радиоактивно меченого антигена (RIA). В одном воплощении RIA проводится с Fab версией интересующего антитела и его антигеном. Например, аффинность связывания Fab в отношении антигена в растворе измеряется посредством уравнивания Fab с минимальной концентрацией меченого ¹²⁵I антигена в присутствии рядов титрования немеченого антигена, затем захватывая связанный антиген планшетом, покрытым антителом против Fab (см., например, Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Для установления условий для анализа многолуночные планшеты MICROTITER® (Thermo Scientific) покрывают в течение ночи 5 мкг/мл захватывающего антитела против Fab (Cappel Labs) в 50 mM карбонате натрия (pH 9,6) и затем блокируют 2% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение двух-пяти часов при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В неадсорбирующем планшете (Nunc #269620) 100 пМ или 26 пМ [¹²⁵I]-антиген смешивается с серийными разведениями интересующего Fab (например, согласно оценке антитела против VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) - Fab-12 - в Presta, L.G. et al., Cancer Res. 57 (1997) 4593-4599). Интересующий Fab затем инкубируется в течение ночи; однако, инкубация может продолжаться в течение более длительного периода (например, примерно 65 часов) для обеспечения того, что достигается равновесие. Затем смеси переносятся в захватывающий планшет для инкубации при комнатной температуре (например, в течение одного часа). Раствор затем удаляют и планшет промывают восемь раз 0,1% полисорбата 20 (TWEEN-20®) в PBS. При высыхании планшетов добавляют 150 мкл/лунку сцинтиллятора (MICROSCINT-20™; Packard), и в планшетах осуществляют счет на гамма-счетчике TOPCOUNT™ (Packard) в течение десяти минут. Для применения в анализах конкурентного связывания выбирают концентрации каждого Fab, которые дают связывание, меньшее чем или равное 20% от максимального связывания.

35 Согласно другому воплощению Kd измеряется с использованием анализа поверхностного плазменного резонанса BIACORE®. Например, анализ с использованием BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) проводится при 25°C с использованием чипов CM5 с иммобилизованным антигеном при ~10 единицах ответа (RU). В одном воплощении биосенсорные чипы с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIACORE, Inc.) активируются N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимидагидрохлоридом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антиген разводится 10 mM ацетатом натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~ 0,2 мкМ) перед инъекцией при скорости тока 5 мкл/минуту с достижением приблизительно 10 единиц ответа (RU) связавшегося белка. После инъекции антигена инъецируется 1 M этаноламин для блокирования непрореагировавших групп. Для измерений кинетики инъецируются двухкратные серийные разведения Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) в PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) с 0,05% поверхностно-

активного вещества полисорбат 20 (TWEEN-20™) (PBST) при 25°C при скорости тока приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) рассчитываются с использованием простой модели связывания Лангмюра один к одному (BIAcore® Evaluation Software, версия 3.2) посредством одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесная константа диссоциации (KD) рассчитывается как отношение k_{off}/k_{on} (см., например, Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Если скорость ассоциации, определенная описанным выше поверхностным плазменным резонансом, превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, тогда скорость ассоциации может быть определена посредством применения методики гашения флуоресценции, в которой измеряется увеличение или уменьшение интенсивности испускаемой флуоресценции (возбуждение - 295 нм; испускание - 340 нм, полоса пропускания - 16 нм) 20 нМ антитела против антигена (в виде Fab) в PBS, pH 7,2, при 25°C в присутствии возрастающих концентраций антигена при измерении в спектрометре, таком как спектрофотометр, оснащенный остановленной струей (Aviv Instruments), или спектрофотометр серии 8000 SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) с кюветой с перемешиванием.

2. Фрагменты антител

В некоторых воплощениях антитело, предложенное в данном документе, представляет собой фрагмент антитела. Фрагменты антитела включают фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv и scFv, и другие фрагменты, описанные ниже, но не ограничиваются ими. Для обзора определенных фрагментов антител, см. Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Для обзора фрагментов scFv см., например, Plueckthun, A., In: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315; см. также WO 93/16185; US 5571894 и US 5587458. Для обсуждения фрагментов Fab и F(ab')₂, содержащих остатки эпитопа, связываемого рецептором утилизации и имеющих повышенные периоды полувыведения in vivo, см. US 5869046.

Диатела представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть двухвалентными или биспецифичными. См., например, EP 0404097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134; и Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. Триатела и тетратела также описываются в Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134.

Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь переменный домен тяжелой цепи антитела или его часть, или весь переменный домен легкой цепи антитела или его часть. В некоторых воплощениях однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (Domantis, Inc., Waltham, MA; см., например, US 6248516).

Фрагменты антитела могут быть получены разными методиками, включающими протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продукцию рекомбинантными клетками-хозяевами (например, E.coli или фагом), но не ограничивающимися ими, как описано в данном документе.

3. Химерные и гуманизированные антитела

В некоторых воплощениях антитело, предложенное в данном документе, представляет собой химерное антитело. Определенные химерные антитела описываются, например, в US 4816567; и Morrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855). В одном примере химерное антитело содержит переменную область, не являющуюся человеческой (например, переменную область, происходящую от мыши, крысы, хомяка, кролика или примата, не являющегося человеком, такого как обезьяна), и

человеческую константную область. В другом воплощении химерное антитело представляет собой антитело «с переключением класса», у которого класс или подкласс был изменен от класса или подкласса родительского антитела. Химерные антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты.

5 В некоторых воплощениях химерное антитело представляет собой гуманизированное антитело. Типично антитело, не являющееся человеческим, гуманизируют для уменьшения иммуногенности у человека, при сохранении специфичности и аффинности родительского антитела, не являющегося человеческим. В общем, гуманизированное антитело содержит один или более чем один вариабельный домен, в котором HVR,
10 например, CDR (или их части) происходят из антитела, не являющегося человеческим, и FR (или их части) происходят из последовательностей человеческого антитела. Гуманизированное антитело возможно также будет содержать по меньшей мере часть человеческой константной области. В некоторых воплощениях некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками из антитела, не
15 являющегося человеческим (например, антитела, из которого происходят остатки HVR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Обзор гуманизированных антител и способов их получения делается, например, в Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633, и они дополнительно описываются, например, в Riechmann, I. et al., *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C. et al.,
20 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033; US 5821337, US 7527791, US 6982321 и US 7087409; Kashmiri, S.V. et al., *Methods* 36 (2005) 25-34 (описывающей пересадку области, определяющей специфичность (SDR)); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (описывающей «изменение поверхности (вариабельного домена)» (resurfacing)); Dall'Acqua, W.F. et al., *Methods* 36 (2005) 43-60 (описывающей «перетасовку FR»); и
25 Osbourn, J. et al., *Methods* 36 (2005) 61-68 и Klimka, A. et al., *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (описывающей подход «направленного отбора» для перетасовки FR).

Человеческие каркасные области, которые можно использовать для гуманизации, включают каркасные области, отобранные с использованием способа «наилучшей аппроксимации» (см., например, Sims, M.J. et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308;
30 каркасные области, происходящие из консенсусной последовательности вариабельных областей легкой или тяжелой цепи конкретной подгруппы человеческих антител (см., например, Carter, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; и Presta, L.G. et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632); человеческие зрелые (соматически мутировавшие) каркасные области или человеческие каркасные области зародышевой линии (см.,
35 например, Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633); и каркасные области, полученные в результате скрининга библиотек FR (см., например, Vasa, M. et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 и Rosok, M.J. et al., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618), но не ограничиваются ими.

4. Мультиспецифичные антитела

40 В некоторых воплощениях антитело, предложенное в данном документе, представляет собой мультиспецифичное антитело, например, биспецифичное антитело. Мультиспецифичные антитела представляют собой моноклональные антитела, которые имеют специфичности связывания в отношении по меньшей мере двух разных сайтов. В некоторых воплощениях одна из специфичностей связывания направлена в отношении
45 трансферринового рецептора, и другая - в отношении любого другого антигена. Биспецифичные антитела также могут использоваться для локализации цитотоксических агентов в клетках, которые экспрессируют трансферриновый рецептор. Биспецифичные антитела можно получать в виде полноразмерных антител или фрагментов антител.

Методики получения мультиспецифичных антител включают рекомбинантную созэкспрессию двух пар тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина, имеющих разные специфичности (см. Milstein, C. and Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540, WO 93/08829 и Traunecker, A. et al., EMBO J. 10 (1991) 3655-3659), и генетическую инженерию «выступ

во впадину» (см., например, US 5731168), но не ограничиваются ими.

Мультиспецифичные антитела также можно получать инженерией эффектов электростатического наведения для получения Fc-гетеродимерных молекул антитела (WO 2009/089004); поперечным связыванием двух или более чем двух антител или фрагментов (см., например, US 4676980 и Brennan, M. et al., Science 229 (1985) 81-83); применением лейциновых молний для получения биспецифичных антител (см., например, Kostelny, S.A. et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553; применением технологии «диатела» для получения биспецифичных фрагментов антител (см., например, Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448); применением димеров одноцепочечных Fv (scFv) (см., например, Gruber, M et al., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374); и получением триспецифичных антител, как описано, например, в Tutt, A. et al., J. Immunol. 147 (1991) 60-69).

В данный документ также включены генетически модифицированные антитела с тремя или более чем тремя функциональными антигенсвязывающими сайтами, включающие «антитела-осьминоги» (см., например, US 2006/0025576).

Антитело или фрагмент в данном документе также включает «Fab двойного действия» или «DAF», содержащий антигенсвязывающий сайт, который связывается с трансферриновым рецептором, а также с другим, отличным антигеном (см., например, US 2008/0069820).

Антитело или фрагмент в данном документе также включает мультиспецифичные антитела, описанные в WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 и WO 2010/145793.

В одном воплощении всех аспектов, как описано в данном документе, антитело против трансферринового рецептора представляет собой биспецифичное антитело.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является двухвалентное, биспецифичное антитело, содержащее:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфично связывающуюся с первым антигеном, и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфично связывающуюся со вторым антигеном, где вариабельные домены VL и VH второй легкой цепи и второй тяжелой цепи заменяют друг друга,

где первый антиген или второй антиген представляет собой человеческий трансферриновый рецептор.

Антитело согласно а) не содержит модификацию, как описано согласно б), и тяжелая цепь и легкая цепь согласно а) представляют собой изолированные цепи.

В антителе согласно б)

в пределах легкой цепи

вариабельный домен легкой цепи VL заменен вариабельным доменом тяжелой цепи VH указанного антитела,

и

в пределах тяжелой цепи

вариабельный домен тяжелой цепи VH заменен вариабельным доменом легкой цепи VL указанного антитела.

В одном воплощении

i) в константном домене CL первой легкой цепи согласно а) аминокислота в положении 124 (нумерация согласно Kabat) заменена положительно заряженной аминокислотой, и где в константном домене СН1 первой тяжелой цепи согласно а) аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 (нумерация согласно

индексу EU по Kabat) заменена отрицательно заряженной аминокислотой,

или

ii) в константном домене CL второй легкой цепи согласно б) аминокислота в положении 124 (нумерация согласно Kabat) заменена положительно заряженной аминокислотой, и где в константном домене СН1 второй тяжелой цепи согласно б) аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 (нумерация согласно

индексу EU по Kabat) заменена отрицательно заряженной аминокислотой.

В одном предпочтительном воплощении

i) в константном домене CL первой легкой цепи согласно а) аминокислота в положении 124 независимо заменена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация согласно Kabat) (в одном предпочтительном воплощении - независимо лизином (K) или аргинином (R)), и где в константном домене СН1 первой тяжелой цепи согласно а) аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 независимо заменена глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D)

(нумерация согласно индексу EU по Kabat),

или

ii) в константном домене CL второй легкой цепи согласно б) аминокислота в положении 124 независимо заменена лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация согласно Kabat) (в одном предпочтительном воплощении - независимо лизином (K) или аргинином (R)), и где в константном домене СН1 второй тяжелой цепи согласно б) аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 независимо заменена глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В одном воплощении в константном домене CL второй тяжелой цепи аминокислоты в положении 124 и 123 заменяются на K (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В одном воплощении в константном домене СН1 второй легкой цепи аминокислоты в положении 147 и 213 заменяются на E (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В одном предпочтительном воплощении в константном домене CL первой легкой цепи аминокислоты в положении 124 и 123 заменяются на K, и в константном домене СН1 первой тяжелой цепи аминокислоты в положении 147 и 213 заменяются на E (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В одном воплощении в константном домене CL второй тяжелой цепи аминокислоты в положении 124 и 123 заменяются на K, и где в константном домене СН1 второй легкой цепи аминокислоты в положении 147 и 213 заменяются на E, и в переменном домене VL первой легкой цепи аминокислота в положении 38 заменяется на K, и в переменном домене VH первой тяжелой цепи аминокислота в положении 39 заменяется на E, в переменном домене VL второй тяжелой цепи аминокислота в положении 38 заменяется на K, и в переменном домене VH второй легкой цепи аминокислота в положении 39 заменяется на E (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

Одним аспектом, как описано в данном документе, является двухвалентное, биспецифичное антитело, содержащее:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфично связывающуюся с первым антигеном, и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфично связывающуюся со вторым антигеном, где переменные домены VL и VH второй легкой цепи и второй тяжелой цепи заменяют друг друга, и где константные домены CL и CH1 второй легкой цепи и второй тяжелой цепи заменяют друг друга,

5 где первый антиген или второй антиген представляет собой человеческий трансферриновый рецептор.

Антитело согласно а) не содержит модификацию, как описано согласно б), и тяжелая цепь и легкая цепь согласно а) представляют собой изолированные цепи.

В антителе согласно б)

10 в пределах легкой цепи

переменный домен легкой цепи VL заменен переменным доменом тяжелой цепи VH указанного антитела, и константный домен легкой цепи CL заменен константным доменом тяжелой цепи CH1 указанного антитела;

и

15 в пределах тяжелой цепи

переменный домен тяжелой цепи VH заменен переменным доменом легкой цепи VL указанного антитела, и константный домен тяжелой цепи CH1 заменен константным доменом легкой цепи CL указанного антитела.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является двухвалентное, биспецифичное антитело, содержащее:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфично связывающиеся с первым антигеном, и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфично связывающиеся со вторым антигеном, где константные домены CL и CH1 второй легкой цепи и второй тяжелой цепи заменяют друг на друга,

25 где первый антиген или второй антиген представляет собой человеческий трансферриновый рецептор.

Антитело согласно а) не содержит модификацию, как описано согласно б), и тяжелая цепь и легкая цепь согласно а) представляют собой изолированные цепи.

30 В антителе согласно б)

в пределах легкой цепи

константный домен легкой цепи CL заменен константным доменом тяжелой цепи CH1 указанного антитела;

и в пределах тяжелой цепи

35 константный домен тяжелой цепи CH1 заменен константным доменом легкой цепи CL указанного антитела.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является мультиспецифичное антитело, содержащее:

а) полноразмерное антитело, специфично связывающееся с первым антигеном и состоящее из двух тяжелых цепей антитела и двух легких цепей антитела, и

б) один, два, три или четыре одноцепочечных фрагмента Fab, специфично связывающихся с одним-четырьмя дополнительными антигенами (т.е. вторым и/или третьим, и/или четвертым, и/или пятым антигеном, предпочтительно специфично связывающихся с одним дополнительным антигеном, т.е. со вторым антигеном),

45 в котором указанные одноцепочечные фрагменты Fab согласно б) слиты с указанным полноразмерным антителом согласно а) через пептидный линкер на С- или N-конце тяжелой или легкой цепи указанного полноразмерного антитела,

где первый антиген или один из дополнительных антигенов представляет собой

человеческий трансферриновый рецептор.

В одном воплощении один или два идентичных одноцепочечных фрагмента Fab, связывающихся со вторым антигеном, слиты с указанным полноразмерным антителом через пептидный линкер на С-конце тяжелой или легкой цепей указанного полноразмерного антитела.

В одном воплощении один или два идентичных одноцепочечных фрагмента Fab, связывающихся со вторым антигеном, слиты с указанным полноразмерным антителом через пептидный линкер на С-конце тяжелых цепей указанного полноразмерного антитела.

В одном воплощении один или два идентичных одноцепочечных фрагмента Fab, связывающихся со вторым антигеном, слиты с указанным полноразмерным антителом через пептидный линкер на С-конце легких цепей указанного полноразмерного антитела.

В одном воплощении два идентичных одноцепочечных фрагмента Fab, связывающихся со вторым антигеном, слиты с указанным полноразмерным антителом через пептидный линкер на С-конце каждой тяжелой или легкой цепи указанного полноразмерного антитела.

В одном воплощении два идентичных одноцепочечных фрагмента Fab, связывающихся со вторым антигеном, слиты с указанным полноразмерным антителом через пептидный линкер на С-конце каждой тяжелой цепи указанного полноразмерного антитела.

В одном воплощении два идентичных одноцепочечных фрагмента Fab, связывающихся со вторым антигеном, слиты с указанным полноразмерным антителом через пептидный линкер на С-конце каждой легкой цепи указанного полноразмерного антитела.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является трехвалентное биспецифичное антитело, содержащее:

а) полноразмерное антитело, специфично связывающееся с первым антигеном и состоящее из двух тяжелых цепей антитела и двух легких цепей антитела,

б) первый полипептид, состоящий из

ба) переменного домена тяжелой цепи антитела (VH),

или

бб) переменного домена тяжелой цепи антитела (VH) и константного домена 1 антитела (CH1),

где указанный первый полипептид слит N-концом его домена VH через пептидный линкер с С-концом одной из двух тяжелых цепей указанного полноразмерного антитела,

в) второй полипептид, состоящий из

ва) переменного домена легкой цепи антитела (VL),

или

вб) переменного домена легкой цепи антитела (VL) и константного домена легкой цепи антитела (CL),

где указанный второй полипептид слит N-концом домена VL через пептидный линкер с С-концом другой из двух тяжелых цепей указанного полноразмерного антитела,

и

где переменный домен тяжелой цепи антитела (VH) первого полипептида и переменный домен легкой цепи антитела (VL) второго полипептида совместно образуют антигенсвязывающийся сайт, специфично связывающийся со вторым антигеном,

и

где первый антиген или второй антиген представляет собой человеческий трансферриновый рецептор.

В одном воплощении переменный домен тяжелой цепи антитела (VH) полипептида согласно б) переменный домен легкой цепи антитела (VL) полипептида согласно в) связаны и стабилизируются посредством межцепочечного дисульфидного мостика посредством введения дисульфидной связи между следующими положениями:

i) положением 44 переменного домена тяжелой цепи и положением 100 переменного домена легкой цепи или

ii) положением 105 переменного домена тяжелой цепи и положением 43

переменного домена легкой цепи, или

iii) положением 101 переменного домена тяжелой цепи и положением 100 переменного домена легкой цепи (нумерация всегда согласно индексу EU по Kabat).

Методики введения неприродных дисульфидных мостиков для стабилизации описываются, например, в WO 94/029350, Rajagopal, V., et al., Prot. Eng. (1997) 1453-59;

Kobayashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25, (1998) 387-393; или Schmidt, M., et al., Oncogene (1999) 18 1711-1721. В одном воплощении возможная дисульфидная

связь между переменными доменами полипептидов согласно б) и в) находится между положением 44 переменного домена тяжелой цепи и положением 100 переменного домена легкой цепи. В одном воплощении возможная дисульфидная связь между

переменными доменами полипептидов согласно б) и в) находится между положением 105 переменного домена тяжелой цепи и положением 43 переменного домена легкой цепи (нумерация всегда согласно Kabat). В одном воплощении предпочтительным

является трехвалентное биспецифичное антитело без указанной возможной дисульфидной стабилизации между переменными доменами VH и VL одноцепочечных

фрагментов Fab.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является триспецифичное или тетраспецифичное антитело, содержащее:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь полноразмерного антитела, которая специфично связывается с первым антигеном, и

б) вторую (модифицированную) легкую цепь и вторую (модифицированную) тяжелую цепь полноразмерного антитела, которая специфично связывается со вторым антигеном, где переменные домены VL и VH заменяют друг друга и/или где константные домены CL и CH1 заменяют друг друга, и

в) где от одного до четырех антигенсвязывающих пептидов, которые специфично связываются с одним или двумя дополнительными антигенами (т.е. с третьим и/или четвертым антигеном), слиты через пептидный линкер с С- или N-концом легких цепей или тяжелых цепей а) и/или б),

где первый антиген или второй антиген, или один из дополнительных антигенов представляет собой человеческий трансферриновый рецептор.

Антитело согласно а) не содержит модификацию, как описано согласно б), и тяжелая цепь, и легкая цепь согласно а) представляют собой изолированные цепи.

В одном воплощении триспецифичное или тетраспецифичное антитело содержит согласно в) один или два антигенсвязывающих пептида, которые специфично связываются с одним или двумя дополнительными антигенами.

В одном воплощении антигенсвязывающие пептиды выбраны из группы фрагмента scFv и фрагмента scFab.

В одном воплощении антигенсвязывающие пептиды представляют собой фрагменты scFv.

В одном воплощении антигенсвязывающие пептиды представляют собой фрагменты scFab.

В одном воплощении антигенсвязывающие пептиды слиты с С-концом тяжелых цепей а) и/или б).

5 В одном воплощении триспецифичное или тетраспецифичное антитело содержит согласно в) один или два антигенсвязывающих пептида, которые специфично связываются с одним дополнительным антигеном.

В одном воплощении триспецифичное или тетраспецифичное антитело содержит согласно в) два идентичных антигенсвязывающих пептида, которые специфично
10 связываются с третьим антигеном. В одном предпочтительном воплощении такие два идентичных антигенсвязывающих пептида оба слиты посредством одинакового пептидного линкера с С-концом тяжелых цепей а) и б). В одном предпочтительном воплощении два идентичных антигенсвязывающих пептида представляют собой либо фрагмент scFv, либо фрагмент scFab.

15 В одном воплощении триспецифичное или тетраспецифичное антитело содержит согласно в) два антигенсвязывающих пептида, которые специфично связываются с третьим и с четвертым антигеном. В одном воплощении указанные два антигенсвязывающих пептида слиты через одинаковый пептидный соединитель с С-концом тяжелых цепей а) и б). В одном предпочтительном воплощении указанные два
20 антигенсвязывающих пептида представляют собой либо фрагмент scFv, либо фрагмент scFab.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является биспецифичное четырехвалентное антитело, содержащее:

а) две легкие цепи и две тяжелые цепи антитела, которые специфично связываются
25 с первым антигеном (и содержат два фрагмента Fab),

б) два дополнительных фрагмента Fab антитела, которые специфично связываются со вторым антигеном, где указанные дополнительные фрагменты Fab оба слиты через пептидный линкер либо с С-, либо с N-концами тяжелых цепей а),

и

30 где во фрагментах Fab были проведены следующие модификации

i) в обоих фрагментах Fab а) или в обоих фрагментах Fab б) переменные домены VL и VH заменяют друг друга, и/или константные домены CL и CH1 заменяют друг друга,

или

35 ii) в обоих фрагментах Fab а) переменные домены VL и VH заменяют друг друга, и константные домены CL и CH1 заменяют друг друга,

и

в обоих фрагментах Fab б) переменные домены VL и VH заменяют друг друга, или константные домены CL и CH1 заменяют друг друга,

40 или

iii) в обоих фрагментах Fab а) переменные домены VL и VH заменяют друг друга, или константные домены CL и CH1 заменяются друг друга,

и

45 в обоих фрагментах Fab б) переменные домены VL и VH заменяют друг друга, и константные домены CL и CH1 заменяют друг друга,

или

iv) в обоих фрагментах Fab а) переменные домены VL и VH заменяют друг друга, и в обоих фрагментах Fab б) константные домены CL и CH1 заменяют друг друга,

или

v) в обоих фрагментах Fab а) константные домены CL и CH1 заменяют друг друга, и в обоих фрагментах Fab б) переменные домены VL и VH заменяют друг друга, где первый антиген или второй антиген представляет собой человеческий

5 трансферриновый рецептор.

В одном воплощении указанные дополнительные фрагменты Fab оба слиты через пептидный линкер либо с С-концами тяжелых цепей а), либо с N-концами тяжелых цепей а).

10 В одном воплощении указанные дополнительные фрагменты Fab оба слиты через пептидный линкер с С-концами тяжелых цепей а).

В одном воплощении указанные дополнительные фрагменты Fab оба слиты через пептидный соединитель с N-концами тяжелых цепей а).

В одном воплощении во фрагментах Fab осуществляются следующие модификации:

15 i) в обоих фрагментах Fab а) или в обоих фрагментах Fab б) переменные домены VL и VH заменяются друг на друга,

и/или

константные домены CL и CH1 заменяют друг друга.

