



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.29

(21) Номер заявки
201390785

(22) Дата подачи заявки
2011.11.29

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) ВАРИАНТЫ АНТИТЕЛА ДЛЯ ПЕРЕНОСА СОЕДИНЕНИЯ ЧЕРЕЗ
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР

(31) 61/418,223

(32) 2010.11.30

(33) US

(43) 2013.11.29

(86) PCT/US2011/062445

(87) WO 2012/075037 2012.06.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Деннис Марк, Уоттс Райан
Джефферсон, Юй Юньхуа Джой,
Чжан Инь (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) BOADO RUBEN J. ET AL.: "Pharmacokinetics and brain uptake of a genetically engineered bifunctional fusion antibody targeting the mouse transferrin receptor.", MOLECULAR PHARMACEUTICS 1 FEB 2010, LNKD-PUBMED:19921848, vol. 7, no. 1, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 237-244, XP002669226, ISSN: 1543-8392, the whole document

PARDRIDGE WILLIAM M.: "Biologic TNF[alpha]-inhibitors that cross the human blood-brain barrier.", BIOENGINEERED BUGS 2010 JUL-AUG, LNKD- PUBMED:21327054, vol. 1, no. 4, July 2010 (2010-07), pages 231-234, XP002669295, ISSN: 1949-1026, abstract

RUBEN J. BOADO ET AL.: "IgG-single chain Fv fusion protein therapeutic for Alzheimer's disease: Expression in CHO cells and pharmacokinetics and brain delivery in the rhesus monkey", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, vol. 105, no. 3, 15 February 2010 (2010-02-15), pages 627-635, XP002622927, ISSN: 0006-3592, DOI:

10.1002/BIT.22576 [retrieved on 2009-10-08], the whole document

BOADO RUBEN J. ET AL.: "Drug targeting of erythropoietin across the primate blood-brain barrier with an IgG molecular Trojan horse", JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, US, vol. 333, no. 3, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 961-969, XP009145098, ISSN: 0022-3565, DOI: 10.1124/JPET.109.165092, the whole document

COLE SARAH L. ET AL.: "The Alzheimer's disease I-secretase enzyme, BACE1", MOLECULAR NEURODEGENERATION, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, vol. 2, no. 1, 15 November 2007 (2007-11-15), page 22, XP021039872, ISSN: 1750-1326, the whole document

YU Y JOY ET AL.: "Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target.", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE 25 MAY 2011, LNKD- PUBMED:21613623, vol. 3, no. 84, 25 May 2011 (2011-05-25), page 84RA44, XP8148394, ISSN: 1946-6242, the whole document

QING-HUI ZHOU ET AL.: "Receptor-Mediated Abeta Amyloid Antibody Targeting to Alzheimer's Disease Mouse Brain", MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol. 8, no. 1, 7 February 2011 (2011-02-07), pages 280-285, XP55018642, ISSN: 1543-8384, DOI: 10.1021/mp1003515, the whole document

PAUL STEVEN M.: "Therapeutic antibodies for brain disorders", SCIENCE/SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, WASHINGTON, DC: AAAS, US, vol. 3, no. 84, 25 May 2011 (2011-05-25), page 84PS20, XP009155720, ISSN: 1946-6242, the whole document

ATWAL JASVINDER K. ET AL.: "A therapeutic antibody targeting BACE1 inhibits amyloid-[beta] production in vivo.", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE 25 MAY 2011, LNKD- PUBMED:21613622, vol. 3, no. 84, 25 May 2011 (2011-05-25), page 84RA43, XP009155719, ISSN: 1946-6242, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к способу переноса соединения через гематоэнцефалический барьер, включающему введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с аффинностью от приблизительно 20 нМ до приблизительно 10 мкМ с рецептором гематоэнцефалического барьера (R ГЭБ), связанного с соединением, так что антитело переносит связанное с ним соединение через гематоэнцефалический барьер; к полиспецифическому антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий

сайт, который связывается с антигеном головного мозга; а также к применению указанного антитела для производства лекарственного средства и для лечения неврологического нарушения.

034333 B1

034333 B1

Родственные заявки

По заявке на настоящий патент испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 61/418223, поданной 30 ноября 2010 г., которая включена в качестве ссылки в полном объеме.

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с рецепторами гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), и способам их применения.

Предпосылки создания изобретения

Почти совершенно непроницаемый гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) значительно ограничивает проникновение в головной мозг лекарственных средств в случае больших молекул. Среди множества стратегий для преодоления этого препятствия находится использование путей транспорта посредством трансцитоза, начинающихся с эндогенных рецепторов, представленных в эндотелии капилляров головного мозга. Были разработаны рекомбинантные белки, такие как моноклональные антитела против этих рецепторов, чтобы сделать возможной опосредованную рецепторами доставку больших молекул в головной мозг. Однако стратегии для максимизации доставки в головной мозг при минимизации трансцитоза в противоположном направлении обратно в кровь и степень аккумуляции после введения дозы остаются неразведанными. Кроме того, неизвестно, являются ли фармакодинамически функциональными антитела, которые пересекают ГЭБ.

Краткое изложение сущности изобретения

Моноклональные антитела обладают огромным терапевтическим потенциалом в отношении лечения неврологических заболеваний или заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), но их прохождение в головной мозг ограничивает гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Проведенные в прошлом исследования показали, что очень небольшой процент (приблизительно 0,1%) IgG, циркулирующего в кровотоке, переходит через ГЭБ в ЦНС (Felgenhauer, Klin. Wschr. 52: 1158-1164 (1974)), в которой концентрация антитела может быть недостаточной для допуска сильного эффекта. Способы и композиции настоящего изобретения обеспечивают способ увеличения процента антитела, которое распределяется в ЦНС, и, соответственно, более легкого достижения терапевтических концентраций антитела в ЦНС.

В настоящем документе описывается группа антител против рецептора трансферрина (TfR), который может осуществлять доставку терапевтических средств, включая антитела и небольшие молекулы, через ГЭБ как в следовых дозах, так и в терапевтически соответствующих дозах после однократного системного введения мышам. Распределение антитела менялось от внутрисосудистого к нейронному через 24 ч после введения, что означает, что значительное количество антитела подверглось трансцитозу через эндотелиальные клетки головного мозга с достижением паренхимы. Величина доставки антитела в ЦНС и распределения в ней была обратно пропорциональна его аффинности связывания с TfR в случае исследованных вариантов антител против TfR. Доказательство переноса через ГЭБ было получено, используя биспецифическое антитело, которое связывается и с TfR, и расщепляющим белок-предшественник амилоида (APP) ферментом, β -секретазой (BACE1). Однократная системная доза биспецифического антитела против TfR/BACE1, созданного с использованием методологии настоящего изобретения, не только приводила к значительной доставке антитела в головной мозг, но также существенно снижала уровни A β ₁₋₄₀ в головном мозге по сравнению с моноспецифическим антителом против только BACE1, что говорит о влиянии проницаемости ГЭБ на эффективность антитела против BACE1. Так же было установлено, что биспецифическое антитело, которое связывается и с TfR, и с амилоидом бета (т.е. частью APP, которая является следствием расщепления APP под действием BACE1, который является одной из основных составных частей амилоидных бляшек), легко доставляется в головной мозг, используя методологию настоящего изобретения. Описанные в настоящем документе данные и эксперименты выдвигают на первый план несколько причинных механизмов, обуславливающих увеличенную доставку антитела в ЦНС, используя подход с использованием антитела с более низкой аффинностью. Во-первых, обладающие высокой аффинностью антитела против рецепторов (R) ГЭБ (R ГЭБ) (например, анти-TfR^A) ограничивают доставку в головной мозг в результате быстрого насыщения R ГЭБ в сосудистой сети головного мозга, уменьшая, таким образом, общее количество антитела, доставляемого в головной мозг, а также ограничивая его распределение в сосудистой сети. Поразительно, что уменьшение аффинности к R ГЭБ увеличивает доставку в головной мозг и распределение в нем, при этом сильный сдвиг в локализации отмечается от сосудистой сети к нейронам и связанному с ними нейропилу, распределенному в ЦНС. Во-вторых, более низкая аффинность антитела к R ГЭБ, как предполагают, уменьшает способность антитела к возврату на сосудистую сторону ГЭБ через посредство R ГЭБ с ЦНС-стороны мембраны, поскольку общая аффинность антитела к R ГЭБ является низкой, а локальная концентрация антитела с ЦНС-стороны является ненасыщающей вследствие быстрого рассредоточения антитела в компартменте ЦНС. В-третьих, *in vivo*, и как наблюдалось в случае системы TfR, антитела с меньшей аффинностью к R ГЭБ не подвергаются клиренсу из системы столь эффективно, как антитела с большей аффинностью к R ГЭБ, и, соответственно, остаются в больших концентрациях в циркуляции, чем их аналоги с большей аффинностью. Это является преимущественным, поскольку уровни циркулирующего антитела с более низкой аффинностью поддерживаются на терапевтических уровнях в течение большего периода времени, чем

антитела с более высокой аффинностью, вследствие чего увеличивается доставка антитела в головной мозг в течение большего периода времени. Кроме того, это увеличение нахождения и в плазме, и в головном мозге может уменьшить частоту введения доз в клинике, что будет, возможно, полезным не только для соблюдения больным режима и схемы лечения и удобства, но также в уменьшении любых возможных побочных эффектов или нецелевых эффектов антитела и/или терапевтического соединения, связанного с ним. Каждое из антител против TfR/BACE1 и против TfR/A β является многообещающим и новым терапевтическим кандидатом для лечения болезни Альцгеймера. Кроме того, технология направленной доставки биспецифических антител на основе опосредуемого рецепторами переноса (RMT) открывает путь для широкого диапазона потенциальных терапевтических средств для заболеваний ЦНС. Настоящим изобретением обеспечиваются способы создания проникающих через ГЭБ терапевтических средств, которые значительно увеличивают перенос через ГЭБ и распределение в ЦНС терапевтического средства.

Соответственно, в первом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу переноса соединения через гематоэнцефалический барьер, включающий выдержку антитела, которое связывается с низкой аффинностью с рецептором гематоэнцефалического барьера (R ГЭБ), связанного с соединением, на гематоэнцефалическом барьере, так что антитело переносит связанное с ним соединение через гематоэнцефалический барьер. В одном аспекте соединением является лекарственное средство против неврологического нарушения. В другом аспекте соединением является визуализирующий агент. В другом аспекте соединением является меченым. В другом аспекте антитело является меченым. В другом аспекте антитело не уменьшает связывание R ГЭБ с одним или более его природных лигандов. В другом таком аспекте антитело специфически связывается с TfR таким образом, что оно не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В другом аспекте ГЭБ существует у млекопитающего. В другом таком аспекте млекопитающим является человек. В другом таком аспекте млекопитающее страдает неврологическим нарушением. В другом таком аспекте неврологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (AD), удара, деменции, мышечной дистрофии (MD), рассеянного склероза (MS), амиотрофического бокового склероза (ALS), муковисцидоза, синдрома Ангельмана, синдрома Лиддла, болезни Паркинсона, болезни Пика, болезни Педжета, рака и травматического повреждения головного мозга. В другом аспекте ГЭБ существует у человека.