В одном воплощении во фрагментах Fab осуществляются следующие модификации:

20 i) в обоих фрагментах Fab а) переменные домены VL и VH заменяют друг друга, и/или

константные домены CL и CH1 заменяют друг друга.

В одном воплощении во фрагментах Fab осуществляются следующие модификации:

i) в обоих фрагментах Fab а) константные домены CL и CH1 заменяют друг друга.

В одном воплощении во фрагментах Fab осуществляются следующие модификации:

25 i) в обоих фрагментах Fab б) переменные домены VL и VH заменяют друг друга, и/или

константные домены CL и CH1 заменяют друг друга.

В одном воплощении во фрагментах Fab осуществляются следующие модификации:

30 i) в обоих фрагментах Fab б) константные домены CL и CH1 заменяют друг друга.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является биспецифичное четырехвалентное антитело, содержащее:

а) (модифицированную) тяжелую цепь первого антитела, которая специфично связывается с первым антигеном и содержит первую пару доменов VH-CH1, в которой с С-концом указанной тяжелой цепи слит N-конец второй пары доменов VH-CH1

35 указанного первого антитела через пептидный линкер,

б) две легкие цепи указанного первого антитела а),

в) (модифицированную) тяжелую цепь второго антитела, которая специфично связывается со вторым антигеном и содержит первую пару доменов VH-CL, в которой с С-концом указанной тяжелой цепи слит N-конец второй пары доменов VH-CL

40 указанного второго антитела через пептидный линкер, и

г) две (модифицированные) легкие цепи указанного второго антитела в), причем каждая из них содержит пару доменов CL-CH1,

где первый антиген или второй антиген представляет собой человеческий трансферриновый рецептор.

45 Одним аспектом, как описано в данном документе, является биспецифичное антитело, содержащее:

а) тяжелую цепь и легкую цепь первого полноразмерного антитела, которое специфично связывается с первым антигеном, и

б) тяжелую цепь и легкую цепь второго полноразмерного антитела, которое специфично связывается со вторым антигеном, где N-конец тяжелой цепи соединяется с С-концом легкой цепи через пептидный линкер,

где первый антиген или второй антиген представляет собой человеческий трансферриновый рецептор.

Антитело согласно а) не содержит модификацию, как описано согласно б), и тяжелая цепь и легкая цепь представляют собой выделенные цепи.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является биспецифичное антитело, содержащее:

а) полноразмерное антитело, специфично связывающееся с первым антигеном и состоящее из двух тяжелых цепей антитела и двух легких цепей антитела, и

б) фрагмент Fv, специфично связывающийся со вторым антигеном, содержащий домен VH^2 и домен VL^2 , в котором оба домена соединяются друг с другом посредством дисульфидного мостика,

где только либо домен VH^2 , либо домен VL^2 слит через пептидный линкер с тяжелой или легкой цепью полноразмерного антитела, специфично связывающегося с первым антигеном,

где первый антиген или второй антиген представляет собой человеческий трансферриновый рецептор.

В данном биспецифичном антителе тяжелые цепи и легкие цепи согласно а) представляют собой изолированные цепи.

В одном воплощении другой из домена VH^2 или домена VL^2 не слит через пептидный линкер с тяжелой или легкой цепью полноразмерного антитела, специфично связывающегося с первым антигеном.

Во всех аспектах, как описано в данном документе, первая легкая цепь содержит домен VL и домен CL, и первая тяжелая цепь содержит домен VH, домен CH1, шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является биспецифичное трехвалентное антитело, содержащее:

а) два фрагмента Fab, которые специфично связываются с первым антигеном,

б) один фрагмент CrossFab, который специфично связывается со вторым антигеном, в котором домены CH1 и CL заменяют друг друга,

в) одну область Fc, содержащую первую область Fc тяжелой цепи и вторую область Fc тяжелой цепи,

где С-концы доменов CH1 двух фрагментов Fab соединяются с N-концами полипептидов тяжелой цепи области Fc, и

где С-конец домена CL фрагмента CrossFab соединяется с N-концом домена VH одного из фрагментов Fab,

и

где первый антиген или второй антиген представляет собой человеческий трансферриновый рецептор.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является биспецифичное трехвалентное антитело, содержащее:

а) два фрагмента Fab, которые специфично связываются с первым антигеном,

б) один фрагмент CrossFab, который специфично связывается со вторым антигеном, в котором домены CH1 и CL заменяют друг друга,

в) одну область Fc, содержащую первую тяжелую цепь области Fc и вторую тяжелую

цепь области Fc,

где С-конец домена CH1 первого фрагмента Fab соединяется с N-концом одного из полипептидов тяжелой цепи области Fc, и С-конец домена CL фрагмента CrossFab соединяется с N-концом другого полипептида тяжелой цепи области Fc, и

где С-конец домена CH1 второго фрагмента Fab соединяется с N-концом домена VH первого фрагмента Fab или с N-концом домена VH фрагмента CrossFab, и

где первый антиген или второй антиген представляет собой человеческий трансферриновый рецептор.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является биспецифичное антитело, содержащее:

а) полноразмерное антитело, специфично связывающееся с первым антигеном и состоящее из двух тяжелых цепей антитела и двух легких цепей антитела, и

б) фрагмент Fab, специфично связывающийся со вторым антигеном, содержащий домен VH² и домен VL², содержащий фрагмент тяжелой цепи и фрагмент легкой цепи, где

в пределах фрагмента легкой цепи

вариабельный домен легкой цепи VL² заменяется на вариабельный домен тяжелой цепи VH² указанного антитела,

и

в пределах фрагмента тяжелой цепи

вариабельный домен тяжелой цепи VH² заменяется на вариабельный домен легкой цепи VL² указанного антитела,

где фрагмент Fab тяжелой цепи вставлен между доменом CH1 одной из тяжелых цепей полноразмерного антитела и соответствующей областью Fc полноразмерного антитела, и N-конец легкой цепи фрагмента Fab конъюгирован с С-концом легкой цепи полноразмерного антитела, которая образует пару с тяжелой цепью полноразмерного антитела, в которую был вставлен фрагмент Fab тяжелой цепи, и

где первый антиген или второй антиген представляет собой человеческий трансферриновый рецептор.

Одним аспектом, как описано в данном документе, является биспецифичное антитело, содержащее:

а) полноразмерное антитело, специфично связывающееся с первым антигеном и состоящее из двух тяжелых цепей антитела и двух легких цепей антитела, и

б) фрагмент Fab, специфично связывающийся со вторым антигеном, содержащий домен VH² и домен VL², содержащий фрагмент тяжелой цепи и фрагмент легкой цепи, где

в пределах фрагмента легкой цепи

вариабельный домен легкой цепи VL² заменен на вариабельный домен тяжелой цепи VH² указанного антитела,

и

в пределах фрагмента тяжелой цепи

вариабельный домен тяжелой цепи VH² заменен на вариабельный домен легкой цепи VL² указанного антитела,

где С-конец фрагмента тяжелой цепи фрагмента Fab конъюгирован с N-концом одной из тяжелых цепей полноразмерного антитела, и С-конец фрагмента легкой цепи

фрагмента Fab конъюгирован с N-концом легкой цепи полноразмерного антитела, которая образует пару с тяжелой цепью полноразмерного антитела, с которой конъюгирован фрагмент тяжелой цепи фрагмента Fab, и

где первый антиген или второй антиген представляет собой человеческий трансферриновый рецептор.

В одном воплощении всех аспектов антитело, как описано в данном документе, представляет собой мультиспецифичное антитело, которое требует гетеродимеризации по меньшей мере двух полипептидов тяжелой цепи, и где антитело специфично связывается с человеческим трансферриновым рецептором и вторым антигеном, не являющимся человеческим трансферриновым рецептором.

Было описано несколько подходов для модификаций СНЗ для того, чтобы поддерживать гетеродимеризацию, например, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291, которые включены в данный документ посредством ссылки. Типично в подходах, известных в данной области, и домен СНЗ первой тяжелой цепи, и домен СНЗ второй тяжелой цепи генетически модифицированы комплементарным образом таким образом, что тяжелая цепь, содержащая один генетически модифицированный домен СНЗ, больше не может гомодимеризоваться с другой тяжелой цепью той же самой структуры (например, первая тяжелая цепь с генетически модифицированным СНЗ больше не может гомодимеризоваться с другой первой тяжелой цепью с генетически модифицированным СНЗ; и вторая тяжелая цепь с генетически модифицированным СНЗ больше не может гомодимеризоваться с другой второй тяжелой цепью с генетически модифицированным СНЗ). Посредством этого тяжелая цепь, содержащая один генетически модифицированный домен СНЗ, принуждается к гетеродимеризации с другой тяжелой цепью, содержащей домен СНЗ, которая генетически модифицирована комплементарным образом. Для этого воплощения изобретения домен СНЗ первой тяжелой цепи и домен СНЗ второй тяжелой цепи генетически модифицируются комплементарным образом посредством аминокислотных замен таким образом, что первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь принуждаются к гетеродимеризации, тогда как первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь больше не могут гомодимеризоваться (например, по стерическим причинам).

В данной области известны разные подходы для поддержки гетеродимеризации тяжелых цепей, которые были процитированы и включены выше, и они рассматриваются как другие альтернативы, используемые в мультиспецифичном антителе по изобретению, которое содержит «неспаренную область Fab», полученную из первого антитела, которая специфично связывается с первым антигеном, и «спаренную область Fab», полученную из второго антитела, которая специфично связывается со вторым антигеном, в комбинации с конкретными аминокислотными заменами, описанными выше для данного изобретения.

Домены СНЗ мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, могут быть изменены посредством технологии «выступ во впадину», которая подробно описана с несколькими примерами, например, в WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621 и Merchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681. В данном способе взаимодействующие поверхности двух доменов СНЗ изменяют для увеличения гетеродимеризации обеих тяжелых цепей, содержащих данные два домена СНЗ. Каждый из двух доменов СНЗ (двух тяжелых цепей) может быть «выступом», тогда как другой - «впадиной». Введение дисульфидного мостика дополнительно стабилизирует

гетеродимеры (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35) и увеличивает выход.

В одном предпочтительном воплощении мультиспецифичное антитело, как описано в данном документе, содержит мутацию T366W в домене CH3 «цепи выступа» и мутации T366S, L368A, Y407V в домене CH3 «цепи впадины» (нумерация согласно индексу EU по Kabat). Также может быть использован дополнительный межцепочечный дисульфидный мостик между доменами CH3 (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681), например, посредством введения мутации Y349C в домен CH3 «цепи выступа» и мутации E356C или мутации S354C в домен CH3 «цепи впадины». Таким образом, в другом предпочтительном воплощении мультиспецифичное антитело, как описано в данном документе, содержит мутации Y349C и T366W в одном из двух доменов CH3 и мутации E356C, T366S, L368A и Y407V в другом из двух доменов CH3, или мультиспецифичное антитело, как описано в данном документе, содержит мутации Y349C и T366W в одном из двух доменов CH3 и мутации S354C, T366S, L368A и Y407V в другом из двух доменов CH3 (дополнительная мутация Y349C в одном домене CH3 и дополнительная мутация E356C или S354C в другом домене CH3, образующая межцепочечный дисульфидный мостик) (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

Но также альтернативно или дополнительно можно использовать другие технологии «выступа во впадину», как описано EP 1870459 A1. В одном воплощении мультиспецифичное антитело, как описано в данном документе, содержит мутации R409D и K370E в домене CH3 «цепи выступа» и мутации D399K и E357K в домене CH3 «цепи впадины» (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В одном воплощении мультиспецифичное антитело, как описано в данном документе, содержит мутацию T366W в домене CH3 «цепи выступа» и мутации T366S, L368A и Y407V в домене CH3 «цепи впадины», и дополнительно мутации R409D и K370E в домене CH3 «цепи выступа» и мутации D399K и E357K в домене CH3 «цепи впадины» (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В одном воплощении мультиспецифичное антитело, как описано в данном документе, содержит мутации Y349C и T366W в одном из двух доменов CH3 и мутации S354C, T366S, L368A и Y407V в других двух доменах CH3, или мультиспецифичное антитело, как описано в данном документе, содержит мутации Y349C и T366W в одном из двух доменов CH3 и мутации S354C, T366S, L368A и Y407V в других двух доменах CH3 и дополнительно мутации R409D и K370E в домене CH3 «цепи выступа» и мутации D399K и E357K в домене CH3 «цепи впадины» (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

Помимо «технологии выступ во впадину» в данной области известны другие методики для модификации доменов CH3 тяжелых цепей мультиспецифичного антитела для усиления гетеродимеризации. Данные технологии, особенно технологии, описанные в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 и WO 2013/096291, рассматриваются здесь в качестве альтернатив «технологии выступ во впадину» в сочетании с мультиспецифичным антителом, как описано в данном документе.

В одном воплощении мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, для поддержки гетеродимеризации первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи мультиспецифичного антитела используется подход, описанный в EP 1870459. Данный подход основывается на введении заряженных аминокислот с противоположными зарядами в конкретные положения аминокислот на поверхности контакта доменов CH3/CH3 между обеими - первой и второй тяжелыми цепями.

Соответственно, данное воплощение относится к мультиспецифичному антителу, как описано в данном документе, где в третичной структуре антитела домен СНЗ первой тяжелой цепи и домен СНЗ второй тяжелой цепи образуют поверхность контакта, которая расположена между соответствующими доменами СНЗ антитела, где каждая из соответствующих аминокислотных последовательностей домена СНЗ первой тяжелой цепи и домена СНЗ второй тяжелой цепи содержит набор аминокислот, которые расположены в пределах указанной поверхности контакта в третичной структуре антитела, где из набора аминокислот, которые расположены на поверхности контакта в домене СНЗ одной тяжелой цепи первая аминокислота заменена на положительно заряженную аминокислоту, и из набора аминокислот, которые расположены на поверхности контакта в домене СНЗ другой тяжелой цепи вторая аминокислота заменена на отрицательно заряженную аминокислоту. Мультиспецифичное антитело согласно данному воплощению в данном документе также называется «СНЗ(+/-)-генетически модифицированное мультиспецифичное антитело» (где сокращение «+/-» обозначает противоположно заряженные аминокислоты, которые были введены в соответствующие домены СНЗ).

В одном воплощении указанного СНЗ(+/-)-генетически модифицированного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, положительно заряженная аминокислота выбрана из К, R и Н, и отрицательно заряженная аминокислота выбрана из Е или D.

В одном воплощении указанного СНЗ(+/-)-генетически модифицированного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, положительно заряженная аминокислота выбрана из К и R, и отрицательно заряженная аминокислота выбрана из Е или D.

В одном воплощении указанного СНЗ(+/-)-генетически модифицированного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, положительно заряженная аминокислота представляет собой К, и отрицательно заряженная аминокислота представляет собой Е.

В одном воплощении указанного СНЗ(+/-)-генетически модифицированного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, в домене СНЗ одной тяжелой цепи аминокислота R в положении 409 заменена на D, и аминокислота К в положении заменена на Е, и в домене СНЗ другой тяжелой цепи аминокислота D в положении 399 заменена на К, и аминокислота Е в положении 357 заменена на К (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В одном воплощении мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, для поддержки гетеродимеризации первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи мультиспецифичного антитела используется подход, описанный в WO 2013/157953. В одном воплощении указанного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, в домене СНЗ одной тяжелой цепи аминокислота Т в положении 366 заменена на К, и в домене СНЗ другой тяжелой цепи аминокислота L в положении 351 заменена на D (нумерация согласно индексу EU по Kabat). В другом воплощении указанного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, в домене СНЗ одной тяжелой цепи аминокислота Т в положении 366 заменена на К, и аминокислота L в положении 351 заменена на К, и в домене СНЗ другой тяжелой цепи аминокислота L в положении 351 заменена на D (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В другом воплощении указанного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, в домене СНЗ одной тяжелой цепи аминокислота Т в положении 366 заменена на К, и аминокислота L в положении 351 заменена на К, и в домене СНЗ

другой тяжелой цепи аминокислота L в положении 351 заменена на D (нумерация согласно индексу EU по Kabat). Дополнительно в домене СНЗ другой тяжелой цепи содержится по меньшей мере одна из следующих замен: аминокислота Y в положении 349 заменена на E, аминокислота Y в положении 349 заменена на D, и аминокислота L в положении 368 заменена на E (нумерация согласно индексу EU по Kabat). В одном воплощении аминокислота L в положении 368 заменена на E (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В одном воплощении мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, для поддержки гетеродимеризации первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи мультиспецифичного антитела используется подход, описанный в WO 2012/058768. В одном воплощении указанного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, в домене СНЗ одной тяжелой цепи аминокислота L в положении 351 заменена на Y, и аминокислота Y в положении 407 заменена на A, и в домене СНЗ другой тяжелой цепи аминокислота T в положении 366 заменена на A, и аминокислота K в положении 409 заменена на F (нумерация согласно индексу EU по Kabat). В другом воплощении в домене СНЗ другой тяжелой цепи, помимо вышеупомянутых замен, заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положениях 411 (исходно T), 399 (исходно D), 400 (исходно S), 405 (исходно F), 390 (исходно N) и 392 (исходно K) (нумерация согласно индексу EU по Kabat). Предпочтительными заменами являются следующие:

- замена аминокислоты T в положении 411 аминокислотой, выбранной из N, R, Q, K, D, E и W (нумерация согласно индексу EU по Kabat),
- замена аминокислоты D в положении 399 аминокислотой, выбранной из R, W, Y и K (нумерация согласно индексу EU по Kabat),
- замена аминокислоты S в положении 400 аминокислотой, выбранной из E, D, R и K (нумерация согласно индексу EU по Kabat),
- замена аминокислоты F в положении 405 аминокислотой, выбранной из I, M, T, S, V и W (нумерация согласно индексу EU по Kabat),
- замена аминокислоты N в положении 390 аминокислотой, выбранной из R, K и D (нумерация согласно индексу EU по Kabat) и
- замена аминокислоты K в положении 392 аминокислотой, выбранной из V, M, R, L, F и E (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В другом воплощении указанного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе (генетически модифицированное согласно WO 2012/058768), в домене СНЗ одной тяжелой цепи аминокислота L в положении 351 заменена на Y, и аминокислота Y в положении 407 заменена на A, и в домене СНЗ другой тяжелой цепи аминокислота T в положении 366 заменена на V, и аминокислота K в положении 409 заменена на F (нумерация согласно индексу EU по Kabat). В другом воплощении указанного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, в домене СНЗ одной тяжелой цепи аминокислота Y в положении 407 заменена на A, и в домене СНЗ другой тяжелой цепи аминокислота T в положении 366 заменена на A, и аминокислота K в положении 409 заменена на F (нумерация согласно индексу EU по Kabat). В указанном последнем вышеупомянутом воплощении в домене СНЗ указанной другой тяжелой цепи аминокислота K в положении 392 заменена на E, аминокислота T в положении 411 заменена на E, аминокислота D в положении 399 заменена на R, и аминокислота S в положении 400 заменена на R (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В одном воплощении мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, для поддержки гетеродимеризации первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи

мультиспецифичного антитела используется подход, описанный в WO 2011/143545. В одном воплощении указанного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, в домены СНЗ обеих тяжелых цепей вводятся модификации аминокислот в положениях 368 и/или 409 (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

5 В одном воплощении мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, для поддержки гетеродимеризации первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи мультиспецифичного антитела используется подход, описанный в WO 2011/090762. WO 2011/090762 относится к модификациям аминокислот согласно технологии «выступ во впадину». В одном воплощении указанного СНЗ(KiH)-генетически модифицированного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, в домене СНЗ одной тяжелой цепи аминокислота Т в положении 366 заменена на W, и в домене СНЗ другой тяжелой цепи аминокислота Y в положении 407 заменена на A (нумерация согласно индексу EU по Kabat). В другом воплощении указанного СНЗ(KiH)-генетически модифицированного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, в домене СНЗ одной тяжелой цепи аминокислота Т в положении 366 заменена на Y, и в домене СНЗ другой тяжелой цепи аминокислота Y в положении 407 заменена на Т (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В одном воплощении мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, которое принадлежит к изотипу IgG2, для поддержки гетеродимеризации первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи мультиспецифичного антитела используется подход, описанный в WO 2011/090762.

В одном воплощении мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, для поддержки гетеродимеризации первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи мультиспецифичного антитела используется подход, описанный в WO 2009/089004. В одном воплощении указанного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, в домене СНЗ одной тяжелой цепи аминокислота К или N в положении 392 заменена на отрицательно заряженную аминокислоту (в одном предпочтительном воплощении - на Е или D, в одном предпочтительном воплощении - на D), и в домене СНЗ другой тяжелой цепи аминокислота D в положении 399, аминокислота Е или D в положении 356, или аминокислота Е в положении 357 заменена на положительно заряженную аминокислоту (в одном предпочтительном воплощении - на К или R, в одном предпочтительном воплощении - на К, в одном предпочтительном воплощении аминокислоты в положениях 399 или 356 заменены на К) (нумерация согласно индексу EU по Kabat). В одном дополнительном воплощении, помимо вышеупомянутых замен, в домене СНЗ одной тяжелой цепи аминокислота К или R в положении 409 заменена на отрицательно заряженную аминокислоту (в одном предпочтительном воплощении - на Е или D, в одном предпочтительном воплощении - на D) (нумерация согласно индексу EU по Kabat). В еще одном другом воплощении, помимо или в качестве альтернативы вышеупомянутым заменам, в домене СНЗ одной тяжелой цепи аминокислота К в положении 439 и/или аминокислота К в положении 370 независимо друг от друга заменены на отрицательно заряженную аминокислоту (в одном предпочтительном воплощении - на Е или D, в одном предпочтительном воплощении - на D) (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В одном воплощении мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, для поддержки гетеродимеризации первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи мультиспецифичного антитела используется подход, описанный в WO 2007/147901. В одном воплощении указанного мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, в домене СНЗ одной тяжелой цепи аминокислота К в положении 253 заменена

на Е, аминокислота D в положении 282 заменена на К, и аминокислота К в положении 322 заменена на D, и в домене СН3 другой тяжелой цепи аминокислота D в положении 239 заменена на К, аминокислота Е в положении 240 заменена на К, и аминокислота К в положении 292 заменена на D (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

5 В одном воплощении мультиспецифичного антитела, как описано в данном документе, для поддержки гетеродимеризации первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи мультиспецифичного антитела используется подход, описанный в WO 2007/110205.

В одном воплощении всех аспектов и воплощений, как описано в данном документе, мультиспецифичное антитело представляет собой биспецифичное антитело или
10 триспецифичное антитело. В одном предпочтительном воплощении изобретения мультиспецифичное антитело представляет собой биспецифичное антитело.

В одном воплощении всех аспектов, как описано в данном документе, антитело представляет собой двухвалентное или трехвалентное антитело. В одном воплощении данное антитело представляет собой двухвалентное антитело.

15 В одном воплощении всех аспектов, как описано в данном документе, мультиспецифичное антитело имеет структуру константного домена антитела типа IgG. В одном другом воплощении всех аспектов, как описано в данном документе, мультиспецифичное антитело характеризуется тем, что указанное мультиспецифичное антитело принадлежит к человеческому подклассу IgG1 или к человеческому подклассу
20 IgG1 с мутациями L234A и L235A. В одном другом воплощении всех аспектов, как описано в данном документе, мультиспецифичное антитело характеризуется тем, что указанное мультиспецифичное антитело принадлежит к человеческому подклассу IgG2. В одном другом воплощении всех аспектов, как описано в данном документе, мультиспецифичное антитело характеризуется тем, что указанное мультиспецифичное
25 антитело принадлежит к человеческому подклассу IgG3. В одном другом воплощении всех аспектов, как описано в данном документе, мультиспецифичное антитело характеризуется тем, что указанное мультиспецифичное антитело принадлежит к человеческому подклассу IgG4 или к человеческому подклассу IgG4 с дополнительной мутацией S228P. В одном другом воплощении всех аспектов, как описано в данном
30 документе, мультиспецифичное антитело характеризуется тем, что указанное мультиспецифичное антитело принадлежит к человеческому подклассу IgG1 или к человеческому подклассу IgG4. В одном другом воплощении всех аспектов, как описано в данном документе, мультиспецифичное антитело характеризуется тем, что указанное мультиспецифичное антитело принадлежит к человеческому подклассу IgG1 с мутациями
35 L234A и L235A (нумерация согласно индексу EU по Kabat). В одном другом воплощении всех аспектов, как описано в данном документе, мультиспецифичное антитело характеризуется тем, что указанное мультиспецифичное антитело принадлежит к человеческому подклассу IgG1 с мутациями L234A, L235A и P329G (нумерация согласно индексу EU по Kabat). В одном другом воплощении всех аспектов, как описано в данном
40 документе, мультиспецифичное антитело характеризуется тем, что указанное мультиспецифичное антитело принадлежит к человеческому подклассу IgG4 с мутациями S228P и L235E (нумерация согласно индексу EU по Kabat). В одном другом воплощении всех аспектов, как описано в данном документе, мультиспецифичное антитело характеризуется тем, что указанное мультиспецифичное антитело принадлежит к
45 человеческому подклассу IgG4 с мутациями S228P, L235E и P329G (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В одном воплощении всех аспектов, как описано в данном документе, антитело, содержащее тяжелую цепь, включающую домен СН3, как определено в данном

документе, содержит дополнительный С-концевой глицин-лизиновый дипептид (G446 и K447, нумерация согласно индексу EU по Kabat). В одном воплощении всех аспектов, как описано в данном документе, антитело, содержащее тяжелую цепь, включающую домен СНЗ, как определено в данном документе, содержит дополнительный С-концевой остаток глицина (G446, нумерация согласно индексу EU по Kabat).

5. Варианты антител

В некоторых воплощениях рассматриваются предложенные в данном документе варианты аминокислотной последовательности антител. Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены введением подходящих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или посредством пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции из и/или вставки в, и/или замены остатков в пределах аминокислотных последовательностей антитела. Можно сделать любую комбинацию делеции, вставки и замены для получения конечной конструкции, при условии, что данная конечная конструкция обладает желательными характеристиками, например, связывания антигена.

а) Варианты с заменой, вставкой и делецией

В некоторых воплощениях предложены варианты антитела, имеющие одну или более чем одну аминокислотную замену. Интересующие сайты для мутагенеза, приводящего к заменам, включают HVR и FR. Консервативные замены показаны в Таблице 1 под заголовком «консервативные замены». В Таблице 1 предложены более существенные замены под заголовком «типичные замены», и, как описано далее ниже по отношению к классам боковых цепей аминокислот. В интересующее антитело могут быть введены аминокислотные замены, и продукты подвергаются скринингу в отношении желательной активности, например, сохраненного/улучшенного связывания антигена, пониженной иммуногенности или улучшенной ADCC или CDC.

ТАБЛИЦА 1

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

Аминокислоты могут быть сгруппированы согласно общим свойствам боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены будут влечь за собой замену члена одного из данных классов на другой класс.

Один тип варианта с заменами включает замену одного или более чем одного остатка гипервариабельной области родительского антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). В общем, полученный(ные) в результате вариант(ты), отобранный(ные) для дальнейшего исследования, будет(дут) иметь модификации (например, улучшения) некоторых биологических свойств (например, повышенную аффинность, пониженную иммуногенность) относительно родительского антитела и/или будет(дут) иметь по существу сохраняющиеся определенные биологические свойства родительского антитела. Типичным вариантом с заменами является антитело с созревшей аффинностью, которое может быть с удобством получено, например, с использованием методик созревания аффинности на основе фагового дисплея, таких

как методики, описанные в данном документе. Вкратце, один или более чем один остаток HVR мутируется, варианты антитела подвергаются дисплею на фаге и подвергаются скринингу на определенную биологическую активность (например, аффинность связывания).

5 Изменения (например, замены) могут быть сделаны в HVR, например, для улучшения аффинности антитела. Такие изменения могут быть сделаны в «горячих точках» HVR, т.е. остатках, кодируемых кодонами, которые с высокой частотой подвергаются мутации во время процесса соматического созревания (см., например, Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196), и/или остатках, которые контактируют с антигеном, 10 причем полученные в результате варианты VH или VL тестируются на аффинность связывания. Созревание аффинности посредством конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек было описано, например, в Hoogenboom, H.R. et al. in *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37. В некоторых воплощениях созревания аффинности в выбранные для созревания вариабельные гены вводится разнообразие 15 посредством любого из целого ряда способов (например, ПЦР (полимеразная цепная реакция), склонная к ошибкам, перетасовка цепи или мутагенез, управляемый олигонуклеотидом). Затем создается вторичная библиотека. Данная библиотека затем подвергается скринингу для идентификации любых вариантов антитела с желательной аффинностью. Другой способ введения разнообразия включает подходы, направленные 20 на HVR, в которых рандомизируются несколько остатков HVR (например, 4-6 остатков за раз). Остатки HVR, участвующие в связывании антигена, могут быть специфично идентифицированы, например, с использованием мутагенеза на основе аланинового сканирования или моделирования. В частности, часто в качестве мишени используются CDR-H3 и CDR-L3.

25 В некоторых воплощениях замены, вставки или делеции могут происходить в пределах одной или более чем одной HVR, при условии, что такие изменения по существу не уменьшают способность антитела к связыванию антигена. Например, в HVR могут быть сделаны консервативные изменения (например, консервативные замены, как предложено в данном документе), которые по существу не уменьшают аффинность 30 связывания. Такие изменения, например, могут быть вне остатков, контактирующих с антигеном в HVR. В некоторых воплощениях вариантов последовательностей VH и VL, предложенных выше, каждая HVR либо является неизменной, либо содержит не больше, чем одну, две или три аминокислотные замены.

Полезный способ идентификации остатков или областей антитела, которые могут 35 служить в качестве мишени для мутагенеза, называется «мутагенезом на основе аланинового сканирования», как описано Cunningham, B.C. and Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085. В данном способе остаток или группа остатков-мишеней (например, заряженных остатков, таких как Arg, Asp, His, Lys и Glu) идентифицируется и заменяется нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или 40 полиаланином) для определения того, подвергается ли взаимодействию антитела с антигеном. Дополнительные замены могут быть введены в положениях аминокислот, демонстрирующих функциональную чувствительность к исходным заменам. В качестве альтернативы или дополнительно, может быть определена кристаллическая структура комплекса антиген-антитело для идентификации контактных точек между антителом 45 и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки могут служить в качестве мишени или устраняться в качестве кандидатов для замены. Варианты могут быть подвергнуты скринингу для определения того, имеют ли они желательные свойства.

Вставки в аминокислотную последовательность включают amino- и/или

карбоксиконцевые слияния, варьирующие по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более чем сто остатков, а также вставки внутри последовательности одиночных или многих аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие вставочные варианты молекулы антитела включают слияние с N- или C-концом антитела фермента (например, для ADEPT (антителоопосредованная терапия с использованием ферментов и пролекарств)) или полипептида, который увеличивает период полувыведения антитела в сыворотке.

б) Варианты по гликозилированию

В некоторых воплощениях предложенное в данном документе антитело изменяют для увеличения или уменьшения степени, в которой гликозилируется антитело. Добавление или делеция сайтов гликозилирования в антителе могут с удобством осуществляться посредством изменения аминокислотной последовательности таким образом, что создается или удаляется один или более чем один сайт гликозилирования.

Когда антитело содержит область Fc, может быть изменен углевод, присоединенный к ней. Природные антитела, продуцированные клетками млекопитающих, типично содержат разветвленный двухантенный олигосахарид, который обычно присоединен N-связью к Asn297 домена CH2 области Fc (см., например, Wright, A. and Morrison, S.L., *TIPTON* 15 (1997) 26-32). Данный олигосахарид может включать разные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в «стволе» структуры двухантенного олигосахарида. В некоторых воплощениях могут быть сделаны модификации олигосахарида в антителе по изобретению для того, чтобы создать варианты антитела с некоторыми улучшенными свойствами.

В одном воплощении предложены варианты антитела, имеющие структуру углевода, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или опосредованно) к области Fc. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Количество фукозы определяется посредством расчета среднего количества фукозы в пределах цепи сахара на Asn297 относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn297 (например, сложных, гибридных и высокоманнозных структур), при измерении масс-спектрометрией MALDI-TOF (временнóлетная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы), как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному примерно в положении 297 в области Fc (EU нумерация остатков области Fc); однако, Asn297 также может быть расположен примерно в плюс/минус 3 аминокислотах выше или ниже положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, из-за минорных вариаций последовательности в антителах. Такие фукозилированные варианты могут иметь улучшенную функцию ADCC. См., например, US 2003/0157108; US 2004/0093621. Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «дефицитным по фукозе» вариантам антител включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A. et al., *J. Mol. Biol.* 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. et al., *Biotech. Bioeng.* 87 (2004) 614-622. Примеры линий клеток, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают клетки CHO (яичники китайского хомяка) Lec13, дефицитные по фукозилированию белка (Ripka, J. et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 249 (1986) 533-545; US 2003/0157108 и WO 2004/056312, особенно в Примере 11), и нокаутные линии клеток,

такие как нокаутные клетки СНО по гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (см., например, Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688 и WO 2003/085107).

Кроме того, предложены варианты антител с разделенными надвое олигосахаридами, например, в которых двухантенный олигосахарид, присоединенный к области Fc антитела, разделен надвое GlcNAc. Такие варианты антител могут иметь пониженное фукозилирование и/или улучшенную функцию ADCC. Примеры таких вариантов антител описываются, например, в WO 2003/011878; US 6602684 и US 2005/0123546. Также предложены варианты антител с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к области Fc. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию CDC. Такие варианты антител описываются, например, в WO 1997/30087; WO 1998/58964 и WO 1999/22764.

в) Варианты области Fc

В некоторых воплощениях в область Fc антитела, предложенного в данном документе, могут быть введены одна или более чем одна аминокислотная модификация, генерируя, посредством этого, вариант области Fc. Данный вариант области Fc может содержать последовательность человеческой области Fc (например, области Fc человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или более чем одном положении аминокислоты.

В некоторых воплощениях согласно данному изобретению рассматривается вариант антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, которые делают его желательным кандидатом для применений, в которых важным является период полувыведения антитела *in vivo*, тем не менее, определенные эффекторные функции (такие как комплемент и ADCC) не являются необходимыми или являются вредными. Могут проводиться анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* для подтверждения уменьшения/устранения активностей CDC и/или ADCC.

Например, анализы связывания с рецептором Fc (FcR) могут проводиться для обеспечения того, что у антитела отсутствует связывание с FcγR (следовательно, вероятно отсутствует активность ADCC), но сохраняется способность к связыванию с FcRn. У первичных клеток для опосредования ADCC - клеток NK - экспрессируется только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гематopoэтических клетках обобщена в Таблице 3 на странице 464 Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки активности ADCC интересующей молекулы описываются в US 5500362 (см., например, Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063 и Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502); US 5821337 (см. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361). В качестве альтернативы, можно использовать способы нерадиоактивного анализа (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТТ[™] для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Mountain

View, CA; и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96[®] (Promega, Madison, WI). Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают одноядерные клетки периферической крови (PBMC) и клетки-природные киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно, активность ADCC интересующей молекулы можно оценивать *in vivo*, например, в такой животной модели, как модель, раскрытая в Clynes, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. Также можно проводить анализы связывания C1q для подтверждения того, что антитело не способно связываться с C1q и, следовательно, не имеет активности CDC. См., например, ELISA связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента можно проводить анализ CDC

(см., например, Gazzano-Santoro, H. et al., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S. et al., Blood 101 (2003) 1045-1052 и Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743). Связывание с FcRn и определения клиренса/периода полувыведения *in vivo* также можно проводить с использованием способов, известных в данной области (см.,

5 например, Petkova, S.B. et al., Int. Immunol. 18 (2006): 1759-1769).

Антитела с пониженной эффекторной функцией включают антитела с заменой одного или более чем одного остатка области Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (US 6737056). Такие мутанты Fc включают мутантов Fc с заменами в двух или более чем двух

10 положениях аминокислот 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант Fc «DANA» с заменой остатков 265 и 297 на аланин (US 7332581).

Описаны некоторые варианты антител с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR (см., например, US 6737056; WO 2004/056312 и Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

В некоторых воплощениях вариант антитела содержит область Fc с одной или более

15 чем одной аминокислотной заменой, которая улучшает ADCC, например, с заменами в положениях 298, 333 и/или 334 области Fc (EU нумерация остатков).

В некоторых воплощениях в области Fc делаются изменения, которые приводят к измененным (т.е. либо улучшенным, либо уменьшенным) связыванию с C1q и/или

20 комплементзависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в US 6194551, WO 99/51642 и Idusogie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184.

Антитела с увеличенными периодами полувыведения и улучшенным связыванием с неонатальным рецептором Fc (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG в

плод (Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593 и Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24

(1994) 2429-2434), описываются в US 2005/0014934. Данные антитела содержат область

25 Fc с одной или более чем одной заменой в ней, которая улучшается связывание области Fc с FcRn. Такие варианты Fc включают варианты с заменами в одном или более чем

одном остатке Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, с заменой остатка 434 области Fc (US

7371826).

30 См. также Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; US 5648260; US 5624821 и WO 94/29351 относительно других примеров вариантов области Fc.

г) Варианты антител, модифицированные по цистеину

В некоторых воплощениях может быть желательным создание антител, модифицированных по цистеину, например, «тиоМАб», в которых один или более чем

35 один остаток антитела заменен остатком цистеина. В конкретных воплощениях замененные остатки встречаются в доступных сайтах антитела. Посредством замены

данных остатков на цистеин реакционноспособные тиольные группы располагаются в доступных сайтах антитела и могут быть использованы для конъюгирования антитела с другими группировками, такими как группировки лекарственных средств или

40 группировки линкер-лекарственное средство, с созданием иммуноконъюгата, как описано в данном документе далее. В некоторых воплощениях любой один или более чем один из следующих остатков может быть заменен на цистеин: V205 (нумерация по

Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой цепи и S400 (нумерация EU) тяжелой

цепи области Fc. Антитела, модифицированные по цистеину, могут быть получены, как

45 описано, например, в US 7521541.

д) Производные антител

В некоторых воплощениях предложенное в данном документе антитело может быть

дополнительно модифицировано так, чтобы оно содержало дополнительные небелковые

группировки, которые известны в данной области и являются легкодоступными.

Группировки, подходящие для дериватизации антитела, включают водорастворимые полимеры, но не ограничиваются ими. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоля/

пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1, 3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо случайные сополимеры) и декстран или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль,

гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси, но не ограничиваются ими. Полиэтиленгликольпропиональдегид может иметь преимущества в производстве из-за его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Число полимеров, присоединенных к антителу, может варьировать, и, при присоединении более чем одного полимера, они могут быть одинаковыми или разными молекулами.

В общем, число и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, могут определяться на основе соображений, включающих конкретные свойства или функции антитела, подлежащие улучшению, но не ограничивающиеся ими, независимо от того, будет ли производное антитела использоваться в терапии при определенных условиях, и т.д.

В другом воплощении предложены конъюгаты антитела и небелковой группировки, которая может быть селективно нагрета под воздействием радиации. В одном воплощении небелковая группировка представляет собой углеродную нанотрубку (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). Радиация может иметь любую длину волны и включает длины волн, которые не причиняют вреда обычным клеткам, но которые нагревают небелковую группировку до температуры, при которой умерщвляются клетки, приближенные к небелковой группировке антитела, но не ограничиваются ими.

Б. Челночные модули гематоэнцефалического барьера

В одном воплощении всех аспектов антитело представляет собой мультиспецифичное антитело, имеющее по меньшей мере одну специфичность связывания в отношении трансферринового рецептора и по меньшей мере одну специфичность связывания в отношении терапевтической мишени. В одном воплощении антитело содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с трансферриновым рецептором, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с мозговым антигеном. В другом воплощении мозговой антиген выбран из группы, состоящей из Абета, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора 2 человеческого эпидермального фактора роста (HER2), альфа-синуклеина, CD20, глюкоцереб্রозидазы или белка-предшественника амилоида (APP). В одном предпочтительном воплощении мультиспецифичное антитело связывается с обоими из следующих:

- i) трансферриновый рецептор и Абета, или
- ii) трансферриновый рецептор и CD20, или
- iii) трансферриновый рецептор и альфа-синуклеин, или
- iv) трансферриновый рецептор и фосфо-тау, или
- v) трансферриновый рецептор и HER2, или
- vi) трансферриновый рецептор и глюкоцереб্রозидаза.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID

NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 81 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 82 сайта связывания в отношении Абета.

5 В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 79 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 10 80 сайта связывания в отношении человеческого CD20. В одном воплощении переменная область тяжелой цепи содержит замену аминокислотного остатка в положении 11 по Kabat на любую аминокислоту, но не лейцин. В одном воплощении данная замена включает замену аминокислотного остатка в положении 11 по Kabat на неполярную аминокислоту. В одном предпочтительном воплощении данная замена 15 включает замену аминокислотного остатка в положении 11 по Kabat в переменном домене тяжелой цепи SEQ ID NO 79 на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из валина, лейцина, изолейцина, серина и фенилаланина.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID 20 NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 83 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 84 сайта связывания в отношении человеческого альфа-синуклеина.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, 25 содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару гуманизированного переменного домена тяжелой цепи, полученного из SEQ ID NO 85, и гуманизированного переменного домена легкой цепи, полученного из SEQ ID 30 NO 86, сайта связывания в отношении человеческого альфа-синуклеина.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару 35 гуманизированного переменного домена тяжелой цепи, полученного из SEQ ID NO 87, и гуманизированного переменного домена легкой цепи, полученного из SEQ ID NO 88, сайта связывания в отношении человеческого альфа-синуклеина.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID 40 NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару гуманизированного переменного домена тяжелой цепи, полученного из SEQ ID NO 89, и гуманизированного переменного домена легкой цепи, полученного из SEQ ID NO 90, сайта связывания в отношении человеческого альфа-синуклеина.

45 В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 37, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару

ID NO 92, сайта связывания в отношении человеческого альфа-синуклеина.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 7 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 34, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и по меньшей мере одну пару гуманизированного переменного домена тяжелой цепи, происходящего из SEQ ID NO 93, и гуманизированного переменного домена легкой цепи, происходящего из SEQ ID NO 94, сайта связывания в отношении человеческого альфа-синуклеина.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее по меньшей мере одну пару переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO 7 и переменного домена легкой цепи SEQ ID NO 34, образующую сайт связывания в отношении трансферринового рецептора, и сайт связывания в отношении человеческой глюкоцереброзидазы.

Одновалентные связывающие соединения, которые специфично связываются с рецептором гематоэнцефалического барьера, могут быть охарактеризованы в отношении их свойств связывания и транцитоза:

- эффективное клеточное связывание с клетками, экспрессирующими РГЭБ, в качестве одновалентного связывающего соединения,

- эффективный транцитоз *in vitro* в качестве одновалентного связывающего соединения,

- перекрестная реактивность в отношении антигенов человека-яванского макака (например, в экспериментах BIAcore и FACS (флуоресцентная сортировка клеток)).

Скрининг на транцитоз можно проводить в анализе на основе hCMEC/D3. Данный анализ можно проводить в режиме импульсного мечения. Мозговые эндотелиальные клетки hCMEC/D3 инкубируются с одновалентным связывающим соединением в течение 1 часа, затем промываются, и в 0 часов и 4 часа после промывки определяются следующие параметры:

- i) количество одновалентного связывающего соединения, поглощенного в клетки на протяжении стадии загрузки,

- ii) базолатеральное количество одновалентного связывающего соединения через 4 часа после загрузки и промывки;

- iii) апикальное количество одновалентного связывающего соединения через 4 часа после загрузки и промывки;

- iv) количество одновалентного связывающего соединения в клетках (посредством лизиса в клетках) через 0 часов и 4 часа после загрузки и промывки;

- v) общее количество одновалентного связывающего соединения через 0 часов и 4 часа после загрузки и промывки.

Для того чтобы быть подходящим в качестве одновалентного связывающего соединения в челночном модуле гематоэнцефалического барьера, как описано в данном документе, антитело против трансферринового рецептора (например, в виде одновалентного связывающего соединения) должно: i) поглощаться клетками hCMEC/D3 (эндоцитоз), ii) транспортироваться из клеток hCMEC/D3 (экзоцитоз) и iii) быть стабильным в клетках hCMEC/D3 (нет транспорта или слабый транспорт в эндосому для деградации).

Таким образом, в одном воплощении одновалентное связывающее соединение характеризуется в анализе на основе hCMEC/D3 по i) (существенному) поглощению в клетки hCMEC/D3 на протяжении одночасового периода загрузки, ii) высвобождению в апикальный и/или базолатеральный компартмент после периода загрузки и стадии

промывки в пределах 4 часов после промывки и iii) низкой скорости (внутриклеточной) деградации.

В одном воплощении загрузка осуществляется в концентрации одновалентного связывающего соединения примерно 2,67 мкг/мл в течение одного часа.

5 Обнаружили то, что одновалентное связывающее соединение для того, чтобы быть подходящим в качестве одновалентного связывающего соединения челночного модуля гематоэнцефалического барьера, как описано в данном документе, должно демонстрировать в вышеописанном анализе на основе hCMEC/D3 следующие пороговые значения;

- 10 i) количество одновалентного связывающего соединения, поглощенного в клетки во время стадии загрузки - 400 пг или более,
- ii) базолатеральное количество одновалентного связывающего соединения через 4 часа после загрузки и промывки - 100 пг или более, и
- 15 iii) апикальное количество одновалентного связывающего соединения через 4 часа после загрузки и промывки - 150 пг или более.

Мышиное антитело 128.1 против человеческого трансферринового рецептора (относительно последовательностей варибельной области, см. WO 93/10819 и SEQ ID NO 64 и 65) может быть принято в качестве контроля. В данном случае одновалентное связывающее соединение для того, чтобы быть подходящим в качестве одновалентного

20 связывающего соединения челночного модуля гематоэнцефалического барьера, как описано в данном документе, должно демонстрировать в вышеописанном анализе на основе hCMEC/D3 следующие пороговые значения:

- i) количество одновалентного связывающего соединения, поглощенного в клетки во время стадии загрузки 60% или более от загрузки антитела 128.1,
- 25 ii) базолатеральное количество одновалентного связывающего соединения через 4 часа после загрузки и промывки - 60% или более от базолатерального количества антитела 128.1; и
- iii) апикальное количество одновалентного связывающего соединения через 4 часа после загрузки и промывки - 60% или более от апикального количества антитела 128.1.

30 Анализ на основе hCMEC/D3 может быть проведен следующим образом (это в одном воплощении всех аспектов, как описано в данном документе):

Среда и добавки для hCMEC/D3 (см. WO 2006/056879 и Weksler, B.B., et al., FASEB J. 19 (2005) 1872-1874) может быть приобретена у Lonza. Клетки hCMEC/D3 (пассажи 26-29) культивируются/могут культивироваться до конфлюентности на покровных стеклах (микроскопических), покрытых коллагеном, или в колбах в среде EBM2, содержащей

35 2,5% FBS (фетальная телячья сыворотка), четверть поставленных факторов роста, и полностью дополненной поставленными гидрокортизоном, гентамицином и аскорбиновой кислотой.

Для всех анализов транскитоza используются/могут быть использованы вставки

40 фильтра из PET (полиэтилентерефталат) мембраны с порами высокой плотности (1×10^8 пор/см²) (размер пор 0,4 мкм, диаметр 12 мм) в 12-луночных планшетах для культуры клеток. Рассчитывается, что объемы сред составляют 400 мкл и 1600 мкл для апикальной и базолатеральной камер соответственно. Апикальные камеры вставок фильтра

45 покрываются/могут быть покрыты коллагеном I хвоста крысы (7,5 мкг/см²), с последующим покрытием фибронектином (5 мкг/мл), причем каждая инкубация длится в течение одного часа при RT (комнатная температура). Клетки hCMEC/D3 выращиваются/могут быть выращены до конфлюентных монослоев ($\sim 2 \times 10^5$ клеток/

см²) в течение 10-12 суток в среде EBM2. Пустые фильтры блокируются/могут быть заблокированы в PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), содержащем 1% BSA (бычий сывороточный альбумин), в течение 1 часа или в течение ночи (o/n) перед анализом и затем калибруются в течение по меньшей мере 1 часа в EBM2 до анализа.

Анализ (относительно схемы анализа см. Фиг. 1) проводили в бессывороточной среде EBM2, которую в иных случаях растворяли, как описано в данном документе. В сутки анализа клетки голодали в отношении сыворотки в течение 60 мин для истощения природного лиганда рассматриваемого рецептора гематоэнцефалического барьера. Вставки фильтра с клетками или без них (но заблокированные в течение ночи в полной среде) апикально инкубировали с рассматриваемыми моноклональными антителами (одновалентное связывающее соединение) в течение 1 часа при 37°C. Монослой промывали при комнатной температуре (RT) в бессывороточной среде апикально (400 мкл) и базолатерально (1600 мкл) три раза каждый раз в течение 3-5 мин.

Предварительно нагретую среду добавляли в апикальную камеру, и фильтры переносили в свежий 12-луночный планшет (блокированный в течение ночи PBS, содержащим 1% BSA), содержащий 1600 мкл предварительно нагретой среды. В этот момент фильтры с клетками или без клеток лизировали в 500 мкл буфера RIPA для того, чтобы определить поглощение специфического антитела (одновалентного связывающего соединения).