В другом аспекте антитело характеризуется IC_{50} для R ГЭБ, составляющей от приблизительно 1 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 5 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 50 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 100 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом аспекте антитело обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 30 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 50 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечают анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечают анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризуется IC_{50} для TfR между теми IC_{50} , которые отмечают анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризуется IC_{50} для TfR между теми IC_{50} , которые отмечают анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В одном аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ Скэтчарда. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ с использованием BIACORE. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя ELISA конкуренции.

В другом аспекте R ГЭБ выбрано из группы, состоящей из рецептора трансферрина (TfR), рецептора инсулина, рецептора инсулиноподобного фактора роста (рецептора IGF), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 8 (LRP8), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 1 (LRP1) и связывающего с гепарином, подобного эпидермальному фактору роста фактора роста (HB-EGF). В другом таком аспекте R ГЭБ является R ГЭБ человека. В одном из таких аспектов R ГЭБ является TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует активность TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В другом аспекте связанное с соединением антитело вводят в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтической дозой является доза, которая насыщает R ГЭБ, с которым антитело специфически связывается.

В другом аспекте соединение ковалентно связано с антителом. В одном из таких аспектов соединение связано с антителом с помощью линкера. В одном из таких аспектов линкер является расщепляемым.

В другом таком аспекте линкер является нерасщепляемым. В другом таком аспекте соединение непосредственно связано с антителом. В одном из таких аспектов антителом является полиспецифическое антитело, и соединение образует одну часть полиспецифического антитела. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном головного мозга. В другом таком аспекте антиген головного мозга выбран из группы, состоящей из бета-секретазы 1 (BACE1), A β , рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), Тау, апополипротеина E4 (ApoE4), альфа-синуклеина, CD20, хантингтина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора 6 смерти (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина p75 (p75NTR) и каспазы 6. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с TfR, так и с BACE1. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с TfR, так и с A β . В другом таком аспекте полиспецифическое антитело является меченым. В другом аспекте соединение обратимо связано с антителом, так что соединение освобождается от антитела одновременно с переносом через ГЭБ или после него.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу повышения воздействия на ЦНС соединения, причем соединение связано с антителом, которое связывается с низкой аффинностью с R ГЭБ, увеличивая тем самым воздействие на ЦНС соединения. В одном из аспектов соединением является лекарственное средство против неврологического нарушения. В другом аспекте соединением является визуализирующее средство. В другом аспекте соединение является меченым. В другом аспекте антитело является меченым. В другом аспекте антитело не уменьшает связывание R ГЭБ с одним или более его природных лигандов. В другом таком аспекте антитело специфически связывается с TfR таким образом, что оно не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В другом аспекте связанное с антителом соединение вводят млекопитающему. В другом таком аспекте млекопитающим является человек. В другом таком аспекте млекопитающее страдает неврологическим нарушением. В другом таком аспекте неврологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (AD), удара, деменции, мышечной дистрофии (MD), рассеянного склероза (MS), амиотрофического бокового склероза (ALS), муковисцидоза, синдрома Ангельмана, синдрома Лиддла, болезни Паркинсона, болезни Пика, болезни Педжета, рака и травматического повреждения головного мозга.

В другом аспекте повышение воздействия на ЦНС соединения определяют относительно воздействия на ЦНС соединения, связанного с типичным антителом, не обладающим пониженной аффинностью к R ГЭБ. В другом аспекте повышение воздействия на ЦНС соединения определяют как отношение количества соединения, обнаруживаемого в ЦНС, к количеству, обнаруживаемому в сыворотке после введения. В другом таком аспекте повышение воздействия на ЦНС выливается в отношение, превышающее 0,1%. В другом аспекте повышение воздействия на ЦНС соединения определяют относительно воздействия на ЦНС соединения в отсутствие связанного с ним антитела. В другом аспекте повышение воздействия на ЦНС соединения определяют с помощью визуализации. В другом аспекте повышение воздействия на ЦНС соединения определяют с помощью непрямого показания, такого как изменение одного или более физиологических симптомов.

В другом аспекте антитело характеризуется IC₅₀ для R ГЭБ, составляющей от приблизительно 1 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC₅₀ составляет от приблизительно 5 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC₅₀ составляет от приблизительно 50 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC₅₀ составляет от приблизительно 100 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом аспекте антитело обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 30 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 50 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризуется IC₅₀ для TfR между теми IC₅₀, которые отмечаются в случае анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризуется IC₅₀ для TfR между теми IC₅₀, которые отмечаются в случае анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В одном аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ Скэтчарда. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ с использованием BIACORE. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя ELISA конкуренции.