Остающиеся фильтры инкубировали при 37°C или при 4°C, и образцы отбирали в разные моменты времени для определения апикального и/или базолатерального высвобождения антитела (одновалентного связывающего соединения). Содержание антитела в образцах можно количественно измерять с использованием высокочувствительного ELISA на IgG (см. Пример 9). Для каждого момента времени должны быть получены данные от двух пустых фильтров и трех клеточных культур на фильтре.

В. Способы и композиции генной инженерии

Антитела могут быть получены с использованием способов и композиций генной инженерии, например, как описано в US 4816567. В одном воплощении предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против трансферринового рецептора, описанное в данном документе. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). В другом воплощении предложен один или более чем один вектор (например, экспрессионный вектор), содержащий такую нуклеиновую кислоту. В другом воплощении предложена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном таком воплощении клетка-хозяин содержит (например, была трансформирована): (1) вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В одном воплощении клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомяка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp20). В одном воплощении предложен способ получения антитела против трансферринового рецептора, где данный способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как предложено выше, при подходящих условиях для экспрессии антитела и, возможно, выделение антитела из клетки-хозяина (или культуральной среды клеток-

хозяев).

Для рекомбинантной продукции антитела против трансферринового рецептора нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и вставляют в один или более чем один вектор для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такую нуклеиновую кислоту можно легко выделять и секвенировать с использованием традиционных методик (например, посредством применения олигонуклеотидных зондов, которые способны к специфичному связыванию с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела).

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в данном документе. Например, антитела могут быть продуцированы в бактериях, в частности, когда не требуются гликозилирование и эффекторная функция Fc.

Относительно экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях, см., например, US 5648237, US 5789199 и US 5840523. (См. также Charlton, K.A., In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, описывающую экспрессию фрагментов антитела в *E. coli*). После экспрессии антитело может быть выделено из пасты бактериальных клеток в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

Помимо прокариотов, подходящими хозяевами клонирования или экспрессии для векторов, кодирующих антитело, являются эукариотические микробы, такие как нитчатые грибки или дрожжи, включающие штаммы грибков и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», приводя к продукции антитела с частично или полностью человеческой картиной гликозилирования. См. Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414 и Li, H. et al., *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела также происходят из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые можно использовать в сочетании с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Культуры клеток растений также можно использовать в качестве хозяев. См., например, US 5959177, US 6040498, US 6420548, US 7125978 и US 6417429 (описывающие технологию PLANTIBODIES™ для продуцирования антител в трансгенных растениях).

В качестве хозяев также можно использовать клетки позвоночных. Например, могут быть полезными линии клеток млекопитающих, которые адаптированы для роста в суспензии. Другими примерами полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональной почки человека (293 или клетки 293, как описано, например, в Graham, F.L. et al., *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74); клетки эмбриональной почки хомяка (BHK); мышинные клетки сертоли (клетки TM4, как описано, например, в Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени серой крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather, J.P. et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68; клетки MRC 5 и клетки FS4. Другие полезные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), включающие клетки CHO DHFR⁻ (негативные по дегидрофолатредуктазе) (Urlaub, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77

(1980) 4216-4220), и миеломные линии клеток, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Относительно обзора определенных линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продукции антител, см., например, Yazaki, P. and Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

5 Г. Анализы

Предложенные в данном документе антитела против трансферринового рецептора могут быть идентифицированы, подвергнуты скринингу или охарактеризованы на их физические/химические свойства и/или биологические активности посредством разных анализов, известных в данной области.

10 1. Анализ связывания

В одном аспекте антитело по изобретению тестируется на его антигенсвязывающую активность, например, посредством известных способов, таких как ELISA, alphaLISA, вестерн-блоттинга, микромножества антител или метода чипов с обращенной фазой и т.д.

15 В типичном анализе ELISA или alphaLISA трансферриновый рецептор в растворе (супернатант клеток, лизаты клеток или тканей, жидкости организма и т.д.) связывается захватывающим антителом, которое специфично связывается с первым эпитопом на трансферриновом рецепторе, или с трансферриновым рецептором в определенной конформации, и выявляющим антителом, связанным с выявляющим соединением, 20 которое специфично связывается со вторым эпитопом или конформацией трансферринового рецептора. Показатель основывается на выявляющем соединении (хемилюминисценция, флуоресценция, люминисценция, индуцированная переносом энергии, и т.д.).

В случае антительного чипа антитела наносятся в виде пятен на стеклянные или 25 нитроцеллюлозные чипы. Данные чипы блокируют и инкубируют с раствором, содержащим трансферриновый рецептор, промывают для удаления несвязавшихся антител, и связавшиеся антитела выявляют соответствующим флуоресцентно меченым вторичным антителом. Флуоресцентный сигнал измеряется посредством сканера флуоресцентных чипов. Аналогичным образом, для чипа с обращенной фазой 30 рекомбинантный трансферриновый рецептор, супернатант клеток, лизаты клеток или тканей, жидкости организма и т.д. наносятся в виде пятен на стеклянные или нитроцеллюлозные чипы. Данные чипы блокируют, и индивидуальные чипы инкубируют с антителом против специфического эпитопа на трансферриновом рецепторе. Несвязавшиеся антитела отмывают, и связавшиеся антитела выявляют соответствующим 35 флуоресцентно меченым вторичным антителом. Флуоресцентный сигнал измеряется посредством сканера флуоресцентных чипов (Dernick, G., et al., *J. Lipid Res.* 52 (2011) 2323-2331).

Д. Способы и композиции для диагностики и выявления

40 В некоторых воплощениях любое из предложенных в данном документе антител против трансферринового рецептора является полезным для выявления присутствия человеческого трансферринового рецептора в биологическом образце. Термин «выявление» в том виде, в котором он используется в данном документе, охватывает количественное или качественное выявление. В некоторых воплощениях биологический образец содержит клетку или ткань, такую как мозговая ткань.

45 В одном воплощении предложено антитело против трансферринового рецептора для применения в способе диагностики или выявления. В другом аспекте предложен способ выявления присутствия трансферринового рецептора в биологическом образце. В некоторых воплощениях данный способ включает приведение биологического образца

в контакт с антителом против трансферринового рецептора, как описано в данном документе, при пермиссивных условиях для связывания антитела против трансферринового рецептора с трансферриновым рецептором и выявление того, образуется ли комплекс между антителом против трансферринового рецептора и трансферриновым рецептором. Такой способ может представлять собой способ *in vitro* или *in vivo*. В одном воплощении антитело против трансферринового рецептора используется для отбора субъектов, подходящих для терапии антителом против трансферринового рецептора, например, где трансферриновый рецептор представляет собой биомаркер для отбора пациентов.

Типичные расстройства, которые можно диагностировать с использованием антитела по изобретению включают нейродегенерацию с накоплением в мозгу железа типа 1 (NBIA1), синдром Бредбери-Эгглстона, синдром Дауна, комплекс Гуам и несколько расстройств с тельцами Леви, таких как деменция с тельцами Леви (DLBD), вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), некоторые формы болезни Гоше и деменцию при болезни Паркинсона (PDD).

В некоторых воплощениях предложены меченые антитела против трансферринового рецептора. Метки включают метки или группировки, которые выявляются непосредственно (такие как флуоресцентные, хромофорные, электронноплотные, хемилюминисцентные и радиоактивные метки), а также группировки, такие как ферменты или лиганды, которые выявляются опосредованно, например, через ферментативную реакцию или молекулярное взаимодействие, но не ограничиваются ими. Типичные метки включают радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных металлов или флуоресцеин и их производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люциферазу светляка и бактериальную люциферазу (US 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, сахаридоксидазы, например, глюкозооксидазу, галактозооксидазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, гетероциклические оксидазы, такие как уриказу и ксантиноксидазу, связанные с ферментом, который использует пероксид водорода для окисления предшественника красителя, таким как HRP (пероксидаза хрена), лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки, бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы и тому подобное, но не ограничиваются ими.

Е. Фармацевтические препараты

Фармацевтические препараты антитела против трансферринового рецептора, как описано в данном документе, получают смешиванием такого антитела, имеющего желательную степень чистоты, с одним или более чем одним возможным фармацевтически приемлемым носителем (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)), в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях и включают: буферы, такие как фосфатный, цитратный и на основе других органических кислот; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид; бензэтония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (меньше, чем примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные

полимеры, такие как поли(винилпирролидон); аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающие глюкозу, маннозу или декстрины; хелаторы, такие как EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота); сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG), но не ограничиваются ими. Типичные фармацевтически приемлемые носители в данном документе дополнительно включают агенты для диспергирования лекарственного средства в кишечнике, такие как растворимые нейтрально-активные гиалуронидазные гликопротеины (sHASEGP), например, человеческие растворимые гиалуронидазные гликопротеины PH-20, такие как rhuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Некоторые типичные sHASEGP и способы применения, включая rhuPH20, описываются в US 2005/0260186 и US 2006/0104968. В одном аспекте sHASEGP объединяется с одной или более чем одной дополнительной гликозаминогликаназой, такой как хондроитиназа.

Типичные лиофилизированные препараты антител описываются в US 6267958. Водные препараты антител включают препараты, описанные в US 6171586 и WO 2006/044908, причем последние препараты включают гистидин-ацетатный буфер.

Описанный в данном документе препарат также может содержать более чем один активный ингредиент, необходимый для конкретного показания, которое лечат, предпочтительно ингредиенты с взаимодополняющими активностями, которые не оказывают вредного влияния друг на друга. Такие активные ингредиенты, подходящим образом, присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для намеченной цели.

Активные ингредиенты могут быть захвачены в микрокапсулы, полученные, например, методиками коацервации или посредством полимеризации на границе раздела фаз, например, в гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и в поли-(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственного средства (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980).

Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, которые находятся в виде формованных предметов, например, пленок или микрокапсул.

Препараты, подлежащие применению для введения *in vivo*, обычно являются стерильными. Стерильность может легко достигаться, например, посредством фильтрования через мембраны для стерилизующего фильтрования.

Ж. Терапевтические способы и композиции

Любое из предложенных в данном документе антител против TfR можно использовать в терапевтических способах. В одном аспекте предложено антитело против TfR для применения в качестве лекарственного средства. Например, согласно изобретению предложен способ транспортировки терапевтического соединения через гематоэнцефалический барьер, включающий экспонирование антитела против TfR, связанного с терапевтическим соединением (например, мультиспецифичного антитела, которое связывается с TfR, и с мозговым антигеном), ГЭБ таким образом, что данное антитело транспортирует терапевтическое соединение, связанное с ним, через ГЭБ. В другом примере согласно изобретению предложен способ транспортировки

лекарственного средства против неврологического расстройства через гематоэнцефалический барьер, включающий экспонирование антитела против TfR по изобретению, связанного с лекарственным средством против мозгового расстройства (например, мультиспецифичного антитела, которое связывается и с TfR, и с мозговым антигеном), ГЭБ таким образом, что данное антитело транспортирует лекарственное средство против неврологического расстройства, связанное с ним, через ГЭБ. В одном воплощении ГЭБ находится у млекопитающего (например, человека), например, человека, который имеет неврологическое расстройство, включающее, без ограничения: болезнь Альцгеймера (AD), инсульт, деменцию, мышечную дистрофию (MD), рассеянный склероз (MS), боковой амиотрофический склероз (ALS), муковисцидоз, синдром Ангельмана, синдром Лиддла, болезнь Паркинсона, болезнь Пика, болезнь Паджета, рак, травматическое повреждение мозга и т.д. В одном воплощении неврологическое расстройство выбрано из: нейропатии, амилоидоза, рака (например, с участием ЦНС или мозга), глазного заболевания или расстройства, вирусной или микробной инфекции, воспаления (например, ЦНС или мозга), ишемии, нейродегенеративного заболевания, эпилепсии, расстройства поведения, лизосомной болезни накопления и т.д. Антитела по изобретению особенно подходят для лечения таких неврологических расстройств из-за их способности транспортировать один или более чем один ассоциированный активный ингредиент/связанное терапевтическое соединение через ГЭБ и в ЦНС/мозг, где у таких расстройств находится их молекулярная, клеточная или вирусная/микробная основа. Невропатические расстройства представляют собой заболевания или нарушения нервной системы, характеризующиеся неподходящей или неконтролируемой нервной сигнализацией или ее отсутствием, и включают хроническую боль (включая ноцицептивную боль), боль, вызванную повреждением тканей организма, включающую боль, связанную с раковым заболеванием, невропатическую боль (боль, вызванная нарушениями в нервах, спинном мозге или головном мозге) и психогенную боль (полностью или главным образом связанную с психологическим расстройством), головную боль, мигрень, нейропатию и симптомы и синдромы, часто сопровождающие такие невропатические расстройства, такие как головокружение или тошнота, но не ограничиваются ими.

Против невропатического расстройства может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой анальгетик, включающий наркотический/опиоидный анальгетик (т.е. морфин, фентанил, гидрокодон, меперидин, метадон, оксиморфон, пентазоцин, пропоксифен, трамадол, кодеин и оксикодон), но не ограничивающийся ими, нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (NSAID) (т.е. ибупрофен, напроксен, диклофенак, дифлунизал, этодолак, фенопрофен, флурбипрофен, индометацин, кеторолак, мефенамовая кислота, мелоксикам, набуметон, оксапрозин, пироксикам, сулиндак и толметин), кортикостероид (т.е. кортизон, преднизон, преднизолон, дексаметазон, метилпреднизолон и триамцинолон), агент против мигрени (т.е. суматриптин, альмотриптан, фроватриптан, суматриптан, ризатриптан, элетриптан, золмитриптан, дигидроэрготамин, элетриптан и эрготамин), ацетаминофен, салицилат (т.е. аспирин, холина салицилат, салицилат магния, дифлунизал и салсалат), противоконвульсивное средство (т.е. карбамазепин, клоназепам, габапентин, ламотригин, прегабалин, тиагабин и топирамат), анестетик (т.е. изофлуран, трихлорэтилен, галотан, севофлуран, бензокаин, хлорпрокаин, кокаин, циклометикаин, диметоксаин, пропоксикаин, прокаин, новокаин, пропаркаин, тетракаин, артикаин, бупивакаин, картикаин, цинхокаин, этидокаин, левобупивакаин, лидокаин, мепивакаин, пиперокаин, прилокаин, ропивакаин, тримекаин, сакситоксин и

тетродотоксин) и ингибитор СОХ-2 (циклооксигеназа-2) (т.е. целекоксиб, рофекоксиб и валдекоксиб). Против невропатического расстройства с участием головокружения может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой агент против головокружения, включающий меклизин, дифенгидрамин, прометазин и диазепам, но не ограничивающийся ими. Против невропатического расстройства с участием тошноты может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой агент против тошноты, включающий прометазин, хлорпромазин, прохлорперазин, триметобензамид и метоклопрамид, но не ограничивающийся ими.

Амилоидозы представляют собой группу заболеваний и расстройств, ассоциированных с внеклеточными белковыми отложениями в ЦНС, включающих вторичный амилоидоз, возрастной амилоидоз, болезнь Альцгеймера (AD), легкие когнитивные нарушения (MCI), деменцию с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственный геморрагический инсульт с амилоидозом (голландского типа), комплекс болезни Паркинсона-деменции Гуам, мозговую амилоидную ангиопатию, болезнь Гентингтона, прогрессирующий супрануклеарный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, трансмиссивную губчатую энцефалопатию, деменцию, связанную с ВИЧ, боковой амиотрофический склероз (ALS), миозит с тельцами включения (IBM) и глазные заболевания, связанные с отложением бета-амилоида (т.е. макулярная дегенерация, оптическая нейропатия, связанная с друзами, и катаракта).

Против амилоидоза может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое включает антитело или другую связывающую молекулу (включающую маленькую молекулу, пептид, аптамер или другой белковый связывающий агент, но не ограничивающуюся ими), которая специфично связывается с мишенью, выбранной из следующих: бета-секретаза, тау, пресенилин, белок-предшественник амилоида или его части, пептид амилоида-бета или его олигомеры или волокна, рецептор смерти 6 (DR6), рецептор конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE), паркин и хантингтин, но не ограничивается ими; ингибитор холинэстеразы (т.е. галантамин, донэпезил, ривастигмин и такрин); антагонист рецептора NMDA (N-метил-D-аспартат) (т.е. мемантин); агент, устраняющий моноамины (т.е. тетрабеназин); эрголоид мезилат; антихолинергический агент против паркинсонизма (т.е. проциклидин, дифенгидрамин, тригексилфенидил, бензтропин, бипериден и тригексифенидил); дофаминергический агент против паркинсонизма (т.е. энтакапон, селегилин, прамипексол, бромокриптин, ротиготин, селегилин, ропинирол, расагилин, апоморфин, карбидопа, леводопа, перголид, толкапон и амантадин); тетрабеназин; противовоспалительное средство (включающее нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (т.е. индометацин и другие соединения, перечисленные выше), но не ограничивающееся им; гормон (т.е. эстроген, прогестерон и лейпролид); витамин (т.е. фолат и никотинамид); димеболин; гомотаурин (т.е. 3-аминопропансульфоновая кислота; 3APS); модулятор активности серотонинового рецептора (т.е. ксалипроден); интерферон и глюкокортикоид.

Раковые заболевания ЦНС характеризуются нарушенной пролиферацией одной или более чем одной клетки ЦНС (т.е. нервной клетки) и включают глиому, мультиформную глиобластому, менингиому, астроцитому, невриному слухового нерва, хондрому, олигодендроглиому, медуллобластомы, ганглиоглиому, шванному, нейрофибром, нейробластому и экстрадуральные, интрамедуллярные, интрадуральные опухоли или метастазы в ЦНС периферических опухолей, таких как CD20- или HER2-позитивные

раковые заболевания, но не ограничиваются ими.

Против ракового заболевания может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой химиотерапевтический агент.

Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид ЦИТОКСАН®; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включающие алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентеофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, МАРИНОЛ®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан (ГИКАМТИН®); СРТ-11 (иринотекан, КАМПТОСАР®); ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карцелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамидина оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урацила иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма I и калихеамицин омега I (см., например, Agnew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33 (1994) 183-186); динемидин, включая динемидин А; эсперамицин; а также хромофор неокарциностантин и родственные хромофоры хромопротеиновых энединовых антибиотиков), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин АДРИАМИЦИН® (включая, морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностантин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азацитидин, 6-25 азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; антиадреналовые агенты, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; наполнитель на основе фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демекольцин; диазиквон; эльфорнитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий;

тenuазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангвидин); уретан; виндезин (ЭЛДИЗИН®), ФИЛДЕЗИН®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; 5 пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); тиотепа; таксоиды, например, пакпитаксел ТАКСОЛ® (Bristol-Myers-Squibb Oncology, Princeton, N.J.), сконструированный на основе альбумина препарат наночастиц паклитаксела АБРАКСАН™, не содержащий кремофор (American Pharmaceutical Partners, Шаумберг, Иллинойс) и доксетаксел ТАКСОТЕР® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Франция); хлоранбуцил; гемцитабин (ГЕМЗАР®); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин (ВЕЛБАН®); платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин (ОНКОВИН®); оксалиплатин; лейкововин; винорелбин (НАВЕЛБИН®); новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин (КСЕЛОДА®); фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше; а также комбинации двух или более чем двух из указанных выше, такие как СНОР, сокращение для комбинированной терапии из циклофосфамида, доксорубицина, винкристина и преднизолона, и FOLFOX, сокращение для схемы лечения оксалиплатином (ЭЛОКСАТИН™), в сочетании с 5-FU и лейкововином.

Также включенными в данное определение химиотерапевтических агентов являются антигормональные агенты, которые действуют посредством регуляции, уменьшения, блокирования или ингибирования эффектов гормонов, которые могут стимулировать рост злокачественной опухоли, и они часто используются в форме системного лечения или лечения всего организма. Они сами могут представлять собой гормоны. Примеры включают антиэстрогены и селективные модуляторы рецептора эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (включая тамоксифен НОЛВАДЕКС®), ралоксифен ЭВИСТА®, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен ФАРЕСТОН®; антипрогестероны; понижающие регуляторы рецептора эстрогена (ERD); агенты, которые выполняют функцию подавления или прекращения работы яичников, например агонисты рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LHRH), такие как леупролида ацетат ЛУПРОН® и ЭЛИГАРД®, гозерелина ацетат, бузерелина ацетат и триптерелин; другие антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; и ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, который регулирует продукцию эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоглутетимид, мегестрола ацетат МЕГЕЙС®, экземестан АРОМАСИН®, форместан, фадрозол, ворозол РИВИЗОР®, летрозол ФЕМАРА® и анастрозол АРИМИДЕКС®. Кроме того, такое определение химиотерапевтических средств включает бисфосфонаты, такие как клодронат (например, БОНЕФОС® или ОСТАК®), этидронат ДИДРОКАЛ®, NE-58095, золедроновую кислоту/золедронат ЗОМЕТА®, алендронат ФОСАМАКС®, памидронат АРЕДИЯ®, тилудронат 5 СКЕЛИД® или ризедронат АКТОНЕЛ®; а также троксацитабин (1,3-диоксолановый аналог нуклеозида цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности антисмысловые олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию генов путей сигнализации, вовлеченных в нарушенную пролиферацию клеток, например, таких как РКС-альфа, Raf, H-Ras и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина ТЕРАТОП® и вакцины гемотерапии, например вакцину АЛЛОВЕКТИН®, вакцину ЛЕУВЕКТИН® и вакцину ВАКСИД®; ингибитор топоизомеразы 1 ЛУРТОТЕКАН®; gmRH АБАРЕЛИКС®; лапатиниба

дитозилат (двойной низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы ErbB-2 и EGFR, также известный как GW572016); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из приведенных выше.

Другой группой соединений, которые можно выбрать в качестве неврологических лекарственных средств для лечения или предупреждения рака, являются противораковые иммуноглобулины (включающие трастузумаб, пертузумаб, бевацизумаб, алемтузумаб, цетуксимаб, гемтузумаб озогамидин, ибритумомаб тиуксетан, панитумумаб и ритуксимаб, но не ограничивающиеся ими). В некоторых случаях можно использовать антитела в сочетании с токсичной меткой или конъюгат для нацеливания на и умерщвления желательных клеток (т.е. раковых клеток), включая тозитумомаб с радиоактивной меткой ^{131}I или трастузумаб эмтанзин, но не ограничиваясь ими.

Глазными заболеваниями или расстройствами являются заболевания или расстройства глаза, который для целей данного документа считается органом ЦНС, отделенным ГЭБ. Глазные заболевания или расстройства включают расстройства склеры, роговицы, радужки и цилиарного тела (т.е. склерит, кератит, язву роговицы, царапину на роговице, снежную слепоту, ожог глаз, поверхностный точечный кератит Тайджесона, неоваскуляризацию роговицы, дистрофию Фукса, кератоконус, сухой кератоконъюнктивит, ирит и увеит), расстройства хрусталика (т.е. катаракта), расстройства сосудистой оболочки и сетчатки (т.е. отслойка сетчатки, ретиношизис, гипертензивная ретинопатия, диабетическая ретинопатия, ретинопатия, ретинопатия недоношенных, возрастная макулярная дегенерация, макулярная дегенерация (влажная или сухая), эпиретинальная мембрана, пигментная дегенерация сетчатки и макулярный отек), глаукому, плавающие частички, расстройства зрительного нерва и зрительных путей (т.е. наследственная оптическая нейропатия Лебера и друзы диска зрительного нерва), расстройства глазных мышц/бинокулярной двигательной аккомодации/лучепреломления (т.е. косоглазие, офтальмопарез, прогрессирующая внешняя офтальмоплегия, эзотропия, экзотропия, гиперметропия, миопия, астигматизм, анизометропия, пресбиопия и офтальмоплегия), нарушения зрения и слепоту (т.е. амблиопия, врожденный амавроз Левера, скотома, дальтонизм, ахроматопсия, никталопия, слепота, речная слепота и микроофтальмия/колобома), покраснение глаз, зрачок Аргилла Робертсона, кератомиозит, ксерофтальмию и анданиридию, но не ограничиваются ими.