В другом аспекте R ГЭБ выбрано из группы, состоящей из рецептора трансферрина (TfR), рецептора инсулина, рецептора инсулиноподобного фактора роста (рецептора IGF), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 8 (LRP8), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 1 (LRP1) и связывающего с гепарином, подобного эпидермальному фактору роста фактора роста (HB-EGF). В другом таком аспекте R ГЭБ является R ГЭБ человека. В одном из таких аспектов R ГЭБ является TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует активность TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В другом аспекте связанное с соединением антитело вводят в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтической дозой является доза, которая насыщает R ГЭБ, с которым антитело специфически связывается.

В другом аспекте соединение ковалентно связано с антителом. В одном из таких аспектов соединение связано с антителом с помощью линкера. В одном из таких аспектов линкер является расщепляемым. В другом таком аспекте линкер является нерасщепляемым. В другом таком аспекте соединение непосредственно связано с антителом. В одном из таких аспектов антителом является полиспецифическое антитело, и соединение образует одну часть полиспецифического антитела. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном головного мозга. В другом таком аспекте антиген головного мозга выбран из группы, состоящей из бета-секретазы 1 (BACE1), A β , рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), Тау, апополипротеина E4 (ApoE4), альфа-синуклеина, CD20, хантингтина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора 6 смерти (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина p75 (p75NTR) и каспазы 6. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с TfR, так и с BACE1. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с TfR, так и с A β . В другом таком аспекте полиспецифическое антитело является меченым. В другом аспекте соединение обратимо связано с антителом, так что соединение освобождается от антитела одновременно с переносом через ГЭБ или после него.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу уменьшения клиренса соединения, вводимого индивиду, причем соединение связано с антителом, которое связывается с низкой аффинностью с R ГЭБ, так что клиренс соединения уменьшается. В одном аспекте соединением является лекарственное средство против неврологического нарушения. В другом аспекте соединением является визуализирующий агент. В другом аспекте соединение является меченым. В другом аспекте антитело является меченым. В другом аспекте антитело не уменьшает связывание R ГЭБ с одним или более его природных лигандов. В другом таком аспекте антитело специфически связывается с TfR таким образом, что оно не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В другом аспекте индивидом является млекопитающее. В другом таком аспекте млекопитающим является человек. В другом таком аспекте млекопитающее страдает неврологическим нарушением. В другом таком аспекте неврологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (AD), удара, деменции, мышечной дистрофии (MD), рассеянного склероза (MS), амиотрофического бокового склероза (ALS), муковисцидоза, синдрома Ангельмана, синдрома Лиддла, болезни Паркинсона, болезни Пика, болезни Педжета, рака и травматического повреждения головного мозга.

В другом аспекте уменьшение клиренса соединения определяют относительно клиренса соединения, связанного с типичным антителом, не обладающим пониженной аффинностью к R ГЭБ. В другом аспекте уменьшение клиренса соединения определяют относительно клиренса соединения в отсутствие связанного с ним антитела.

В другом аспекте антитело характеризуется IC₅₀ для R ГЭБ, составляющей от приблизительно 1 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC₅₀ составляет от приблизительно 5 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC₅₀ составляет от приблизительно 50 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC₅₀ составляет от приблизительно 100 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом аспекте антитело обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 30 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 50 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризуется IC₅₀ для TfR между теми IC₅₀, которые отмечаются в случае анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризу-

ется IC_{50} для TfR между теми IC_{50} , которые отмечаются в случае анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В одном аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ Скэтчарда. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ с использованием BIACORE. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя ELISA конкуренции.

В другом аспекте R ГЭБ выбрано из группы, состоящей из рецептора трансферрина (TfR), рецептора инсулина, рецептора инсулиноподобного фактора роста (рецептора IGF), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 8 (LRP8), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 1 (LRP1) и связывающего с гепарином, подобного эпидермальному фактору роста фактора роста (HB-EGF). В другом таком аспекте R ГЭБ является R ГЭБ человека. В одном из таких аспектов R ГЭБ является TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует активность TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В другом аспекте связанное с соединением антитело вводят в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтической дозой является доза, которая насыщает R ГЭБ, с которым антитело специфически связывается.

В другом аспекте соединение ковалентно связано с антителом. В одном из таких аспектов соединение связано с антителом с помощью линкера. В одном из таких аспектов линкер является расщепляемым. В другом таком аспекте линкер является нерасщепляемым. В другом таком аспекте соединение непосредственно связано с антителом. В одном из таких аспектов антителом является полиспецифическое антитело, и соединение образует одну часть полиспецифического антитела. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном головного мозга. В другом таком аспекте антиген головного мозга выбран из группы, состоящей из бета-секретазы 1 (BACE1), A β , рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), Тау, аполипопротеина E4 (ApoE4), альфа-синуклеина, CD20, хантингтина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора 6 смерти (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина p75 (p75NTR) и каспазы 6. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с TfR, так и с BACE1. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с TfR, так и с A β . В другом таком аспекте полиспецифическое антитело является меченым. В другом аспекте соединение обратимо связано с антителом, так что соединение освобождается от антитела одновременно с переносом через ГЭБ или после него.