Против глазного заболевания или расстройства может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой антиангиогенный глазной агент (т.е. бевацизумаб, ранибизумаб и пегаптаниб), глазной агент против глаукомы (т.е. карбахол, эпинефрин, демекария бромид, апраклонидин, бримонидин, бринзоламид, левобунолол, тимолол, бетаксолол, дорзоламид, биматопрост, картеолол, метипранолол, дипивефрин, травопрост и латанопрост), ингибитор карбоангидразы (т.е. метазоламид и ацетазоламид), глазной антигистаминный препарат (т.е. нафазолин, фенилэфрин и тетрагидрозолин), глазную смазку, глазной стероид (т.е. фторметолон, преднизолон, лотепреднол, дексаметазон, дифлупреднат, римексолон, флуоцинолон, медризон и триамцинолон), глазной анестетик (т.е. лидокаин, пропаракаин и тетракаин), глазное противомикробное средство (т.е. левофлоксацин, гатифлоксацин, ципрофлоксацин, моксифлоксацин, хлорамфеникол, бацитрацин/полимиксин В, сульфацил, тобрамицин, азитромицин, бесифлоксацин, норфлоксацин, сульфизоксазол, гентамицин, идоксуридин, эритромицин, натамицин, грамицидин, неомицин, офлоксацин, трифлуридин, ганцикловир, видарабин), глазной противовоспалительный агент (т.е. непафенак, кеторолак, флурбипрофен, супрофен, циклоспорин, триамцинолон,

диклофенак и бромфенак) и глазное антигистаминное или противозастойное средство (т.е. кетотифен, олопатадин, эпинастин, нафазолин, кромолин, тетрагидрозолин, пемироласт, бепотастин, нафазолин, фенилэфрин, недокромил, лодоксамид, фенилэфрин, эмедастин и азеластин).

5 Вирусные или микробные инфекции ЦНС включают инфекции, вызванные вирусами (т.е. вирусом гриппа, ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), полиовирусом, вирусом краснухи), бактериями (т.е. *Neisseria* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *E.coli*, *S. aureus*, *Pneumococcus* sp., *Meningococcus* sp., *Haemophilus* sp. и *Mycobacterium tuberculosis*) и другими микроорганизмами, такими как грибки (т.е. дрожжи, *Cryptococcus* 10 *neoformans*), паразитами (т.е. *Toxoplasma gondii*) или амебами, но не ограничивающиеся ими, приводящими к патофизиологиям ЦНС, включающим менингит, энцефалит, миелит, васкулит и абсцесс, которые могут быть острыми или хроническими, но не ограничивающимся ими.

Против вирусного или микробного заболевания может быть выбрано 15 неврологическое лекарственное средство, которое включает противовирусное соединение (включающее, противовирусное средство адамантан (т.е. римантадин и амантадин), противовирусный интерферон (т.е. пег-интерферон альфа-2b), но не ограничивающееся ими), антагонист рецептора хемокина (т.е. мававирик), ингибитор переноса нити интегразой (т.е. ралтегравир), ингибитор нейраминидазы (т.е. оселтамивир 20 и занамивир), нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (т.е. эфавиренз, этравирин, делавирдин и невирапин), нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (тенофовир, абакавир, ламивудин, зидовудин, ставудин, энтекавир, эмтрицитабин, адефовир, залцитабин, телбивудин и диданозин), ингибитор протеазы (т.е. дарунавир, атазанавир, фосампренавир, типранавир, ритонавир, нелфинавир, 25 ампренавир, индинавир и саквинавир), пуриновый нуклеозид (т.е. валацикловир, фамцикловир, ацикловир, рибавирин, ганцикловир, валганцикловир и цидофовир) и разнообразные противовирусные средства (т.е. энфувиртид, фоскарнет, паливизумаб и фомивирсен)), антибиотик (включающий аминопенициллин (т.е. амоксициллин, ампициллин, оксациллин, нафциллин, клоксацillin, диклоксацillin, флукоксациллин, 30 темоциллин, азлоциллин, карбенициллин, тикарциллин, мезлоциллин, пиперациллин и бакампенициллин), цефалоспорин (т.е. цефазолин, цефалексин, цефалотин, цефамандол, цефтриаксон, цефотаксим, цефподоксим, цефтазидим, цефадроксил, цефрадин, лоракарбеф, цефотетан, цефуроксим, цефпрозил, цефаклор и цефокситин), карбапенем/пенем (т.е. имипенем, меропенем, эртапенем, фаропенем и дорипенем), монобактам 35 (т.е. азтреонам, тигемонам, норкардицин А и табтоксинин-бета-лактам, ингибитор бета-лактамазы (т.е. клавулановая кислота, тазобактам и сульбактам) в сочетании с другим бета-лактамовым антибиотиком, аминогликозид (т.е. амикацин, гентамицин, канамицин, неомицин, нетилмицин, стрептомицин, тобрамицин и паромомицин), ансамицин (т.е. гелданамицин и гербимицин), карбацефем (т.е. лоракарбеф), 40 гликопептиды (т.е. тейкопланин и ванкомицин), макролид (т.е. азитромицин, кларитромицин, диритромицин, эритромицин, рокситромицин, тролеандомицин, телитромицин и спектиномицин), монобактам (т.е. азтреонам), хинолон (т.е. ципрофлоксацин, эноксацин, гатифлоксацин, левофлоксацин, ломефлоксацин, моксифлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, тровафлоксацин, грепафлоксацин, 45 спарфлоксацин и темафлоксацин), сульфонамид (т.е. мафенид, сульфонамидохризоидин, сульфацетамид, сульфадиазин, сульфаметизол, сульфаниламид, сульфасалазин, сульфизоксазол, триметоприм, триметоприм и сульфаметоксазол), тетрациклин (т.е. тетрациклин, демеклоциклин, доксициклин, миноциклин и окситетрациклин),

антинеопластический или цитотоксический антибиотик (т.е. доксорубицин, митоксантрон, блеомицин, даунорубицин, дактиномицин, эпирубицин, идарубицин, пликамицин, митомицин, пентостатин и валрубицин), но не ограничивающийся ими, разнообразные антибактериальные соединения (т.е. бацитрацин, колистин и полимиксин В)), противогрибковое средство (т.е. метронидазол, нитазоксанид, тинидазол, хлорохин, йодхинол и паромомицин) и противопаразитарные средства (включающие хинин, хлорохин, амодиахин, пириметамин, сульфадоксин, прогуанил, мефлохин, атоваквон, примаквин, артемесинин, галофантрин, доксициклин, клиндамицин, мебендазол, пирантела памоат, тиабендазол, диэтилкарбамазин, ивермектин, рифампин, амфотерицин В, меларсопрол, эфортинин и альбендазол, но не ограничивающиеся ими.

Воспаление ЦНС включает воспаление, которое вызвано повреждением ЦНС, которое может быть физическим повреждением (т.е. из-за катастрофы, хирургического вмешательства, травмы мозга, повреждения спинного мозга, сотрясения) и повреждением, обусловленным или связанным с одним или более чем одним другим заболеванием или расстройством ЦНС (т.е. абсцессом, раковым заболеванием, вирусной или микробной инфекцией), но не ограничивается ими.

Против воспаления ЦНС может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое направлено на само воспаление (т.е. нестероидный противовоспалительный агент, такой как ибупрофен или напроксен), или лекарственное средство, которое лечит лежащую в основе причину воспаления (т.е. противовирусный или противораковый агент).

Термин «ишемия ЦНС» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к группе расстройств, относящихся к нарушенному току крови или характеристикам сосудов в мозгу или к их причинам, и включает очаговую ишемию мозга, общую ишемию мозга, инсульт (т.е. подпаутинное кровоизлияние и внутримозговое кровоизлияние) и аневризму, но не ограничивается ими.

Против ишемии может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое включает тромболитик (т.е. урокиназа, альтеплаза, ретеплаза и тенектеплаза), ингибитор агрегации тромбоцитов (т.е. аспирин, цлостазол, клопидогрел, прасугрел и дипиридамо́л), статин (т.е. ловастатин, правастатин, флувастатин, росувастатин, аторвастатин, симвастатин, церивастатин и питава́статин) и соединение для улучшения кровотока или гибкости сосудов, включающее, например, лекарственные средства против кровяного давления, но не ограничивается ими.

Нейродегенеративные заболевания представляют собой группу заболеваний и расстройств, ассоциированных с потерей функции или смертью нервных клеток в ЦНС, и они включают аденолейкодистрофию, болезнь Александера, болезнь Альпера, боковой амиотрофический склероз, атаксию-телеангиэктазию, болезнь Баттена, кокаиновый синдром, кортикобазальную дегенерацию, дегенерацию, вызванную или ассоциированную с амилоидозом, наследственную атаксию Фридрейха, лобно-височную лобарную дегенерацию, болезнь Кеннеди, множественную системную атрофию, рассеянный склероз, первичный боковой склероз, прогрессирующий надъядерный паралич, спинальную мышечную атрофию, поперечный миелит, болезнь Рефсума и спинально-церебеллярную атаксию, но не ограничиваются ими.

Против нейродегенеративного заболевания может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой гормон роста или нейротрофический фактор; примеры включают нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-4/5, фактор роста фибробластов (FGF)-2 и другие FGF, нейротрофин (NT)-3, эритропоэтин (EPO), фактор роста

гепатоцитов (HGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста (TGF)-альфа, TGF-бета, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, фактор роста тромбоцитов (PDGF), херегулин, нейрегулин, артемин, персефин, интерлейкины, нейротрофический фактор глиальной линии клеток (GFR), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (GCSF), гранулоцитарно-макрофагальный CSF, нетрины, кардиотрофин-1, хеджхоги, фактор, ингибирующий лейкоз (LIF), мидкин, плеiotрофин, морфогенные белки кости (BMP), нетрины, сапозины, семафорины и фактор стволовых клеток (SCF), но не ограничиваются ими.

Конвульсивные заболевания и расстройства ЦНС включают неподходящее и/или ненормальное электрическое проведение в ЦНС, и включают эпилепсию (т.е. малые эпилептические припадки, атонические эпилептические припадки, доброкачественную детскую эпилепсию, детскую абсансную эпилепсию, клонические судороги, сложные парциальные припадки, лобнодолевую эпилепсию, фебрильные судороги, младенческие судороги, юношескую миоклоническую эпилепсию, юношескую абсансную эпилепсию, синдром Леннокса-Гасто, синдром Ландау-Клеффнера, синдром Драве, синдром Отахара, синдром Веста, миоклонические припадки, митохондриальные расстройства, прогрессирующие миоклонические эпилепсии, психогенные припадки, рефлекторную эпилепсию, синдром Расмуссена, простые парциальные припадки, вторичные генерализованные припадки, височную эпилепсию, тонико-клонические припадки, тонические судороги, психомоторные судороги, лимбическую эпилепсию, парциальные пароксизмы, пароксизмы с генерализованным началом, эпилептический статус, абдоминальную эпилепсию, акинетические припадки, автономные припадки, массовую двухстороннюю миоклонию, катамениальную эпилепсию, атонический припадок, эмоциональные эпилептические припадки, фокальные эпилептические припадки, эпилептические припадки смеха, джексоновский марш, болезнь Лафора, моторные эпилептические припадки, мультифокальные эпилептические припадки, ночные эпилептические припадки, фоточувствительные эпилептические припадки, псевдоэпилептические припадки, сенсорные эпилептические припадки, трудноуловимые эпилептические припадки, ролландическая эпилепсия, абстинентные эпилептические припадки и зрительные рефлекторные эпилептические припадки), но не ограничиваются ей.

Против конвульсивного расстройства может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой противосудорожное или противозепептическое средство, включающее барбитуратные противосудорожные средства (т.е. примидон, метарбитал, мефобарбитал, аллобарбитал, амобарбитал, апробарбитал, алфенал, барбитал, браллобарбитал и фенобарбитал), бензодиазепиновые противосудорожные средства (т.е. диазепам, клоназепам и лоразепам), карбаматные противосудорожные средства (т.е. фелбамат), противосудорожные средства на основе ингибитора карбоангидразы (т.е. ацетазоламид, топирамат и зонизамид), дибензазепиновые противосудорожные средства (т.е. руфинамид, карбамазепин и окскарбазепин), противосудорожные средства на основе производного жирной кислоты (т.е. дивалпроэкс и вальпроевая кислота), аналоги гамма-аминомасляной кислоты (т.е. прегабалин, габапентин и вигабатрин), ингибиторы обратного захвата гамма-аминомасляной кислоты (т.е. тиагабин), ингибиторы трансаминазы гамма-аминомасляной кислоты (т.е. вигабатрин), гидантоиновые противосудорожные средства (т.е. фенитоин, этотин, фосфенитоин и мефенитоин), разнообразные

противосудорожные средства (т.е. лакозамид и сульфат магния), прогестины (т.е. прогестерон), оксазолидиндионовые противосудорожные средства (т.е. параметадион и триметадион), пирролидиновые противосудорожные средства (т.е. леветирацетам), сукцинимидные противосудорожные средства (т.е. этосуксимид и метсуксимид),

5 триазиновые противосудорожные средства (т.е. ламотригин) и противосудорожные средства на основе мочевины (т.е. фенакемид и фенэтурид).

Расстройства поведения представляют собой расстройства ЦНС, отличающиеся нарушенным поведением в части пораженного субъекта, и включают расстройства сна (т.е. бессонница, парасомнии, ночные кошмары, расстройства циркадного ритма сна

10 и нарколепсия), расстройства настроения (т.е. депрессия, суицидальная депрессия, тревожность, хронические аффективные расстройства, фобии, панические атаки, обсессивно-компульсивное расстройство, гиперактивное расстройство с дефицитом внимания (ADHD), синдром дефицита внимания (ADD), синдром хронической усталости, агорафобия, посттравматическое стрессовое расстройство, биполярное расстройство),

15 расстройства питания (т.е. анорексия или булимия), психозы, расстройства поведения, связанные с развитием (т.е. аутизм, синдром Ретта, синдром Аспергера), расстройства личности и психотические расстройства (т.е. шизофрения, бредовое расстройство и тому подобные), но не ограничиваются ими.

Против расстройства поведения может быть выбрано неврологическое лекарственное

20 средство, выбранное из соединения, модифицирующего поведение, включающего атипичное антипсихотическое средство (т.е. рисперидон, оланзапин, априпиразол, кветиапин, палиперидон, асенапин, клозапин, илоперидон и зипразидон), фенотиазиновое антипсихотическое средство (т.е. прохлорперазин, хлорпромазин, флуфеназин, перфеназин, трифлуоперазин, тиоридазин и мезоридазин), тioxантен (т.е. тиотиксен),

25 разнообразные антипсихотические средства (т.е. пимозид, литий, молиндон, галоперидол и локсапин), селективный ингибитор обратного захвата серотонина (т.е. циталопрам, эсциталопрам, пароксетин, флуоксетин и сертралин), ингибитор обратного захвата серотонина-норэпинефрина (т.е. дулоксетин, венлафаксин, десвенлафаксин, трициклический антидепрессант (т.е. доксэпин, кломипрамин, амоксапин, нортриптилин,

30 амитриптилин, тримипрамин, имипрамин, протриптилин и десипрамин), тетрациклический антидепрессант (т.е. миртазапин и мапротилин), фенилпиперазиновый антидепрессант (т.е. тразодон и нефазодон), ингибитор моноаминоксидазы (т.е. изокарбоксазид, фенелзин, селегилин и транилципромин), бензодиазепин (т.е. алпразолам, эстазолам, флуразептам, клоназепам, лоразепам и диазепам), ингибитор

35 обратного захвата норэпинефрина-дофамина (т.е. бупропион), стимулятор ЦНС (т.е. фентермин, диэтилпропион, метамфетамин, декстроамфетамин, амфетамин, метилфенидат, дексметилфенидат, лисдексамфетамин, модафинил, пемолин, фендиметразин, бензфетамин, фендиметразин, армодафинил, диэтилпропион, кофеин, атомоксетин, доксапрам и мазиндол), нейрорептик/седативное/снотворное средство

40 (включающее барбитурат (т.е. секобарбитал, фенобарбитал и мефобарбитал), бензодиазепин (как описано выше) и разнообразные нейрорептики/седативные/снотворные средства (т.е. дифенгидрамин, оксикбат натрия, залеплон, гидроксизин, хлоралгидрат, аолпидем, буспирон, доксэпин, эзопиклон, рамелтеон, мепробамат и этхлорвинол), но не ограничивающееся ими), секретин (см., например, Ratliff-Schaub et

45 al. Autism 9 (2005) 256-265), опиоидный пептид (см., например, Cowen et al., J. Neurochem. 89 (2004) 273-285) и нейропептид (см., например, Hethwa et al. Am. J. Physiol. 289 (2005) E301-305), но не ограничивающегося ими.

Лизосомные болезни накопления представляют собой метаболические расстройства,

которые в некоторых случаях ассоциированы с ЦНС или имеют симптомы, специфичные для ЦНС; такие расстройства включают болезнь Тэя-Сакса, болезнь Гоше, болезнь Фабри, мукополисахаридоз (типов I, II, III, IV, V, VI и VII), гликогеноз, GM1-ганглиозидоз, метакроматическую лейкодистрофию, болезнь Фарбера, лейкодистрофию Канавана и нейрональные цероидные липофусцинозы типов 1 и 2, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Помпе и болезнь Краббе, но не ограничиваются ими.

Против лизосомной болезни накопления может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое само по себе имеет или иным образом имитирует активность фермента, которая ослаблена при заболевании. Типичные рекомбинантные ферменты для лечения лизосомных болезней накопления включают болезни, изложенные, например, в публикации заявки на патент США №2005/0142141 (т.е. альфа-L20 идуронидаза, идуронат-2-сульфатаза, N-сульфатаза, альфа-N-ацетилглюкозаминидаза, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатаза, бета-галактозидаза, арилсульфатаза В, бета-глюкуронидаза, кислая альфа-глюкозидаза, глюкоцереброзидаза, альфа-галактозидаза А, гексозаминидаза А, кислая сфингомиелиназа, бета-галактоцереброзидаза, арилсульфатаза А, кислая церамидаза, аспартоацилаза, пальмитоил-протеинтиоэстераза 1 и трипептидиламинопептидаза 1), но не ограничиваются ими.

В одном аспекте антитело по изобретению используется для выявления неврологического расстройства до проявления симптомов и/или для оценки тяжести или продолжительности заболевания или расстройства. В одном аспекте антитело обеспечивает выявление и/или визуализацию неврологического расстройства, включая визуализацию посредством радиографии, томографии или магнитно-резонансной томографии (МРТ).

В одном аспекте предложено низкоаффинное антитело против TfR по изобретению для применения в качестве лекарственного средства. В других аспектах предложено низкоаффинное антитело против TfR для применения в лечении неврологического заболевания или расстройства (например, болезни Альцгеймера) без обеднения эритроцитами (т.е. ретикулоцитами). В некоторых воплощениях предложено модифицированное низкоаффинное антитело против TfR для применения в способе лечения, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях согласно изобретению предложено низкоаффинное антитело против TfR, модифицированное для улучшения его безопасности для применения в способе лечения индивида, имеющего неврологическое заболевание или расстройство, включающем введение данному индивиду эффективного количества антитела против TfR (возможно связанного с лекарственным средством против неврологического расстройства). В одном таком воплощении данный способ дополнительно включает введение индивиду эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента. В других воплощениях согласно изобретению предложено антитело против TfR, модифицированное для улучшения его безопасности для применения в уменьшении или ингибировании образования амилоидных бляшек у пациента, подверженного риску или страдающего от неврологического заболевания или расстройства (например, болезни Альцгеймера). «Индивид» согласно любому из приведенных выше воплощений возможно представляет собой человека. В некоторых аспектах антитело против TfR по изобретению для применения в способах по изобретению улучшает поглощение лекарственного средства против неврологического расстройства, с которым оно связано.

В другом аспекте согласно изобретению предложено применение низкоаффинного антитела против TfR по изобретению в изготовлении или получении лекарственного

средства. В одном воплощении данное лекарственное средство предназначено для лечения неврологического заболевания или расстройства. В другом воплощении данное лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения неврологического заболевания или расстройства, включающем введение индивиду, имеющему неврологическое заболевание или расстройство, эффективного количества лекарственного средства. В одном таком воплощении данный способ дополнительно включает введение индивиду эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента.

В другом аспекте согласно изобретению предложен способ лечения болезни Альцгеймера. В одном воплощении данный способ включает введение индивиду, имеющему болезнь Альцгеймера, эффективного количества мультиспецифичного антитела по изобретению, которое связывается и с BACE1, и с TfR или и с Аβета, и с TfR. В одном таком воплощении данный способ дополнительно включает введение индивиду эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента. «Индивид» согласно любому из приведенных выше воплощений может представлять собой человека.

Антитела против TfR по изобретению можно использовать в терапии либо одни, либо в комбинации с другими агентами. Например, антитело против TfR по изобретению можно вводить совместно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим агентом. В некоторых воплощениях дополнительный терапевтический агент представляет собой терапевтический агент, эффективный для лечения того же самого или отличного неврологического расстройства, что и антитело против TfR, используемое для лечения. Типичные дополнительные терапевтические агенты включают разные неврологические лекарственные средства, описанные выше, ингибиторы холинэстеразы (такие как донепезил, галантамин, ровастигмин и такрин), антагонисты рецептора NMDA (такие как мемантин), ингибиторы агрегации бета-пептида амилоида, антиоксиданты, модуляторы γ-секретазы, имитаторы фактора роста нервов (NGF) или генотерапию NGF, агонисты PPARγ, ингибиторы HMS-КоА-редуктазы (статины), ампакины, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты рецептора GABA (гамма-аминомасляная кислота), ингибиторы киназы гликогенсинтазы, внутривенный иммуноглобулин, агонисты мускаринового рецептора, модуляторы никотинового рецептора, активная или пассивная иммунизация бета-пептидов амилоида, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты рецептора серотонина и антитела против бета-пептида амилоида, но не ограничиваются ими. В некоторых воплощениях по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент выбран по его способности облегчать один или более чем один побочный эффект неврологического лекарственного средства.

В некоторых других таких воплощениях по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент выбран по его способности ингибировать или предупреждать активацию пути комплемента при введении антитела против TfR. Примеры таких терапевтических агентов включают агенты, которые препятствуют способности антитела против TfR связываться с или активировать путь комплемента, и агенты, которые ингибируют одно или более чем одно молекулярное взаимодействие в пределах пути комплемента, и они в общем описываются в Mollnes and Kirschfink (Molec. Immunol. 43 (2006) 107-121), содержание которой прямо включено в данный документ посредством ссылки, но не ограничиваются ими.

Такие комбинированные терапии, отмеченные выше и в данном документе, охватывают комбинированное введение (где два или более чем два терапевтических агента включены в тот же самый или в отдельные препараты) и отдельное введение,

причем в данном случае введение антитела по изобретению может происходить до, одновременно с и/или после введения дополнительного терапевтического агента и/или адъюванта. В одном воплощении введение антитела против TfR и введение дополнительного терапевтического агента происходит в пределах примерно одного
 5 месяца или в пределах примерно одной, двух или трех недель, или в пределах примерно одних, двух, трех, четырех, пяти или шести суток друг от друга. Антитела по изобретению также можно использовать в комбинации с другими интервенционными терапиями, такими как лучевая терапия, поведенческая терапия или другие терапии, известные в данной области и подходящие против неврологического расстройства,
 10 подлежащего лечению или предупреждению, но не ограничивающимися ими.

Антитело против TfR по изобретению (и любой дополнительный терапевтический агент) можно вводить любыми подходящими способами, включая перентеральный, внутрилегочный и интраназальный, и, если это желательно для местного лечения, введение в область поражения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное,
 15 внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование может осуществляться любым подходящим путем, например, инъекциями, такими как внутривенные или подкожные инъекции, отчасти в зависимости от того является ли введение кратковременным или хроническим. В данном документе рассматриваются разные схемы дозирования, включающие однократные или
 20 многократные введения на протяжении разных моментов времени, болюсное введение и импульсную инфузию, но не ограничивающиеся ими.

Антитела по изобретению готовили бы, дозировали и вводили способом, согласующимся с надлежащей медицинской практикой. В данном контексте факторы для принятия во внимание включают конкретное расстройство, которое лечат,
 25 конкретное вскармливающее, которое лечат, клиническое состояние индивидуального пациента, причину расстройства, сайт доставки агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам.

Антитело не обязательно должно быть, но возможно приготовлено с одним или более чем одним агентом, используемым в настоящее время для предупреждения или
 30 лечения рассматриваемого расстройства или для предупреждения, облегчения или уменьшения интенсивности одного или более чем одного побочного эффекта введения антитела. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в препарате, типа расстройства или лечения и других факторов, обсуждавшихся выше. Они обычно используются в таких же дозировках и с
 35 использованием таких же путей введения, что и описанные в данном документе, или примерно от 1 до 99% от дозировок, описанных в данном документе, или в любой дозировке и посредством любого пути, который эмпирически/клинически определен как подходящий.

Для предупреждения или лечения заболевания подходящая дозировка антитела по изобретению (при использовании его одного или в комбинации с одним или более чем
 40 одним другим дополнительным терапевтическим агентом) будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, тяжести и хода заболевания, того, вводится ли антитело в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, клинической истории пациента, ответа на антитело и решения лечащего врача.
 45 Антитело подходящим образом вводится пациенту за один раз или на протяжении серии обработок. В зависимости от типа и тяжести заболевания исходной кандидатной дозировкой для введения пациенту может быть примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1 мг/кг - 10 мг/кг) антитела, независимо от того, например, осуществляется

ли оно одним или более чем одним отдельным введением или непрерывной инфузией. Одна типичная суточная дозировка может варьировать от примерно 1 мкг/кг до 100 мкг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Для повторных введений в течение нескольких суток или дольше, в зависимости от условия, лечение обычно поддерживалось бы до желательного подавления симптомов заболевания. Одна типичная дозировка антитела находилась бы в интервале от примерно 0,05 мкг/кг до примерно 40 мкг/кг. Таким образом, пациенту может вводиться одна или более чем одна доза примерно 0,5 мкг/кг, 2,0 мкг/кг, 4,0 мкг/кг, 5,0 мкг/кг, 7,5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 15 мкг/кг, 20 мкг/кг, 25 мкг/кг, 30 мкг/кг, 35 мкг/кг или 40 мкг/кг (или любая их комбинация). Такие дозы могут вводиться периодически, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, что пациент получает от примерно двух до примерно двадцати или, например, примерно шесть доз антитела). Может вводиться исходная более высокая загрузочная доза, с последующими одной или более чем одной меньшими дозами. Однако могут быть полезными другие схемы дозировки. Будет понятно то, что одним способом уменьшения влияния введения антител против TfR на популяции ретикулоцитов является модификация количества или расписания доз таким образом, что в кровотоке присутствуют общие меньшие количества циркулирующего антитела для взаимодействия с ретикулоцитами. В одном неограничивающем примере можно вводить меньшую дозу антител против TfR с большей частотой, чем вводилась бы более высокая доза. Используемая дозировка может быть сбалансирована между необходимым количеством антитела для доставки в ЦНС (которое само связано с аффинностью части антитела, специфичной в отношении антигена ЦНС), аффинностью данного антитела в отношении TfR и тем, является(ются) ли соединение(ния), защищающее(щие) эритроциты (т.е. ретикулоциты), стимулирующее(щие) рост и развитие или ингибирующее(щие) путь комплемента вводимыми совместно или серийно с антителом. Прогресс данной терапии легко отслеживается традиционными методиками и анализами, как описано в данном документе, и как известно в данной области.

Понятно то, что любой из приведенных выше препаратов или терапевтических способов может осуществляться с использованием иммуноконъюгата по изобретению вместо или помимо антитела против TfR.

III. Изделия

В другом аспекте изобретения предложено изделие, содержащее вещества, полезные для лечения, предупреждения и/или диагностики описанных выше расстройств. Изделие содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш в упаковке на или ассоциированные с контейнером. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, мешки с в.в. (внутривенный) раствором и т.д. Контейнеры могут быть сделаны из целого ряда материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама или в комбинации с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностики состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой мешок для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, поддающуюся прокалыванию подкожной инъекционной иглой). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антитело по изобретению. На этикетке или листке-вкладыше в упаковке указано то, что композиция используется для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может содержать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, где данная композиция содержит антитело по изобретению; и (б) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, где данная композиция содержит дополнительный цитотоксический или иной терапевтический агент. Изделие в данном

воплощении изобретения может дополнительно содержать листок-вкладыш в упаковке, на котором указано то, что композиции могут быть использованы для лечения конкретного состояния. Альтернативно или дополнительно, изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекции (BWHI), фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой или пользовательской точки зрения, включающие другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Понятно, что любое из приведенных выше изделий может включать иммуноконъюгат по изобретению вместо или помимо антитела против трансферринового рецептора.

IV. ПРИМЕРЫ

Следующее представляет собой примеры способов и композиций по изобретению. Понятно, что можно практиковать разные другие воплощения, принимая во внимание общее описание, приведенное выше.

Материалы и методы

Методики генной инженерии

Для манипуляции с ДНК использовали стандартные способы, как описано в Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Молекулярно-биологические реактивы использовали согласно инструкциям изготовителя.

Синтез генов и олигонуклеотидов

Желательные сегменты генов получали химическим синтезом в Geneart GmbH (Регенсбург, Германия). Синтезированные фрагменты генов клонировали в плазмиду *E. coli* для размножения/амплификации. Последовательности ДНК субклонированных фрагментов генов подтверждали секвенированием ДНК. В качестве альтернативы, короткие фрагменты синтетической ДНК собирали посредством отжига химически синтезированных олигонуклеотидов или посредством ПЦР. Соответствующие олигонуклеотиды были получены Metabion GmbH (Планегг-Мартинсрид, Германия).

Реактивы

Все имеющиеся в продаже химические реактивы, антитела и наборы использовали в том виде, в котором они были предоставлены, согласно протоколу изготовителя, если не утверждается иное.

Пример 1

Иммунизация кроликов и мышей

Иммунизация мышей

Мышей NMRI иммунизировали генетически с использованием плазмидного экспрессионного вектора, кодирующего полноразмерный человеческий TfR или TfR яванского макака, посредством внутрикожного введения 100 мкг ДНК вектора, с последующей электропорацией (2 квадратных импульса 1000 В/см, продолжительность 0,1 мс, интервал 0,125 с; с последующими 4 квадратными импульсами 287,5 В/см, продолжительность 10 мс, интервал 0,125 с. Мыши получали либо 6, либо 7 последовательных иммунизаций в сутки 0, 14, 28, 42, 56, 70 и 84. Четвертую и шестую иммунизации проводили с использованием вектора, кодирующего TfR яванского макака; вектор, кодирующий TfR человека, использовали для всех других иммунизаций. Кровь отбирали в сутки 36, 78 и 92, и получали сыворотку, которую использовали для определения титра посредством ELISA (см. ниже). Животных с наивысшими титрами отбирали для повторной иммунизации в сутки 96 посредством внутривенной инъекции

либо 10^6 человеческих клеток TF-1, либо 50 мкг рекомбинантного человеческого растворимого TfR, не имеющего спирального домена (внеклеточный домен человеческого TfR, начинающийся Leu122, заканчивающийся Asn608, экспрессируемый в клетках НЕК293F в виде N-концевого слияния с человеческой областью Fc и очищенный аффинной хроматографией на белке А и гель-фильтрацией), и моноклональные антитела выделяли методикой гибридомы на основе их способности связываться с трансферриновым рецептором человека и яванского макака, экспрессируемым на поверхности стабильно трансфицированных клеток СНО-K1 (см. Пример 3).

Иммунизация кроликов

Белых новозеландских кроликов или трансгенных кроликов, экспрессирующих репертуар гуманизированных антител, иммунизировали генетически с использованием плазмидного экспрессионного вектора, кодирующего полноразмерный человеческий TfR или TfR яванского макака, посредством внутрикожного введения 400 мкг ДНК вектора, с последующей электропорацией (5 квадратных импульсов 750 В/см, продолжительность 10 мс, интервал 1 с). Кролики получали 6 последовательных иммунизаций в сутки 0, 14, 28, 56, 84 и 112. Четвертую и шестую иммунизации проводили с использованием вектора, кодирующего TfR яванского макака; вектор, кодирующий TfR человека, использовали для всех других иммунизаций. Кровь (10% оценочного общего объема крови) отбирали в сутки 35, 63, 91 и 119. Получали сыворотку, которую использовали для определения титра посредством ELISA (см. ниже), и выделяли одноядерные клетки периферической крови, которые использовали в качестве источника антигенспецифичных В-клеток в способе клонирования В-клеток (см. Пример 2).

Определение сывороточных титров (ELISA)

Человеческий рекомбинантный растворимый TfR (R&D Systems, Кат. №2474-TR) иммобилизовали на 96-луночном планшете NUNC Maxisorp в концентрации 3 мкг/мл, 100 мкл/лунку в PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), с последующими: блокированием планшета 2% кротенином С в PBS, 200 мкл/лунку; нанесением серийных разведений антисыворотки в двойных повторностях в 0,5% кротенине С в PBS, 100 мкл/лунку; выявлением (1) антителом козы против мышинового антитела, конъюгированным с HRP (пероксидаза хрена) (Jackson ImmunoResearch/Dianova 115-036-071; 1/16 000) для всех мышинных сывороток, (2) антителом осла против кроличьего IgG, конъюгированным с HRP (Jackson ImmunoResearch/Dianova 711-036-152; 1/16 000) для всех кроличьих сывороток, (3) кроличьим антителом против человеческого IgG (Pierce/Thermo Scientific 31423; 1/5000) только для сывороток из трансгенных кроликов, (4) биотинилированным антителом козы против цепи каппа человека (Southern Biotech/Biozol 2063-08, 1/5000) и стрептавидином-HRP только для сывороток из трансгенных кроликов; разведенных в 0,5% кротенине С в PBS, 100 мкл/лунку. Для всех этапов планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Между всеми этапами планшеты 3 раза промывали 0,05% Tween 20 в PBS. Сигнал проявляли добавлением растворимого субстрата POD (пероксидаза) BM Blue (Roche), 100 мкл/лунку; и останавливали развитие реакции добавлением 1 М HCl, 100 мкл/лунку. Поглощение считывали при 450 нм по сравнению с 690 нм в качестве контроля. Титр определяли как разведение антисыворотки, приводящее к полумаксимальному сигналу.

Пример 2

Клонирование В-клеток из кроликов

Выделение кроличьих одноядерных клеток периферической крови (PBMC)

Вкратце, образцы крови отбирали у 6 животных (2 кролика дикого типа (wt) и 4 трансгенных (tg) кролика). Данные кролики происходили из 2 разных кампаний

иммунизации: первая кампания с 2 wt и 2 tg кроликами и вторая кампания с 2 tg кроликами (см. также пример «Иммунизация кроликов»). Цельную кровь, содержащую EDTA, двухкратно разводили 1× PBS (PAA, Пашинг, Австрия) перед центрифугированием в градиенте плотности с использованием лимфолита для млекопитающих (Cedarlane Laboratories, Burlington, Онтарио, Канада) согласно спецификациям изготовителя. РВМС дважды промывали 1× PBS.

Среда EL-4 B5

Использовали RPMI 1640 (Pan Biotech, Aidenbach, Германия), дополненную 10% FCS (фетальная телячья сыворотка) (Hyclone, Logan, UT, США), 2 mM глутамином, раствором 1% пенициллина/стрептомицина (PAA, Pasching, Австрия), 2 mM пируватом натрия, 10 mM HEPES (PAN Biotech, Aidenbach, Германия) и 0,05 mM β-меркаптоэтанолом (Gibco, Paisley, Шотландия).

Истощение популяции клеток

Первая кампания иммунизации: стерильные 6-луночные планшеты (уровня качества для культуры клеток), покрытые конфлюэнтным монослоем клеток СНО (яичники китайского хомяка), использовали для истощения популяции макрофагов/моноцитов через неспецифичную адгезию, а также неспецифично связывающиеся лимфоциты.

Вторая кампания иммунизации: стадию истощения популяции с использованием лунок, покрытых клетками СНО, опускали, так как авторы изобретения не могли исключать того, что были бы истощены те В-клетки, продуцирующие антитела, которые являются перекрестно реагирующими с антителами хомяка против трансферринового рецептора. Следовательно, использовали пустые стерильные 6-луночные планшеты (уровня качества для культуры клеток) для истощения популяции макрофагов и моноцитов через неспецифичную адгезию, обеспечивая потенциальные В-лимфоциты, продуцирующие поверхностные антитела, перекрестно реагирующие с антигенами хомяка (и, возможно, перекрестно реагирующие с антигенами мыши), для достижения следующего этапа в последовательности операций.

Для каждой кампании иммунизации: каждую лунку заполняли максимум 4 мл среды и вплоть до 6×10^6 РВМС от иммунизированного кролика и давали связываться в течение 1 ч при 37°C в инкубаторе. Для стадии пэннинга антигена использовали клетки в супернатанте (лимфоциты периферической крови (PBL)).

Обогащение В-клеток на человеческом трансферриновом рецепторе

В 6-луночные планшеты для культуры ткани, покрытые монослоем клеток СНО, позитивных в отношении человеческого трансферринового рецептора, высевали вплоть до 6×10^6 PBL на 4 мл среды и давали связываться в течение 1 ч при 37°C в инкубаторе. Неприкрепившиеся клетки удаляли тщательной промывкой лунок 1× PBS 1-2 раза. Остающиеся липкие клетки отделяли трипсином в течение 10 мин при 37°C в инкубаторе. Трипсинизацию останавливали средой EL-4 B5. До иммунофлуоресцентного окрашивания клетки выдерживали на льду.

Иммунофлуоресцентное окрашивание и проточная цитометрия

Для сортировки одиночных клеток использовали антитело против IgG, конъюгированное с FITC (флуоресцеинизотиоцианат) (AbD Serotec, Дюссельдорф, Германия). Для окрашивания поверхности клетки со стадии истощения популяции и обогащения инкубировали с антителом против IgG, конъюгированным с FITC, в PBS и инкубировали в течение 45 минут в темноте при 4°C. После окрашивания РВМС дважды промывали ледяным PBS. Наконец, РВМС ресуспендировали в ледяном PBS и немедленно подвергали анализам FACS. Перед анализами FACS добавляли пропидия йодид в концентрации 5 мкг/мл (BD Pharmingen, Сан-Диего, CA, США) для различения

между мертвыми и живыми клетками.

Для сортировки одиночных клеток использовали Becton Dickinson FACSAria, оснащенную компьютером и программой FACSDiva (BD Biosciences, США).

Культивирование В-клеток

5 Культивирование кроличьих В-клеток проводили способом, аналогичным способу, описанному Zubler et al. (1985). Вкратце, одиночные сортированные кроличьи В-клетки инкубировали в 96-луночных планшетах с 200 мкл/лунку среды EL-4 B5, содержащей клетки Pansorbin (1:100000) (Calbiochem (Merck), Дармштадт, Германия), 5% супернатанта кроличьих тимоцитов (загрузка TSN-M13 (10242), MicroCoat, Бернрид, Германия) и
10 гамма-облученные клетки мышинной тимомы EL-4-B5 ($2,5 \times 10^4$ /лунку) в течение 7 суток в атмосфере 5% CO₂ в инкубаторе при 37°C. Супернатанты культуры В-клеток удаляли для скрининга, и остающиеся клетки немедленно отбирали и замораживали при -80°C в 100 мкл буфера RLT (Qiagen, Хильден, Германия).

Пример 3

15 Идентификация антител человека и яванского макака, связывающихся с TfR, посредством клеточного ELISA

Для скрининга кроличьих В-клеток или супернатантов мышинной гибридомы на антитела, распознающие TfR человека и яванского макака, использовали клеточный
20 ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) стабильно трансфицированных клеток CHO-K1. Стабильных трансфектантов получали посредством трансфицирования клеток CHO-K1 экспрессионными плазмидами, содержащими экспрессионные кассеты для TfR человека и яванского макака, а также для неомицин-фосфотрансферазы. После трансфекции клетки разводили в ростовой среде, содержащей 500 мкг/мл G418 (Life
25 Technologies). После появления растущих клонов клетки отделяли, окрашивали MEM-75 (Abcam) или 13E4 (Life Technologies) и вторичными антителами, меченными PE (фосфоэстераза), на TfR человека или яванского макака, и сильно флуоресцирующие клетки, сортировали в виде одиночных клеток в лунки 96-луночного планшета (FACS Aria). После 7 суток роста клоны вновь проверяли на экспрессию TfR, и лучше всего
30 экспрессирующие клоны отбирали для экспериментов с клеточным ELISA.

Вкратце, 15000 клеток на лунку высевали в 384-луночный планшет и инкубировали в течение 18 ч при 37°C, 5% CO₂. Супернатант удаляли с использованием автоматического промывочного устройства (BIOTEK), и в каждую лунку добавляли
30 мкл супернатанта, содержащего антитело, с последующими 24 мкл ростовой среды.
35 После 2 часов инкубации лунки опустошали, и добавляли 30 мкл 0,05%-ного глутаральдегида в PBS на 45 мин при RT (комнатная температура). После 3 промывок PBS/0,025% Tween 20 (PBST) добавляли 30 мкл антитела против кроличьего антитела, конъюгированного с HRP (пероксидаза хрена), или антитела против мышинового антитела, конъюгированного с HRP (Southern Biotech), разведенных 1:5000 в блокирующем буфере,
40 и планшеты инкубировали в течение 1 часа при RT. Лунки промывали 6 раз PBST, сигнал генерировался с использованием 30 мкл ТМВ (тетраметилбензидин) на лунку, и поглощение измеряли при 450 нм.

Пример 4

Клонирование и экспрессия антител против TfR

45 Методики генной инженерии

Для манипуляции с ДНК использовали стандартные способы, как описано в Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Молекулярно-биологические реактивы использовали

согласно инструкциям изготовителя.

Синтез генов и олигонуклеотидов

Желательные сегменты генов получали химическим синтезом в Geneart GmbH (Регенсбург, Германия). Синтезированные фрагменты генов клонировали в плазмиду *E. coli* для размножения/амплификации. Последовательности ДНК субклонированных фрагментов генов подтверждали секвенированием ДНК. В качестве альтернативы, короткие фрагменты синтетической ДНК собирали посредством отжига химически синтезированных олигонуклеотидов или посредством ПЦР. Соответствующие олигонуклеотиды были получены Metabion GmbH (Планегг-Мартинсрид, Германия).

ПЦР-амплификация V-доменов

Общую РНК получали из лизата В-клеток (ресуспендированного в буфере RLT - Qiagen - кат. №79216) с использованием набора NucleoSpin 8/96 RNA (Macherey&Nagel; 740709.4, 740698) согласно протоколу изготовителя. РНК элюировали 60 мкл воды, не содержащей РНКазы. 6 мкл РНК использовали для получения кДНК посредством реакции обратной транскриптазы с использованием суперсмеси для синтеза первой нити Superscript III (Invitrogen 18080-400) и олиго-dT-праймера согласно инструкциям изготовителя. Все стадии проводили на системе Hamilton ML Star. Для амплификации переменных областей тяжелой и легкой цепи (VH и VL) иммуноглобулина использовали 4 мкл кДНК с суперсмесью AccuPrime (Invitrogen 12344-040) в конечном объеме 50 мкл с использованием праймеров rbHC.up и rbHC.do для тяжелой цепи, rbLC.up и rbLC.do для легкой цепи кроличьих В-клеток дикого типа, и BcPCR_FHLC_leader.fw и BcPCR_huCkappa.rev для легкой цепи трансгенных кроличьих В-клеток (см. Таблицу ниже). Все прямые праймеры были специфичными в отношении сигнального пептида (соответственно VH и VL), тогда как обратные праймеры были специфичными в отношении константных областей (соответственно VH и VL). Условия ПЦР для RbVH плюс RbVL были следующими: горячий старт при 94°C в течение 5 мин; 35 циклов по 20 с при 94°C, 20 с при 70°C, 45 с при 68°C и конечное удлинение при 68°C в течение 7 мин. Условия ПЦР для HuVL были следующими: горячий старт при 94°C в течение 5 мин; 40 циклов по 20 с при 94°C, 20 с при 52°C, 45 с при 68°C и конечное удлинение при 68°C в течение 7 мин.

rbHC.up (SEQ ID NO 103)	AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC
rbHCf.do (SEQ ID NO 104)	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG
rbLC.up (SEQ ID NO 105)	AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC
rbLC.do (SEQ ID NO 106)	CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC
BcPCR_FHLC_leader.fw (SEQ ID NO 107)	ATGGACATGAGGGTCCCCGC
BcPCR_huCkappa.rev (SEQ ID NO 108)	GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC

8 мкл из 50 мкл раствора ПЦР загружали на 48 Е-гель 2% (Invitrogen G8008-02). Позитивные реакции ПЦР подвергали очистке с использованием набора NucleoSpin Extract II (Macherey&Nagel; 740609250) согласно протоколу изготовителя и элюировали

в 50 мкл элюирующего буфера. Все стадии очистки проводили на системе Hamilton ML Starlet.

Рекомбинантная экспрессия кроличьих моноклональных двухвалентных антител

Для рекомбинантной экспрессии кроличьих моноклональных двухвалентных антител
 5 ПЦР-продукты, кодирующие VH или VL, клонировали в виде кДНК в экспрессионные векторы посредством способа клонирования с «липкими» концами (RS Haun et al., BioTechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li et al., Nature Methods (2007) 4, 251-256). Данные экспрессионные векторы содержали экспрессионную кассету, состоящую из 5' промотора CMV (цитомегаловирус), включающего интрон A, и 3' последовательность
 10 полиаденилирования BGN. Помимо экспрессионной кассеты плазмиды содержали репликатор, происходящий из pUC18, и ген бета-лактамазы, придающий устойчивость к ампициллину, для амплификации плазмиды в E. coli. Использовали три варианта базовой плазмиды: одну плазмиду, содержащую константную область кроличьего IgG, сконструированную для принятия областей VH, тогда как две дополнительные плазмиды
 15 содержат константную область LC каппа кролика или человека для принятия областей VL.

Линеаризованные экспрессионные плазмиды, кодирующие константную область каппа или гамма и вставки VL/VH, амплифицировали посредством ПЦР с использованием перекрывающихся праймеров.

20 Очищенные ПЦР-продукты инкубировали с ДНК-полимеразой T4, которая генерировала односторонние «липкие» концы. Данную реакцию останавливали добавлением dCTP (дезокситозинтрифосфат).

На следующей стадии плазмиду и вставку объединяли и инкубировали с гесА, которая индуцировала сайт-специфичную рекомбинацию. Рекомбинантные плазмиды
 25 трансформировали в E. coli. На следующие сутки выросшие колонии собирали и тестировали на правильную рекомбинированную плазмиду посредством получения плазмиды, рестрикционного анализа и секвенирования ДНК.

Для экспрессии антитела выделенные плазмиды HC и LC временно сотрансфицировали в клетки HEK293, и супернатанты отбирали через 1 неделю.

30 Получение векторов для экспрессии кроличьих моноклональных одновалентных антител

Для рекомбинантной экспрессии отобранных кандидатов в качестве моноклональных одновалентных антител кроличьи константные области всех цепей VH превращали в человеческие константные области, заключающие мутацию, приводящую к выступу,
 35 в сегменте CH3. Для цепей VL, полученных из кроличьих В-клеток дикого типа, кроличьи константные области C каппа превращали в человеческие. Для амплификации переменных областей тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина использовали 4 мкл кДНК отобранных кандидатов с суперсмесью AccuPrime (Invitrogen 12344-040) в конечном объеме 50 мкл с использованием прямых праймеров, специфичных в
 40 отношении сигнального пептида, и обратных праймеров, специфичных в отношении области CDR3-J, с перекрывающейся последовательностью (на 3'-конце) (20 п.о.), гомологичной человеческим константным областям (соответственно VH и VL). Условия ПЦР для амплификации цепи VH и VL были следующими: горячий старт при 94°C в течение 5 мин; 35 циклов по 20 с при 94°C, 20 с при 68°C, 45 с при 68°C и конечное
 45 удлинение при 68°C в течение 7 мин.

ПЦР-продукты, кодирующие VH или VL, клонировали в экспрессионные векторы в виде кДНК посредством способа клонирования с липкими концами (RS Haun et al., BioTechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li et al., Nature Methods (2007) 4, 251-256). Данные

экспрессионные векторы содержали экспрессионную кассету, состоящую из 5' промотора CMV, включающего интрон А, и 3' последовательность полиаденилирования BGH. Помимо экспрессионной кассеты плазмиды содержали репликатор, происходящий из рUC18, и ген бета-лактамазы, придающий устойчивость к ампициллину, для

5 амплификации плазмиды в *E. coli*. Использовали два варианта базовой плазмиды: одну плазмиду, содержащую константную область человеческого IgG, сконструированную для принятия новой амплифицированной цепи VH, и вторую плазмиду, содержащую человеческую константную область LC каппа для принятия области VL.

10 Линеаризованные экспрессионные плазмиды, кодирующие константную область каппа или гама и вставки VL/VH, амплифицировали посредством ПЦР с использованием перекрывающихся праймеров.

Очищенные ПЦР-продукты инкубировали с ДНК-полимеразой T4, которая генерировала односторонние «липкие» концы. Данную реакцию останавливали добавлением dCTP.

15 На следующей стадии плазмиду и вставку объединяли и инкубировали с *gcsA*, которая индуцировала сайт-специфичную рекомбинацию. Рекомбинантные плазмиды трансформировали в *E. coli*. На следующие сутки выросшие колонии собирали и тестировали на правильную рекомбинированную плазмиду посредством получения плазмиды, рестрикционного анализа и секвенирования ДНК.