Настоящее изобретение относится к способу повышения сохранения в ЦНС соединения, вводимого индивиду, причем соединение связано с антителом, которое связывается с низкой аффинностью с R ГЭБ, так что сохранение в ЦНС соединения увеличивается. В одном аспекте соединением является лекарственное средство против неврологического нарушения. В другом аспекте соединением является визуализирующий агент. В другом аспекте соединение является меченым. В другом аспекте антитело является меченым. В другом аспекте антитело не уменьшает связывание R ГЭБ с одним или более его природных лигандов. В другом таком аспекте антитело специфически связывается с TfR таким образом, что оно не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В другом аспекте соединение вводят млекопитающему. В другом таком аспекте млекопитающим является человек. В другом таком аспекте млекопитающее страдает неврологическим нарушением. В другом таком аспекте неврологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (AD), удара, деменции, мышечной дистрофии (MD), рассеянного склероза (MS), амиотрофического бокового склероза (ALS), муковисцидоза, синдрома Ангельмана, синдрома Лиддла, болезни Паркинсона, болезни Пика, болезни Педжета, рака и травматического повреждения головного мозга.

В другом аспекте повышение сохранения в ЦНС соединения определяют относительно сохранения в ЦНС соединения, связанного с типичным антителом, не обладающим пониженной аффинностью к R ГЭБ. В другом аспекте повышение сохранения в ЦНС соединения определяют как отношение количества соединения, обнаруживаемого в ЦНС, к количеству, обнаруживаемому в сыворотке в один или более моментов времени после введения. В другом таком аспекте повышение сохранения в ЦНС соединения выливается в отношение, превышающее 0,1% в один или более моментов времени после введения. В другом аспекте повышение сохранения в ЦНС соединения определяют относительно сохранения в ЦНС соединения в отсутствие связанного с ним антитела. В другом аспекте повышение сохранения в ЦНС соединения определяют с помощью визуализации. В другом аспекте повышение сохранения в ЦНС соединения определяют с помощью непрямого показания, такого как изменение одного или более физиологических симптомов.

В другом аспекте антитело характеризуется IC_{50} для R ГЭБ, составляющей от приблизительно 1 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 5 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 50 нМ до прибли-

тельно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 100 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом аспекте антитело обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 30 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 50 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризуется IC_{50} для TfR между теми IC_{50} , которые отмечаются в случае анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризуется IC_{50} для TfR между теми IC_{50} , которые отмечаются в случае анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В одном аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ Скэтчарда. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ с использованием VIACORE. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя ELISA конкуренции.

В другом аспекте R ГЭБ выбрано из группы, состоящей из рецептора трансферрина (TfR), рецептора инсулина, рецептора инсулиноподобного фактора роста (рецептора IGF), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 8 (LRP8), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 1 (LRP1) и связывающего с гепарином, подобного эпидермальному фактору роста фактора роста (HB-EGF). В другом таком аспекте R ГЭБ является R ГЭБ человека. В одном из таких аспектов R ГЭБ является TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует активность TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В другом аспекте связанное с соединением антитело вводят в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтической дозой является доза, которая насыщает R ГЭБ, с которым антитело специфически связывается.

В другом аспекте соединение ковалентно связано с антителом. В одном из таких аспектов соединение связано с антителом с помощью линкера. В одном из таких аспектов линкер является расщепляемым. В другом таком аспекте линкер является нерасщепляемым. В другом таком аспекте соединение непосредственно связано с антителом. В одном из таких аспектов антителом является полиспецифическое антитело, и соединение образует одну часть полиспецифического антитела. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном головного мозга. В другом таком аспекте антиген головного мозга выбран из группы, состоящей из бета-секретазы 1 (BACE1), A β , рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), Тау, апополипротеина E4 (ApoE4), альфа-синуклеина, CD20, хантингтина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора 6 смерти (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина p75 (p75NTR) и каспазы 6. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с TfR, так и с BACE1. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с TfR, так и с A β . В другом таком аспекте полиспецифическое антитело является меченым. В другом аспекте соединение обратимо связано с антителом, так что соединение освобождается от антитела одновременно с переносом через ГЭБ или после него.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу оптимизации фармакокинетики и/или фармакодинамики соединения, чтобы оно было эффективным в ЦНС индивида, причем соединение связано с антителом, которое связывается с низкой аффинностью с R ГЭБ, и антитело выбирают из условия, чтобы его аффинность к R ГЭБ после связывания с соединением приводила к степени переноса антитела, конъюгированного с соединением, через ГЭБ, которая оптимизирует фармакокинетику и/или фармакодинамику соединения в ЦНС. В одном аспекте соединением является лекарственное средство против неврологического нарушения. В другом аспекте соединением является визуализирующий агент. В другом аспекте соединение является меченым. В другом аспекте антитело является меченым. В другом аспекте антитело не уменьшает связывание R ГЭБ с одним или более его природных лигандов. В другом таком аспекте антитело специфически связывается с TfR таким образом, что оно не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В другом аспекте ГЭБ существует у млекопитающего. В другом таком аспекте млекопитающим является человек. В другом таком аспекте млекопитающее страдает неврологическим нарушением. В другом таком аспекте неврологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (AD), удара, деменции, мышечной дистрофии (MD), рассеянного склероза (MS), амиотрофического бокового склероза (ALS), муковисцидоза, синдрома Ангельма-

на, синдрома Лиддла, болезни Паркинсона, болезни Пика, болезни Педжета, рака и травматического повреждения головного мозга. В другом аспекте ГЭБ существует у человека.

В одном аспекте оптимизация может включать создание ряда комплексов антитело-соединение, в которых каждое антитело обладает отличной аффинностью к R ГЭБ, и оценку фармакокинетики и/или фармакодинамики каждого комплекса в ЦНС. В другом аспекте оптимизация может иметь место относительно известного стандарта, такого как, но без ограничения, фармакокинетика и/или фармакодинамика соединения после его непосредственного введения в ЦНС или после его введения индивиду в отсутствие связанного с ним антитела против R ГЭБ.