20 Пример 5

Временная экспрессия одновалентных антител против TfR

Антитела получали *in vivo* во временно трансфицированных клетках HEK293 (полученные из линии клеток человеческой эмбриональной почки 293), культивированных в среде F17 (Invitrogen Corp.). Для трансфекции использовали

25 трансфекционный реактив «293-Free» (Novagen). Антитела и модифицированные молекулы на основе антител, как описано выше, экспрессировали из индивидуальных экспрессионных плазмид. Трансфекции проводили, как определено в инструкциях изготовителя. Супернатанты культуры клеток, содержащие рекомбинантный белок, отбирали через три-семь суток после трансфекции. Супернатанты хранили при

30 пониженной температуре (например, -80°C) до очистки.

Общая информацию относительно рекомбинантной экспрессии человеческих иммуноглобулинов, например, в клетках HEK293, приводится в: Meissner, P. et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203.

Пример 6

35 Высокопроизводительная очистка неполных антител против трансферринового рецептора

50 мл осветленных супернатантов, содержащих неполные антитела, в планшетах с 96 глубокими лунками загружали на 200 мкл колонки MabSelectSuRe. После стадий промывки PBS при pH 7,4 белки элюировали 2,5 mM HCl с использованием системы

40 Tecan/Atoll, что приводило к 0,5 мл элюата. Элюат нейтрализовали 2 M Tris, pH 8. Очищенные белки количественно измеряли с использованием спектрофотометра Nanodrop и анализировали CE-SDS (капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия) при денатурирующих и восстанавливающих условиях и аналитической SEC (гель-фильтрация). Для получения белка с высокой чистотой (больше 95%) большая

45 часть антител должна быть очищена далее посредством гель-фильтрации для отделения от половины антитела, антител выступ-выступ и агрегатов более высокого порядка. Далее 500 мкл образцов инъецировали на Superdex200 10/300GL в 20 mM гистидине, содержащем 140 mM NaCl, pH 6,0, с использованием Dionex UltiMate 3000. Данный

способ обеспечивает фракционирование 25-30 образцов в сутки и, следовательно, позволяет обрабатывать большее число хитов скрининга в формате неполного антитела. Фракции объединяли и вновь анализировали, как описано выше.

Пример 7

5 Культура клеток hCMEC/D3 для анализов трансцитоза

Среду и добавки для hCMEC/D3 (Weksler, B.B. et al., FASEB J. 19 (2005), 1872-1874) приобретали у Lonza. Клетки hCMEC/D3 (пассажи 26-29) культивировали до конfluence на покровных стеклах, покрытых коллагеном (микроскопия), или в колбах в среде EBM2, содержащей 2,5% FBS (фетальная телячья сыворотка), четверть поставленных факторов роста и полностью дополненной поставленными гидрокортизоном, гентамицином и аскорбиновой кислотой.

Для всех анализов трансцитоза использовали вставки фильтра на основе PET мембраны с высокой плотностью пор (1×10^8 пор/см²) (0,4 мкм, диаметр 12 мм) в 12-луночных планшетах для культуры клеток. Рассчитывали, что оптимальные объемы сред составляли 400 мкл и 1600 мкл для апикальных и базолатеральных камер соответственно. Апикальные камеры вставок фильтра покрывали коллагеном I хвоста крысы (7,5 мкг/см²), с последующим фибронектином (5 мкг/мл), причем каждая инкубация длилась в течение 1 часа при RT. Клетки hCMEC/D3 выращивали до конfluence монослоев (приблизительно 2×10^5 клеток/см²) в течение 10-12 суток в среде EBM2.

Пример 8

Анализ трансцитоза одновалентных антител

Весь анализ проводили в бессывороточной среде EBM2, которую в иных отношениях разводили, как описано в Примере 1. Вставки фильтра с клетками инкубировали апикально с одновалентными антителами (концентрация: 2,67 мкг/мл) в течение 1 часа при 37°C, после чего отбирали все апикальные и базолатеральные среды. Из данных значений рассчитывали параклеточный ток. Монослои промывали при RT в бессывороточной среде апикально (400 мкл) и базолатерально (1600 мкл) 3 раза по 3-5 мин. Все промывки отбирали для отслеживания эффективности удаления несвязавшегося антитела. В апикальную камеру добавляли предварительно нагретую среду, и фильтры переносили в свежий 12-луночный планшет (блокированный в течение ночи PBS, содержащим 1% BSA), содержащий 1600 мкл предварительно нагретой среды. В данный момент клетки на фильтрах лизировали в 500 мкл буфера RIPA для того, чтобы определить поглощение специфичного антитела. Остальные фильтры инкубировали при 37°C, и образцы отбирали в разные моменты времени для определения апикального и/или базолатерального высвобождения антитела. Содержание антитела в образцах количественно измеряли с использованием высокочувствительного ELISA на IgG (см. Пример 3). Для каждого момента времени получали данные от трех культур клеток на фильтре.

Пример 9

Чувствительный ELISA на IgG после анализа трансцитоза

Всю процедуру проводили при RT с использованием автоматического промывочного устройства для стадий промывки. 384-луночный планшет покрывали 30 мкл/лунку 1 мкг/мл Fcγ-специфичного антитела против человеческого/мышинного IgG в PBS в течение 2 часов, с последующей 1-часовой инкубацией в блокирующем буфере PBS, содержащем 1% BSA или 1% CroteinC для анализов человеческого и мышинного IgG соответственно. На планшет добавляли и инкубировали в течение 2 часов серийно разведенные образцы

из анализа трансцитоза и стандартные концентрации антитела, использованные в анализе трансцитоза. После четырех промывок добавляли 30 мкл/лунку 50 нг/мл антитела против человеческого/мышинного F(ab)₂, конъюгированного с биотином, в блокирующем буфере и инкубировали в течение еще 2 часов. После 6 промывок добавляли 30 мкл/лунку 50 нг/мл (анализ huIgG) или 100 нг/мл (анализ mIgG) поли-
 5 HRP40-стрептавидин (Fitzgerald; в PBS, содержащий 1% BSA и 0,05% Tween-20) и инкубировали в течение 30 мин. После 4 промывок иммунные комплексы выявляли добавлением 30 мкл/лунку хемилюминисцентного субстрата BM (Roche).

Люминисцентный сигнал измеряли с использованием люминисцентного планшет-ридера,
 10 и концентрацию рассчитывали с использованием аппроксимированной стандартной кривой. Чувствительность анализа варьировала от 10 пг/мл до 10 нг/мл.

Пример 10

Картирование эпитопов посредством клеточного ELISA клеток CHO, трансфицированных мутантами hTfR

15 Для того чтобы иметь возможность определять области эпитопов на человеческом трансферриновом рецепторе (hTfR), вводили мутации в последовательность hTfR в положениях, где кластер экспонированных на поверхности аминокислот имеет другие аминокислоты в выровненной последовательности мышинного TfR (см. Таблицу ниже), следуя тому принципу, что, несмотря на значимую гомологию между человеческим и
 20 мышинным TfR (77%-ная идентичность), не известны антитела, направленные на внеклеточную часть, которые демонстрируют хорошую перекрестную реактивность между обоими ортологами. Клонирование плазмид с соответствующими мутациями описывается выше. Для картирования связывания связывающих агентов в отношении человеческого TfR с данными эпитопами, клетки CHO-K1 временно трансфицировали
 25 желательными плазмидами, и связывание антитела измеряли в клеточном ELISA.

Вкратце, 10⁴ клеток высаживали на лунку 96-луночного планшета за сутки до эксперимента в нормальную ростовую среду (RPMI/10% FCS). На другие сутки среду заменяли на OPTI-MEM с пониженным содержанием сыворотки (Gibco), и в лунки добавляли 10 мкл смеси 1200 мкл OPTI-MEM, 12 мкг плазмидной ДНК и 12 мкл
 30 трансфекционного реактива XtremeGENE (Roche) после 30 минут предынкубации. Клетки инкубировали в течение 2 суток при 37°C/7,5% CO₂, затем среду удаляли, и добавляли антитела против TfR в концентрациях от 1 нМ до 100 нМ в ростовой среде, с последующей 2 ч инкубацией при 4°C. Затем растворы антител заменяли на 0,05% глутаральдегида в PBS, и клетки фиксировали в течение 15 мин при RT, затем дважды
 35 промывали PBS и инкубировали с вторичным антителом против человеческого Fc, конъюгированным с HRP (BioRad; 1:2000 в блокирующем реактиве ELISA (Roche)) в течение 1,5 часов при RT. Сигнал получали после 3 промывок PBS, используя 50 мкл ТМВ на лунку, и поглощение измеряли при 450 нм.

№ плазмиды	Мутации в hTfR
10188	-
18909	Thr518Asp/Gln520Lys/Phe521Ser/Gln524Arg
18910	Arg325Gln
18911	Ser355Ala/Asp356Arg/Lys358Asn/Thr359Ile
18912	Asp204Gln/Lys205Ser/Arg208Asn
18913	Lys574Gly/Glu575Ala/Ile577Thr/Glu578Gln
18914	Ala196Ile/Gln197Gly/Asn198Gln/Ser199Asn/Val200Met/Ile201Val/Ile202Thr/Val203Ile/Asp204Val/Lys205Gln/Asn206Ser/Gly207Asn/Arg208Gly/Leu209Asn/Val210Leu/Tyr211Asp/Leu212Pro
18974	Asp245Glu/Tyr247Ser/Thr248Tyr/Pro249Ser

Пример 11

Основанный на поверхностном плазмонном резонансе анализ связывания в отношении взаимодействия человеческого TfR-антитело

Эксперимент по связыванию проводили на BIAcore B 4000 (GE Healthcare), оснащенном сенсорным чипом C1 (GE Healthcare, кат. №BR1005-35), предобработанным антителом против Fab человека (GE Healthcare, кат. №28-9583-25), с использованием методики на основе стандартной химии аминного связывания согласно руководству поставщика.

Для кинетических измерений опытное антитело иммобилизовали, применяя контактное время 60 секунд и скорость тока 10 мкл/мин, в фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7,4, 0,05% Tween 20 при 25°C. Рекомбинантный меченный His6 человеческий трансферриновый рецептор (R&D systems, кат. №2474-TR-050) наносили в возрастающих концентрациях, и сигнал отслеживали с течением времени. Записывали средний интервал времени: 150 секунд времени ассоциации и 600 секунд времени диссоциации при скорости тока 30 мкл/мин. Данные аппроксимировали с использованием модели связывания 1:1 (изотерма Лангмюра).

Пример 12

Гуманизация доменов VH и VL мышинового и кроличьего антитела против трансферринового рецептора

Антитела против трансферринового рецептора, не являющиеся человеческими, гуманизировали следующим образом: на основе характеристики кодирующих последовательностей и аминокислотных последовательностей, которые составляют домены VH и VL не являющихся человеческими антител класса IgG1 с легкой цепью каппа против трансферринового рецептора, получали соответствующее гуманизированное антитело против трансферринового рецептора посредством пересадки CDR обратных/прямых мутаций на основе комбинации каркасной области человеческой зародышевой линии VH4_3 и VK1_10 для клона 299.

Пример 13

Способ определения аффинности в отношении рецептора TfR человека/яванского макака

В данном примере описывается способ определения аффинностей человеческого трансферринового рецептора для сравнения характеристик диссоциации.

Для всех анализов использовали набор Biotin CAPture от GE Healthcare (инструкция 28-9242-34 AB). Во-первых, чип регидратировали посредством его установки в прибор BIAcore T200. После этого чип оставляли в режиме ожидания с пропуском подвижного буфера в течение ночи. Для подготовки поверхности реактив Biotin CAPture разводили 1:100 в подвижном буфере (1× PBS, дополненный 0,25 М NaCl). Данный раствор инъецировали на проточные ячейки 1-4 в течение 360 с со скоростью тока 2 мкл/мин. Затем поверхность сенсора доводили до кондиции тремя одномоментными инъекциями регенерирующего раствора, предоставленного в наборе Biotin CAPture. Это необходимо было сделать для процедуры установки или для первого раза, или после хранения. 100 нМ раствор монобиотинилированного трансферринового рецептора человека или яванского макака, соответственно, должен быть инъецирован на проточную ячейку 2 в течение 30 с при скорости тока 10 мкл/мин. Для определения аффинности применяли инъекции шести концентраций (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 и 0 нМ). Их инъецировали на «проточную ячейку hu-TfR» (например, проточную ячейку 2, полученную, как описано выше) со временем инъекции 180 с (ассоциация) и скоростью тока 10 мкл/мин. После 600 с фазы диссоциации поверхность регенерировали согласно инструкциям изготовителя с использованием регенерирующего раствора, предоставленного в наборе Biotin CAPture, и проводили следующий цикл.

Кинетические данные оценивали с использованием программы оценки BIAcore T200. В особенности, принимали во внимание константы скорости диссоциации разных связывающих агентов в отношении человеческого трансферринового рецептора после применения модели связывания Лангмюра 1:1.

Пример 14

Относительное ранжирование на B4000 диссоциации от трансферринового рецептора человека/яванского макака

Сенсорный чип CAP (предоставленный в наборе Biotin CAPture, серия S #28-9202-34 GE) устанавливали в систему BIAcore B4000, нормировали и адресовали гидродинамическим способом согласно инструкциям изготовителя. В первом цикле реактив CAP (в том виде, в котором он предоставлен в наборе) адресовали в пятно 1, 2, 4 и 5 со скоростью тока 10 мкл/мин в течение 300 с. Захват человеческого трансферринового рецептора происходил в пятне 1 (биотинилированный человеческий трансферриновый рецептор) и в пятне 5 (биотинилированный трансферриновый рецептор яванского макака) со скоростью тока 10 мкл/мин и контактным временем 30 с. Рецепторы разводили до концентрации 50 нМ подвижным буфером (1× PBS #28995084, GE Healthcare, дополненный 0,25 М NaCl). Антитела инъецировали во все проточные ячейки в рядах концентраций 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 0 нМ в течение 180 с при скорости тока 30 мкл/мин. Было установлено время диссоциации 300 с. Регенерацию всего комплекса из чипа CAP проводили с использованием регенерирующего раствора, предоставленного в наборе Biotin CAPture (120 с со скоростью тока 10 мкл/мин). Для контроля концентрации активного белка осуществляли второй цикл в пятне 5 с использованием биотинилированного белка А (#P2165-2MG, Sigma) со скоростью тока 10 мкл/мин и контактным временем 30 с. В данном контрольном цикле пятно 1 оставляли пустым. С антителами и регенерацией манипулировали подобно циклу 1. Релевантные кинетические данные рассчитывали с использованием программы оценки BIAcore B4000. Диссоциацию от человеческого трансферринового рецептора определяли, применяя аппроксимацию диссоциации 1:1.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> АНТИТЕЛА ПРОТИВ ТРАНСФЕРРИНОВОГО РЕЦЕПТОРА, ОБЛАДАЮЩИЕ ИНДИВИДУАЛИЗИРОВАННОЙ
 <130> P32937
 <150> EP15173508.1
 <151> 2015-06-24
 5 <150> EP15176084.0
 <151> 2015-07-09
 <160> 97
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 10 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 1
 Gln Ser Met Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 15 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 20 20 25 30
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
 65 70 75 80
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Tyr
 25 85 90 95
 Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp Pro Trp
 100 105 110
 Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 30 <210> 2
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> anti-TfR mAb 567 VH (=humanized 299 VH_basic)
 <400> 2
 Gln Ser Met Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 40 20 25 30
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 45 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
 65 70 75 80
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Tyr
 85 90 95

RU 2 729 416 C2

Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp Pro Trp
100 105 110
Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 3
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

10 <223> 299-001 VH humanization variant
<400> 3
Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly Ser
1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
15 20 25 30
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
35 40 45
Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60
20 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95
Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
25 100 105 110
Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 125
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 299-002 VH humanization variant
<400> 4

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

RU 2 729 416 C2

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 5
<211> 124
5 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 299-005 VH humanization variant
<400> 5
10 Gln Ser Met Glu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly Ser
1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
20 25 30
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
15 35 40 45
Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80
20 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95
Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
100 105 110
Pro Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
25 115 120
<210> 6
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
30 <220>
<223> 299-006 VH humanization variant
<400> 6
Gln Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly Ser
1 5 10 15
35 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
20 25 30
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45
Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
40 50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95
45 Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
100 105 110
Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5 <220>
 <223> 299-007 VH humanization variant_DANG
 <400> 7
 Gln Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 10 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 15 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 65 70 75 80
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90 95
 20 Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
 100 105 110
 Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 8
 25 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 299-008 VH humanization variant
 30 <400> 8
 Gln Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 20 25 30
 35 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 40 65 70 75 80
 Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr
 85 90 95
 Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp Pro Trp
 100 105 110
 45 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 9
 <211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 299-009 VH humanization variant_DANG

5 <400> 9

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

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

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

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

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

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
 100 105 110

20 Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10

<211> 124

<212> PRT

25 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> 299-009 VH humanization variant_DASG

<400> 10

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

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

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

35 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 50 55 60

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

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

40 Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp
 100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

45 <210> 11

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 299-009 VH humanization variant_DAQG

<400> 11

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

20 <210> 12

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

25 <223> 299-011 VH humanization variant

<400> 12

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

<210> 13

<211> 125

45 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 299-012 VH humanization variant

<400> 13

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

<210> 14

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 299-013 VH humanization variant

<400> 14

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

<210> 15

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 299-015 VH humanization variant

<400> 15

Gln Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr

RU 2 729 416 C2

	1		5		10		15
	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val
			20			25	
	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro
5			35			40	
	Tyr	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Ser
			50			55	
	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp
			65			70	
10	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala
			85			90	
	Arg	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro
			100			105	
	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
15			115			120	
	<210>	16					
	<211>	124					
	<212>	PRT					
	<213>	Artificial Sequence					
20	<220>						
	<223>	299-016 VH humanization variant					
	<400>	16					
	Gln	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly
	1		5		10		15
25	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val
			20			25	
	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro
			35			40	
	Tyr	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Ser
30			50			55	
	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp
			65			70	
	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala
			85			90	
35	Arg	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro
			100			105	
	Pro	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu
			115			120	
	<210>	17					
40	<211>	124					
	<212>	PRT					
	<213>	Artificial Sequence					
	<220>						
	<223>	299-017 VH humanization variant					
45	<400>	17					
	Gln	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly
	1		5		10		15
	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val

RU 2 729 416 C2

20 25 30
 Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 5 50 55 60
 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 65 70 75 80
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90 95
 10 Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
 100 105 110
 Pro Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 18
 15 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 299-018 VH humanization variant
 20 <400> 18
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30
 25 Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 30 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe
 100 105 110
 35 Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 19
 <211> 124
 <212> PRT
 40 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 299-019 VH humanization variant
 <400> 19
 Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr
 45 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

RU 2 729 416 C2

35 40 45
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Ser
 50 55 60
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 5 65 70 75 80
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90 95
 Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
 100 105 110
 10 Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 299-020 VH humanization variant
 <400> 20
 Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr
 20 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 25 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Ser
 50 55 60
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 65 70 75 80
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 30 85 90 95
 Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
 100 105 110
 Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 35 <210> 21
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 40 <223> 299-021 VH humanization variant
 <400> 21
 Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 45 20 25 30
 Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser

RU 2 729 416 C2

```

      50              55              60
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
65              70              75              80
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
5              85              90              95
Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
      100              105              110
Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115              120
10 <210> 22
   <211> 124
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence
   <220>
15 <223> 299-022 VH humanization variant
   <400> 22
Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr
1              5              10              15
Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
20              20              25              30
Met Ser Trp Val Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
      35              40              45
Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
      50              55              60
25 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
65              70              75              80
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
      85              90              95
Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
30              100              105              110
Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115              120
   <210> 23
   <211> 122
35 <212> PRT
   <213> Artificial Sequence
   <220>
   <223> 299-023 VH humanization variant_DANG
   <400> 23
40 Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr
1              5              10              15
Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
      20              25              30
Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
45              35              40              45
Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
      50              55              60
Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys Leu Ser

```

RU 2 729 416 C2

65 70 75 80
 Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr
 85 90 95
 Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp Pro Trp
 5 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 24
 <211> 122
 10 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 299-023 VH humanization variant_DASG
 <400> 24
 15 Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 20 35 40 45
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
 50 55 60
 Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys Leu Ser
 65 70 75 80
 25 Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr
 85 90 95
 Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp Pro Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 30 115 120
 <210> 25
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> 299-023 VH humanization variant_DAGG
 <400> 25
 Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr
 1 5 10 15
 40 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
 45 50 55 60
 Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys Leu Ser
 65 70 75 80
 Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr

RU 2 729 416 C2

				85					90				95			
	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Gly	Asp	Ala	Gln	Gly	Phe	Asp	Pro	Trp
				100					105					110		
	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
5				115					120							
	<210>	26														
	<211>	110														
	<212>	PRT														
	<213>	Oryctolagus cuniculus														
10	<400>	26														
	Ala	Tyr	Asp	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Ser	Val	Glu	Val	Ala	Val	Gly
	1				5					10					15	
	Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Lys	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
15	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Arg	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
				35					40				45			
	Tyr	Arg	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Ser	Ser	Arg	Phe	Lys	Gly
				50			55					60				
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Val	Glu	Cys
20	65					70				75					80	
	Ala	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Cys	Tyr	Ser	Ser	Ser	Asn
					85					90					95	
	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Val	Val	Val	Lys		
				100					105					110		
25	<210>	27														
	<211>	110														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
30	<223>	anti-TfR mAb 567 VL (=humanized 299 VL_basic)														
	<400>	27														
	Ala	Tyr	Asp	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Ser	Val	Glu	Val	Ala	Val	Gly
	1				5					10					15	
	Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Lys	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
35				20					25					30		
	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Arg	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
				35					40				45			
	Tyr	Arg	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Ser	Ser	Arg	Phe	Lys	Gly
				50			55					60				
40	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Val	Glu	Ser
	65					70				75					80	
	Ala	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ser	Ser	Asn
					85					90					95	
	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Val	Val	Val	Lys		
45				100					105					110		
	<210>	28														
	<211>	110														
	<212>	PRT														

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 567 VL humanization variant_PNYA

<400> 28

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

<210> 29

20 <211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 299-001 VL humanization variant

25 <400> 29

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

40 <210> 30

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

45 <223> 299-002 VL humanization variant_SYS

<400> 30

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

RU 2 729 416 C2

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
5 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
10 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95
Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
<210> 31
<211> 110
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 299-003 VL humanization variant
<400> 31
20 Ala Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
25 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
30 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95
Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
<210> 32
35 <211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 299-004 VL humanization variant
40 <400> 32
Ala Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
45 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

RU 2 729 416 C2

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95
5 Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
<210> 33
<211> 110
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> 299-005 VL humanization variant
<400> 33
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
15 1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
20 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
25 85 90 95
Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
<210> 34
<211> 110
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 299-006 VL humanization variant_SYS
<400> 34
35 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
40 35 40 45
Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
45 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95
Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 35
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5 <220>
 <223> 299-007 VL humanization variant
 <400> 35
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 10 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 15 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
 85 90 95
 20 Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 36
 <211> 110
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 299-008 VL humanization variant
 <400> 36
 Ala Tyr Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 30 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 35 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
 40 85 90 95
 Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 37
 <211> 110
 45 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 299-009 VL humanization variant_NYA

<400> 37
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 5 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 10 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn
 85 90 95
 Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 15 100 105 110
 <210> 38
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> 299-009 VL humanization variant_SYA
 <400> 38
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 25 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 30 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ala Ser Ser Asn
 85 90 95
 35 Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 39
 <211> 110
 <212> PRT
 40 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 299-009 VL humanization variant_NYS
 <400> 39
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 45 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

RU 2 729 416 C2

35 40 45
 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 5 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr Ser Ser Ser Asn
 85 90 95
 Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 10 <210> 40
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 15 <223> 299-009 VL humanization variant_GYS
 <400> 40
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 25 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Ser Asn
 85 90 95
 Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 30 100 105 110
 <210> 41
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> 299-009 VL humanization variant_CYS
 <400> 41
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 40 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 45 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Cys Tyr Ser Ser Ser Asn

RU 2 729 416 C2

				85					90				95			
	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
				100					105				110			
	<210>	42														
5	<211>	110														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
	<223>	299-010 VL humanization variant														
10	<400>	42														
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5				10					15		
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
15	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
				35					40					45		
	Tyr	Arg	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
				50					55					60		
	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
20	65					70					75				80	
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ser	Ser	Asn
						85					90				95	
	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
				100					105					110		
25	<210>	43														
	<211>	110														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
30	<223>	299-012 VL humanization variant_HYS														
	<400>	43														
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5				10					15		
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
35				20					25					30		
	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
				35					40					45		
	Tyr	Arg	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
				50					55					60		
40	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65					70					75				80	
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ser	Ser	Ser	Asn
						85					90				95	
	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
45				100					105					110		
	<210>	44														
	<211>	110														
	<212>	PRT														