В другом аспекте антитело характеризуется IC_{50} для R ГЭБ, составляющей от приблизительно 1 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 5 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 50 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 100 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом аспекте антитело обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 30 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 50 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризуется IC_{50} для TfR между теми IC_{50} , которые отмечаются в случае анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризуется IC_{50} для TfR между теми IC_{50} , которые отмечаются в случае анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В одном аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ Скэтчарда. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ с использованием BIACORE. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя ELISA конкуренции.

В другом аспекте R ГЭБ выбрано из группы, состоящей из рецептора трансферрина (TfR), рецептора инсулина, рецептора инсулиноподобного фактора роста (рецептора IGF), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 8 (LRP8), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 1 (LRP1) и связывающего с гепарином, подобного эпидермальному фактору роста фактора роста (HB-EGF). В другом таком аспекте R ГЭБ является R ГЭБ человека. В одном из таких аспектов R ГЭБ является TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует активацию TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В другом аспекте связанное с соединением антитело вводят в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтической дозой является доза, которая насыщает R ГЭБ, с которым антитело специфически связывается.

В другом аспекте соединение ковалентно связано с антителом. В одном из таких аспектов соединение связано с антителом с помощью линкера. В одном из таких аспектов линкер является расщепляемым. В другом таком аспекте линкер является нерасщепляемым. В другом таком аспекте соединение непосредственно связано с антителом. В одном из таких аспектов антителом является полиспецифическое антитело, и соединение образует одну часть полиспецифического антитела. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном головного мозга. В другом таком аспекте антиген головного мозга выбран из группы, состоящей из бета-секретазы 1 (BACE1), A β , рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), Тау, аполипептида E4 (ApoE4), альфа-синуклеина, CD20, хантингтина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора 6 смерти (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина p75 (p75NTR) и каспазы 6. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с TfR, так и с BACE1. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с TfR, так и с A β . В другом таком аспекте полиспецифическое антитело является меченым. В другом аспекте соединение обратимо связано с антителом, так что соединение освобождается от антитела одновременно с переносом через ГЭБ или после него.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения неврологического нарушения у млекопитающего, включающему лечение млекопитающего антителом, которое связывается с R ГЭБ и связано с соединением, причем антитело выбрано так, что оно обладает низкой аффинностью к R ГЭБ, и, следовательно, увеличивает доставку в ЦНС антитела и связанного с ним соеди-

нения. В одном аспекте соединением является лекарственное средство против неврологического нарушения. В другом аспекте соединением является визуализирующий агент. В другом аспекте соединением является меченым. В другом аспекте антитело является меченым. В другом аспекте антитело не уменьшает связывание R ГЭБ с одним или более его природных лигандов. В другом таком аспекте антитело специфически связывается с TfR таким образом, что оно не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В одном из аспектов млекопитающим является человек. В другом таком аспекте млекопитающее страдает неврологическим нарушением. В другом таком аспекте неврологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (AD), удара, деменции, мышечной дистрофии (MD), рассеянного склероза (MS), амиотрофического бокового склероза (ALS), муковисцидоза, синдрома Ангельмана, синдрома Лиддла, болезни Паркинсона, болезни Пика, болезни Педжета, рака и травматического повреждения головного мозга.

В одном аспекте лечение приводит к уменьшению или устранению симптомов нарушения. В другом аспекте лечение приводит к ослаблению неврологического нарушения.

В другом аспекте антитело характеризуется IC_{50} для R ГЭБ, составляющей от приблизительно 1 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 5 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 50 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 100 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом аспекте антитело обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 30 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 50 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризуется IC_{50} для TfR между теми IC_{50} , которые отмечаются в случае анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризуется IC_{50} для TfR между теми IC_{50} , которые отмечаются в случае анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В одном аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ Скэтчарда. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ с использованием BIACORE. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя ELISA конкуренции.

В другом аспекте R ГЭБ выбрано из группы, состоящей из рецептора трансферрина (TfR), рецептора инсулина, рецептора инсулиноподобного фактора роста (рецептора IGF), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 8 (LRP8), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 1 (LRP1) и связывающего с гепарином, подобного эпидермальному фактору роста фактора роста (HB-EGF). В другом таком аспекте R ГЭБ является R ГЭБ человека. В одном из таких аспектов R ГЭБ является TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует активность TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В другом аспекте связанное с соединением антитело вводят в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтической дозой является доза, которая насыщает R ГЭБ, с которым антитело специфически связывается.

В другом аспекте соединение ковалентно связано с антителом. В одном из таких аспектов соединение связано с антителом с помощью линкера. В одном из таких аспектов линкер является расщепляемым. В другом таком аспекте линкер является нерасщепляемым. В другом таком аспекте соединение непосредственно связано с антителом. В одном из таких аспектов антителом является полиспецифическое антитело, и соединение образует одну часть полиспецифического антитела. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном головного мозга. В другом таком аспекте антиген головного мозга выбран из группы, состоящей из бета-секретазы 1 (BACE1), Aβ, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), Тау, аполипопротеина E4 (ApoE4), альфа-синуклеина, CD20, хантингтина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора 6 смерти (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина p75 (p75NTR) и каспазы 6. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с TfR, так и с BACE1. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с TfR, так и с Aβ. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело является меченым. В другом аспекте соединение обратимо связано с антителом, так что соединение освобождается от антитела одновременно с пере-

носом через ГЭБ или после него.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу создания антитела, которое можно использовать для переноса соединения через ГЭБ, включающему отбор антитела, специфического в отношении рецептора гематоэнцефалического барьера (R ГЭБ), поскольку оно обладает желательной низкой аффинностью к R ГЭБ.