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 299-014 VL humanization variant

<400> 44

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

<210> 45

20 <211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 299-015 VL humanization variant_AYS

25 <400> 45

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

40 <210> 46

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

45 <223> 299-017 VL humanization variant_TYS

<400> 46

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

RU 2 729 416 C2

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
5 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
10 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95
Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
<210> 47
<211> 119
15 <212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 47
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
20 Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Cys Asp Pro Lys Phe
25 50 55 60
Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
30 Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115
<210> 48
35 <211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 494 VH variant D52A
40 <400> 48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30
45 Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Ala Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Asp Pro Lys Phe
50 55 60

RU 2 729 416 C2

Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
5 Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115
<210> 49
10 <211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 494 VH variant D52L
15 <400> 49
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Leu Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Asp Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
25 65 70 75 80
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110
30 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115
<210> 50
<211> 119
<212> PRT
35 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> 494 VH variant D31G
<400> 50
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Val Lys Pro Gly Ala
40 1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Gly Thr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
45 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Asp Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

RU 2 729 416 C2

	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
					85					90					95	
	Val	Arg	Asp	Tyr	Leu	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
				100					105					110		
5	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser									
				115												
	<210>	51														
	<211>	119														
	<212>	PRT														
10	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
	<223>	494 VH variant L101A														
	<400>	51														
15	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Val	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Pro	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr
				20					25					30		
	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Ile	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				35				40					45			
20	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	Asp	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Lys	Phe
		50					55					60				
	Gln	Val	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
25					85					90					95	
	Val	Arg	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
				100					105					110		
	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser									
				115												
30	<210>	52														
	<211>	119														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
35	<223>	494-001 VH humanization variant														
	<400>	52														
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr
40				20					25					30		
	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Ile	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
				35				40					45			
	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	Asp	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Lys	Phe
		50					55					60				
45	Gln	Val	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr

RU 2 729 416 C2

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115
5 <210> 53
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
10 <223> 494-002 VH humanization variant
<400> 53
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
15 20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Ala Pro Lys Phe
50 55 60
20 Gln Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
25 100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 54
<211> 119
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 494-003 VH humanization variant
<400> 54
35 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
40 35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Asp Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
45 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 55
 <211> 119
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 494-004 VH humanization variant
 <400> 55
 10 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 15 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 20 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 25 115
 <210> 56
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 30 <220>
 <223> 494-005 VH humanization variant
 <400> 56
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 35 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Asp Pro Lys Phe
 40 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 45 Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 57
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5 <220>
 <223> 494-006 VH humanization variant
 <400> 57
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 10 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Asp Pro Ser Leu
 15 50 55 60
 Gln Ser Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Gln Ala Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 20 Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 58
 25 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 494-007 VH humanization variant
 30 <400> 58
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 35 Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Asp Pro Ser Val
 50 55 60
 Gln Val Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 40 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 45 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 59
 <211> 107

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 59
 Lys Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Leu Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Tyr Asn Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105
 <210> 60
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 494-001 VL humanization variant
 <400> 60
 Lys Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Tyr Asn Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 61
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 494-002 VL humanization variant
 <400> 61
 Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr

RU 2 729 416 C2

20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 5 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Tyr Asn Tyr Pro Leu
 85 90 95
 10 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 62
 <211> 107
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 494-003 VL humanization variant
 <400> 62
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 20 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 25 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Tyr Asn Tyr Pro Leu
 30 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 63
 <211> 107
 35 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 494-004 VL humanization variant
 <400> 63
 40 Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 45 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro

RU 2 729 416 C2

	65	70										75				80		
	Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Tyr Asn Tyr Pro Leu																	
		85										90				95		
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys																	
5		100										105						
	<210>	64																
	<211>	118																
	<212>	PRT																
	<213>	Mus musculus																
10	<400>	64																
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala																	
	1	5										10				15		
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr																	
		20										25				30		
15	Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met																	
		35										40				45		
	Gly Arg Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe																	
		50										55				60		
	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr																	
20	65	70										75				80		
	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys																	
		85										90				95		
	Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr																	
		100										105				110		
25	Leu Val Thr Val Ser Ser																	
		115																
	<210>	65																
	<211>	106																
	<212>	PRT																
30	<213>	Mus musculus																
	<400>	65																
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly																	
	1	5										10				15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Ile Arg Tyr Ile																	
35		20										25				30		
	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr																	
		35										40				45		
	Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser																	
		50										55				60		
40	Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu																	
	65	70										75				80		
	Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Asn Ser Tyr Pro Trp Thr																	
		85										90				95		
	Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys																	
45		100										105						
	<210>	66																
	<211>	7																
	<212>	PRT																

<213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 66
 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 1 5
 5 <210> 67
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 67
 10 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5
 <210> 68
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 68
 Trp Ser Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 69
 20 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 69
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 25 1 5 10 15
 <210> 70
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 30 <220>
 <223> 299-000 HVR-H2 Kabat G65S
 <400> 70
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
 1 5 10 15
 35 <210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 71
 40 Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
 1 5 10 15
 Pro
 <210> 72
 <211> 17
 45 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 299-000 HVR-H3 DASG

<400> 72
 Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp
 1 5 10 15
 Pro
 5 <210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 10 <223> 299-000 HVR-H3 DAQG
 <400> 73
 Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Gln Gly Phe Asp
 1 5 10 15
 Pro
 15 <210> 74
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 74
 20 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10
 <210> 75
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 299-000 HVR-L1 RAA
 <400> 75
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
 30 1 5 10
 <210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 35 <400> 76
 Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 77
 <211> 12
 40 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 77
 Gln Gln Cys Tyr Ser Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr
 1 5 10
 45 <210> 78
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 299-000 HVR-L3 NYA
 <400> 78
 Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr
 5 1 5 10
 <210> 79
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> anti-CD20 antibody VH
 <400> 79
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 15 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 20 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 80
 30 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> anti-CD20 antibody VL
 35 <400> 80
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 40 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 45 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

RU 2 729 416 C2

	100	105	110
<210>	81		
<211>	126		
<212>	PRT		
5 <213>	Homo sapiens		
<400>	81		
	Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
10	20 25 30		
	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35 40 45		
	Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
	50 55 60		
15	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85 90 95		
	Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr		
20	100 105 110		
	Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115 120 125		
<210>	82		
<211>	108		
25 <212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	82		
	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	1 5 10 15		
30	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser		
	20 25 30		
	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
	35 40 45		
	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser		
35	50 55 60		
	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu		
	65 70 75 80		
	Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro		
	85 90 95		
40	Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100 105		
<210>	83		
<211>	116		
<212>	PRT		
45 <213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	humanized anti-alpha synuclein acntibody 9E4 VH		
<400>	83		

RU 2 729 416 C2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 5 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 10 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 15 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 84
 <211> 113
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> humanized anti-alpha synuclein acntibody 9E4 VL
 <400> 84
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 25 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ile Gln Thr Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45
 30 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 35 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 85
 40 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 85
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Thr
 45 1 5 10 15
 Ser Val Gln Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Ile Lys Ala Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

RU 2 729 416 C2

		35		40		45											
		Gly	Ala	Thr	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Tyr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gln	Arg	Phe
		50					55					60					
		Lys	Asp	Lys	Ala	Ile	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
5		65				70					75					80	
		Met	His	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
					85					90					95		
		Ala	Ser	Gly	Gly	His	Leu	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Val	Val	Thr
				100					105					110			
10		Val	Ser	Ala													
				115													
		<210>		86													
		<211>		112													
		<212>		PRT													
15		<213>		Mus musculus													
		<400>		86													
		Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
		1			5					10					15		
		Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Phe	His	Ser
20				20				25						30			
		Lys	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
				35				40					45				
		Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Asn	Arg	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
		50				55						60					
25		Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
		65				70					75				80		
		Ser	Gly	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser
					85					90					95		
		Ala	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Arg
30				100				105						110			
		<210>		87													
		<211>		115													
		<212>		PRT													
		<213>		Mus musculus													
35		<400>		87													
		Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Thr	Ser
		1			5					10					15		
		Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	Tyr
				20				25						30			
40		Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
				35				40					45				
		Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Ser	Glu	Lys	Phe	Lys
		50				55						60					
		Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met
45		65				70					75				80		
		Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala
					85					90					95		
		Arg	Asp	Gly	Cys	Tyr	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val

RU 2 729 416 C2

	100	105	110
	Thr Val Ser		
	115		
	<210> 88		
5	<211> 111		
	<212> PRT		
	<213> Mus musculus		
	<400> 88		
10	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
	1 5 10 15		
	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp		
	20 25 30		
	Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
	35 40 45		
15	Lys Phe Leu Ile Cys Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala		
	50 55 60		
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His		
	65 70 75 80		
	Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn		
20	85 90 95		
	Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100 105 110		
	<210> 89		
	<211> 115		
25	<212> PRT		
	<213> Oryctolagus cuniculus		
	<400> 89		
	Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro		
	1 5 10 15		
30	Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Asn Ser Tyr Ala		
	20 25 30		
	Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly		
	35 40 45		
	Val Ile Tyr Pro Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly		
35	50 55 60		
	Arg Phe Thr Val Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr		
	65 70 75 80		
	Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp		
	85 90 95		
40	Gly Thr Asp Lys Thr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr		
	100 105 110		
	Val Ser Leu		
	115		
	<210> 90		
45	<211> 112		
	<212> PRT		
	<213> Oryctolagus cuniculus		
	<400> 90		

RU 2 729 416 C2

Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Tyr Gly Asp Asn
20 25 30
5 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln
10 65 70 75 80
Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Glu Phe Leu Cys Thr
85 90 95
Thr Ser Asp Cys Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Gly Val Val Val Arg
100 105 110
15 <210> 91
<211> 119
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
<400> 91
20 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala
20 25 30
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
25 35 40 45
Val Ile Asn Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Glu Thr Ser Thr Thr Val Glu Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80
30 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Thr
85 90 95
Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Phe Gln Gly Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Leu
35 115
<210> 92
<211> 111
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
40 <400> 92
Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn
20 25 30
45 Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Arg Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys
50 55 60

RU 2 729 416 C2

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln
 65 70 75 80
 Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp
 85 90 95
 5 Ala Asp Met Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110
 <210> 93
 <211> 111
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain variable domain
 <400> 93
 Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 15 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Asp Thr
 20 20 25 30
 Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 20 Ser Ile Tyr Thr Asp Ser Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Arg
 65 70 75 80
 Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 25 85 90 95
 Asn Phe Ser Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Leu
 100 105 110
 <210> 94
 <211> 112
 30 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> light chain variable domain
 <400> 94
 35 Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Ser Asp
 20 25 30
 Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Met Arg Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 40 35 40 45
 Ile Tyr Asp Val Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln
 65 70 75 80
 45 Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Cys Ser
 85 90 95
 Ser Ala Glu Cys Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 95
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5 <220>
 <223> peptidic linker
 <400> 95
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 10 Gly Gly Gly Ser
 20
 <210> 96
 <211> 32
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> peptidic linker
 <400> 96
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 20 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 <210> 97
 <211> 536
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 97
 Met Glu Phe Ser Ser Pro Ser Arg Glu Glu Cys Pro Lys Pro Leu Ser
 1 5 10 15
 30 Arg Val Ser Ile Met Ala Gly Ser Leu Thr Gly Leu Leu Leu Leu Gln
 20 25 30
 Ala Val Ser Trp Ala Ser Gly Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe
 35 35 40 45
 Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser
 35 50 55 60
 Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu
 65 70 75 80
 Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln
 85 90 95
 40 Ala Asn His Thr Gly Thr Gly Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln
 100 105 110
 Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala
 115 120 125
 Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu
 45 130 135 140
 Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val
 145 150 155 160
 Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp

RU 2 729 416 C2

				165					170				175			
	Thr	Pro	Asp	Asp	Phe	Gln	Leu	His	Asn	Phe	Ser	Leu	Pro	Glu	Glu	Asp
				180					185				190			
	Thr	Lys	Leu	Lys	Ile	Pro	Leu	Ile	His	Arg	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gln
5			195					200					205			
	Arg	Pro	Val	Ser	Leu	Leu	Ala	Ser	Pro	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Trp	Leu
			210				215					220				
	Lys	Thr	Asn	Gly	Ala	Val	Asn	Gly	Lys	Gly	Ser	Leu	Lys	Gly	Gln	Pro
	225					230					235				240	
10	Gly	Asp	Ile	Tyr	His	Gln	Thr	Trp	Ala	Arg	Tyr	Phe	Val	Lys	Phe	Leu
				245					250					255		
	Asp	Ala	Tyr	Ala	Glu	His	Lys	Leu	Gln	Phe	Trp	Ala	Val	Thr	Ala	Glu
			260						265				270			
	Asn	Glu	Pro	Ser	Ala	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Phe	Gln	Cys	Leu
15			275					280				285				
	Gly	Phe	Thr	Pro	Glu	His	Gln	Arg	Asp	Phe	Ile	Ala	Arg	Asp	Leu	Gly
		290					295				300					
	Pro	Thr	Leu	Ala	Asn	Ser	Thr	His	His	Asn	Val	Arg	Leu	Leu	Met	Leu
	305					310				315					320	
20	Asp	Asp	Gln	Arg	Leu	Leu	Leu	Pro	His	Trp	Ala	Lys	Val	Val	Leu	Thr
				325						330				335		
	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Lys	Tyr	Val	His	Gly	Ile	Ala	Val	His	Trp	Tyr
			340						345				350			
	Leu	Asp	Phe	Leu	Ala	Pro	Ala	Lys	Ala	Thr	Leu	Gly	Glu	Thr	His	Arg
25			355					360				365				
	Leu	Phe	Pro	Asn	Thr	Met	Leu	Phe	Ala	Ser	Glu	Ala	Cys	Val	Gly	Ser
		370					375				380					
	Lys	Phe	Trp	Glu	Gln	Ser	Val	Arg	Leu	Gly	Ser	Trp	Asp	Arg	Gly	Met
	385				390				395						400	
30	Gln	Tyr	Ser	His	Ser	Ile	Ile	Thr	Asn	Leu	Leu	Tyr	His	Val	Val	Gly
				405					410					415		
	Trp	Thr	Asp	Trp	Asn	Leu	Ala	Leu	Asn	Pro	Glu	Gly	Gly	Pro	Asn	Trp
			420						425				430			
	Val	Arg	Asn	Phe	Val	Asp	Ser	Pro	Ile	Ile	Val	Asp	Ile	Thr	Lys	Asp
35			435					440				445				
	Thr	Phe	Tyr	Lys	Gln	Pro	Met	Phe	Tyr	His	Leu	Gly	His	Phe	Ser	Lys
		450					455				460					
	Phe	Ile	Pro	Glu	Gly	Ser	Gln	Arg	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Ser	Gln	Lys
	465				470					475					480	
40	Asn	Asp	Leu	Asp	Ala	Val	Ala	Leu	Met	His	Pro	Asp	Gly	Ser	Ala	Val
				485					490					495		
	Val	Val	Val	Leu	Asn	Arg	Ser	Ser	Lys	Asp	Val	Pro	Leu	Thr	Ile	Lys
			500						505				510			
	Asp	Pro	Ala	Val	Gly	Phe	Leu	Glu	Thr	Ile	Ser	Pro	Gly	Tyr	Ser	Ile
45			515					520				525				
	His	Thr	Tyr	Leu	Trp	Arg	Arg	Gln								
		530					535									

(57) Формула изобретения

1. Гуманизированное антитело, которое специфично связывается с человеческим трансферриновым рецептором, где указанное антитело содержит: HVR (гипервариабельная область) SEQ ID NO 66, 68 и 72 в вариабельном домене тяжелой цепи и HVR SEQ ID NO 75, 76 и 78 в вариабельном домене легкой цепи.

2. Гуманизированное антитело по п. 1, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO 24 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO 37.

3. Гуманизированное антитело по п. 1 или 2, где у данного гуманизированного антитела исключена эффекторная функция.

4. Гуманизированное антитело по любому из пп. 1-3, где указанное гуманизированное антитело специфично связывается с человеческим трансферриновым рецептором и с трансферриновым рецептором яванского макака.

5. Челночный модуль для гематоэнцефалического барьера, содержащий гуманизированное антитело по любому из пп. 1-4 и эффекторное соединение для головного мозга, соединенное с указанным антителом.

6. Фармацевтический препарат для транспортировки эффекторного соединения для головного мозга через гематоэнцефалический барьер, содержащий эффективное количество челночного модуля по п. 5, и фармацевтически приемлемый носитель.

7. Челночный модуль по п. 5 для применения в качестве лекарственного средства.

8. Применение челночного модуля по п. 5 в изготовлении лекарственного средства для лечения неврологического расстройства.

9. Применение по п. 8, где неврологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства, связанного с глазным заболеванием, эпилепсии, лизосомальной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, поведенческого расстройства и воспаления ЦНС (центральная нервная система).

10. Применение антитела по любому из пп. 1-4 в изготовлении лекарственного средства для транспортировки одного или более чем одного соединения через гематоэнцефалический барьер.

11. Челночный модуль по п. 5 для применения в лечении неврологического расстройства.

12. Челночный модуль по п. 11, где неврологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства, связанного с глазным заболеванием, эпилепсии, лизосомальной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, поведенческого расстройства и воспаления ЦНС.

13. Применение челночного модуля по п. 5 в изготовлении лекарственного средства.

14. Применение по п. 13, при котором лекарственное средство служит для лечения неврологического расстройства выбранного из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства, связанного с глазным заболеванием, эпилепсии, лизосомальной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, поведенческого расстройства и воспаления ЦНС.

15. Способ лечения, включающий введение челночного модуля по п. 5 для лечения неврологического расстройства.

16. Способ по п. 15, в котором неврологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания,

рака, расстройства, связанного с глазным заболеванием, эпилепсии, лизосомальной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, поведенческого расстройства и воспаления ЦНС.

5

10

15

20

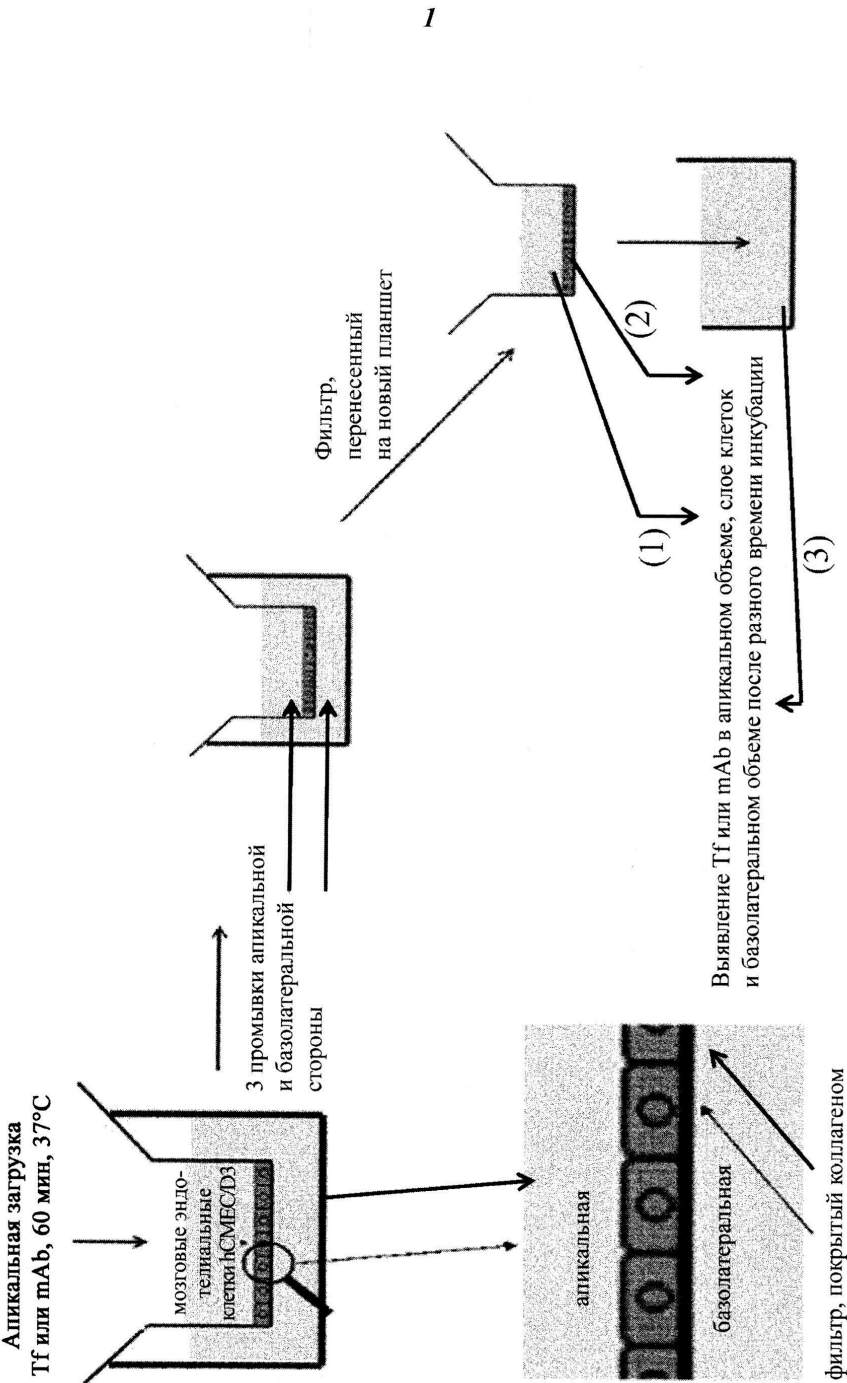
25

30

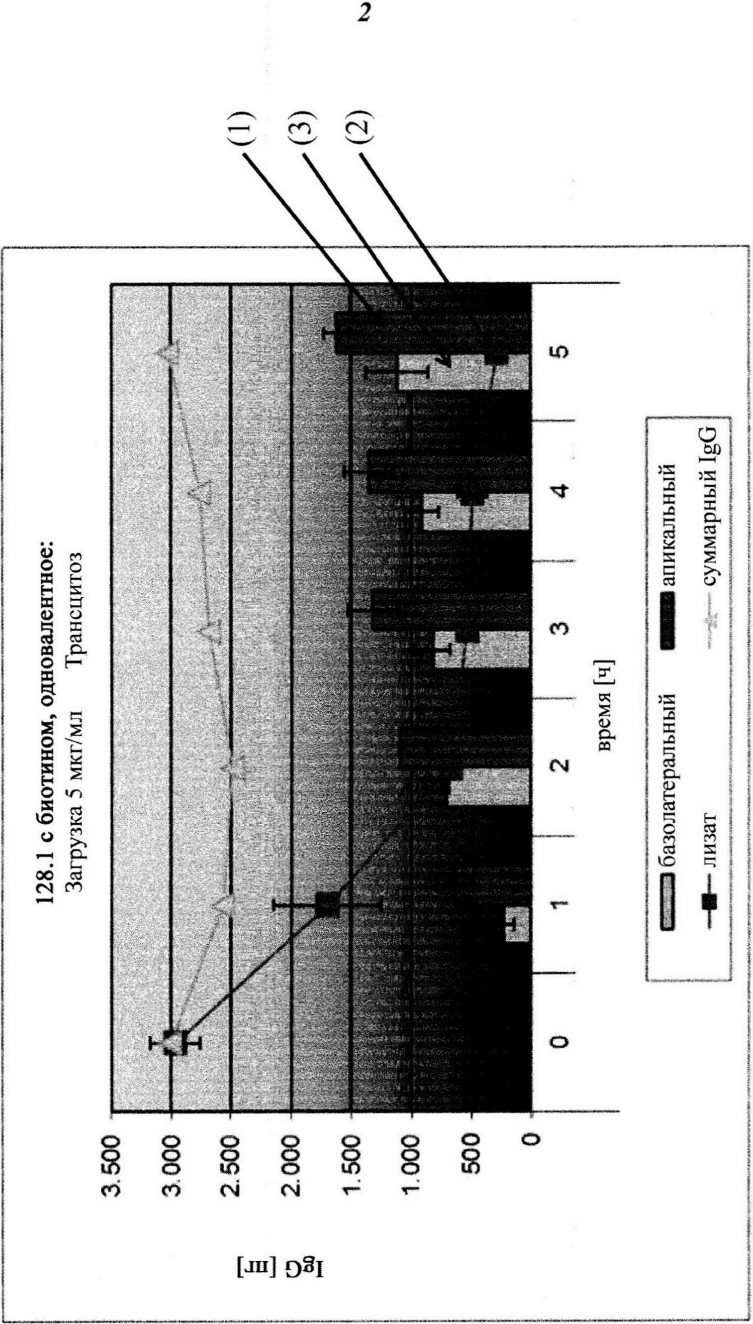
35

40

45



ФИГ. 1



ФИГ. 1 продолжение



4