В одном из аспектов антитело выбирают из панели антител на основе аффинности отбираемого антитела. В другом аспекте создают антитело, которое обладает аффинностью. В одном из таких аспектов антитело создают, используя любую известную в данной области техники методологию создания белков, в том числе, но без ограничения, фаговый дисплей, дрожжевой дисплей, неспецифический мутагенез и сайт-направленный мутагенез.

В одном из аспектов соединением является лекарственное средство против неврологического нарушения. В другом аспекте соединением является визуализирующий агент. В другом аспекте соединением является меченый. В другом аспекте антитело является меченым. В другом аспекте антитело не уменьшает связывание R ГЭБ с одним или более его природных лигандов. В другом таком аспекте антитело специфически связывается с TfR таким образом, что оно не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В другом аспекте ГЭБ существует у млекопитающего. В другом таком аспекте млекопитающим является человек. В другом таком аспекте млекопитающее страдает неврологическим нарушением. В другом таком аспекте неврологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (AD), удара, деменции, мышечной дистрофии (MD), рассеянного склероза (MS), амиотрофического бокового склероза (ALS), муковисцидоза, синдрома Ангельмана, синдрома Лиддла, болезни Паркинсона, болезни Пика, болезни Педжета, рака и травматического повреждения головного мозга. В другом аспекте ГЭБ существует у человека.

В другом аспекте антитело характеризуется IC_{50} для R ГЭБ, составляющей от приблизительно 1 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 5 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 50 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC_{50} составляет от приблизительно 100 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом аспекте антитело обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 30 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 50 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и обладает аффинностью к TfR между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризуется IC_{50} для TfR между теми IC_{50} , которые отмечаются в случае анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с TfR и характеризуется IC_{50} для TfR между теми IC_{50} , которые отмечаются в случае анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1. В одном аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ Скэтчарда. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ с использованием BIACORE. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя ELISA конкуренции.

В другом аспекте R ГЭБ выбрано из группы, состоящей из рецептора трансферрина (TfR), рецептора инсулина, рецептора инсулиноподобного фактора роста (рецептора IGF), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 8 (LRP8), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 1 (LRP1) и связывающего с гепарином, подобного эпидермальному фактору роста фактора роста (HB-EGF). В другом таком аспекте R ГЭБ является R ГЭБ человека. В одном из таких аспектов R ГЭБ является TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует активность TfR. В другом таком аспекте R ГЭБ является TfR, и антитело не ингибирует связывание TfR с трансферрином. В другом аспекте связанное с соединением антитело вводят в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтической дозой является доза, которая насыщает R ГЭБ, с которым антитело специфически связывается.

В другом аспекте соединение ковалентно связано с антителом. В одном из таких аспектов соединение связано с антителом с помощью линкера. В одном из таких аспектов линкер является расщепляемым. В другом таком аспекте линкер является нерасщепляемым. В другом таком аспекте соединение непосредственно связано с антителом. В одном из таких аспектов антителом является полиспецифическое антитело, и соединение образует одну часть полиспецифического антитела. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном головного мозга. В другом таком аспекте антиген головного мозга выбран из группы, состоящей из бета-секретазы 1 (BACE1), Aβ, рецеп-

тора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), Тау, апополипротеина E4 (АроЕ4), альфа-синуклеина, CD20, хантингтина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора 6 смерти (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина р75 (р75NTR) и каспазы 6. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с Tfr, так и с BACE1. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с Tfr, так и с Аβ. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело является меченым. В другом аспекте соединение обратимо связано с антителом, так что соединение освобождается от антитела одновременно с переносом через ГЭБ или после него.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается антитело, которое связывается с рецептором гематоэнцефалического барьера (R ГЭБ) с низкой аффинностью. В одной аспекте аффинность антитела к R ГЭБ составляет от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 мкМ. В другом аспекте аффинность антитела к R ГЭБ составляет от приблизительно 20 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом аспекте антитело характеризуется IC₅₀ для R ГЭБ, составляющей от приблизительно 1 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC₅₀ составляет от приблизительно 5 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC₅₀ составляет от приблизительно 50 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте IC₅₀ составляет от приблизительно 100 нМ до приблизительно 100 мкМ. В другом таком аспекте антитело, после связывания с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 50 нМ до приблизительно 1 мкМ. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с Tfr и обладает аффинностью к Tfr между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-Tfr^A/BACE1 и анти-Tfr^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с Tfr и обладает аффинностью к Tfr между теми аффинностями, которые отмечаются в случае анти-Tfr^D/BACE1 и анти-Tfr^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с Tfr и характеризуется IC₅₀ для Tfr между теми IC₅₀, которые отмечаются в случае анти-Tfr^A/BACE1 и анти-Tfr^E/BACE1. В другом таком аспекте связанное с соединением антитело специфически связывается с Tfr и характеризуется IC₅₀ для Tfr между теми IC₅₀, которые отмечаются в случае анти-Tfr^D/BACE1 и анти-Tfr^E/BACE1. В одном аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ Скэтчарда. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя анализ с использованием VIACORE. В другом аспекте аффинность антитела против R ГЭБ или комплекса антитело против R ГЭБ/соединение к R ГЭБ определяют, используя ELISA конкуренции. В другом аспекте R ГЭБ выбрано из группы, состоящей из рецептора трансферрина (Tfr), рецептора инсулина, рецептора инсулиноподобного фактора роста (рецептора IGF), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 8 (LRP8), родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности белка 1 (LRP1) и связывающего с гепарином, подобного эпидермальному фактору роста фактора роста (HVEGF). В одном из таких аспектов R ГЭБ является Tfr. В другом таком аспекте R ГЭБ является Tfr, и антитело не ингибирует активность Tfr. В другом таком аспекте R ГЭБ является Tfr, и антитело не ингибирует связывание Tfr с трансферрином. В другом таком аспекте R ГЭБ является R ГЭБ человека.

В другом аспекте антитело связано с соединением. В одном аспекте соединением является лекарственное средство против неврологического нарушения. В другом аспекте соединением является визуализирующий агент. В другом аспекте соединение является меченым. В другом аспекте антитело является меченым. В другом аспекте антитело не уменьшает связывание R ГЭБ с одним или более его природных лигандов. В другом таком аспекте антитело специфически связывается с Tfr таким образом, что оно не ингибирует связывание Tfr с трансферрином.

В другом аспекте соединение ковалентно связано с антителом. В одном из таких аспектов соединение связано с антителом с помощью линкера. В одном из таких аспектов линкер является расщепляемым. В другом таком аспекте линкер является нерасщепляемым. В другом таком аспекте соединение непосредственно связано с антителом. В одном из таких аспектов антителом является полиспецифическое антитело, и соединение образует одну часть полиспецифического антитела. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном головного мозга. В другом таком аспекте антиген головного мозга выбран из группы, состоящей из бета-секретазы 1 (BACE1), Аβ, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), Тау, апополипротеина E4 (АроЕ4), альфа-синуклеина, CD20, хантингтина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора 6 смерти (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина р75 (р75NTR) и каспазы 6. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с Tfr, так и с BACE1. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело связывается как с Tfr, так и с Аβ. В другом таком аспекте полиспецифическое антитело является меченым. В другом аспекте соединение обратимо связано с антителом, так что соединение освобождается от антитела одновременно с пере-

носом через ГЭБ или после него.

В другом аспекте антителом является фрагмент антитела с антигенсвязывающим участком, который связывается с R ГЭБ, включая, но без ограничения, Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv. В другом аспекте антителом является полноразмерное антитело.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается применение антитела, которое связывается с низкой аффинностью с R ГЭБ, для производства лекарственного средства для лечения неврологического нарушения. В этом способе может использоваться любое из описанных ранее антител против R ГЭБ с низкой аффинностью или любое из антител против R ГЭБ с низкой аффинностью, описанных здесь где-то в другом месте.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается антитело, которое связывается с низкой аффинностью с R ГЭБ, для применения для лечения неврологического нарушения. В этом способе может использоваться любое из описанных ранее антител против R ГЭБ с низкой аффинностью или любое из антител против R ГЭБ с низкой аффинностью, описанных здесь где-то в другом месте. Соответственно, в первом аспекте настоящим изобретением обеспечивается антитело, которое связывается с рецептором гематоэнцефалического барьера (R ГЭБ), причем аффинность антитела к R ГЭБ составляет от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 мкМ (например, от приблизительно 20 нМ до приблизительно 1 мкМ). Необязательно R ГЭБ выбрано из группы, состоящей из рецептора трансферрина (TfR), рецептора инсулина, рецептора инсулиноподобного фактора роста (рецептора IGF), родственного рецепторам липопroteинов низкой плотности белка 1 (LRP1), родственного рецепторам липопroteинов низкой плотности белка 8 (LRP8) и связывающего с гепарином, подобного эпидермальному фактору роста фактора роста (HB-EGF). Необязательно антитело связано с терапевтическим соединением, таким как лекарственное средство против неврологического нарушения. В одном варианте осуществления антителом является полиспецифическое антитело, которое включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном головного мозга, например, выбираемым из группы, состоящей из бета-секретазы 1 (BACE1), амилоида бета (Aβ), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), Тау, аполипoteина E3 (ApoE3), аполипoteина E4 (ApoE4), альфасинуклеина, CD20, хантингина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора 6 смерти (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина p75 (p75NTR) и каспазы 6. Антитело (например, полиспецифическое антитело) включает фрагменты антитела и полноразмерные антитела.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу переноса терапевтического соединения, такого как лекарственное средство против неврологического нарушения, через гематоэнцефалический барьер, включающий выдержку антитела против R ГЭБ, связанного с лекарственным средством против неврологического нарушения, на гематоэнцефалическом барьере, так что антитело переносит связанное с ним лекарственное средство против неврологического нарушения через гематоэнцефалический барьер.

Гематоэнцефалический барьер в этом способе может существовать у млекопитающего, например, млекопитающего с неврологическим нарушением, примеры которого включают болезнь Альцгеймера (AD) (включая, но без ограничения, умеренное нарушение когнитивных функций и продромальную стадию AD), удар, деменцию, мышечную дистрофию (MD), рассеянный склероз (MS), амиотрофический боковой склероз (ALS), муковисцидоз, синдрома Ангельмана, синдром Лиддла, болезнь Паркинсона, болезнь Пика, болезнь Педжета, рак (например, рак, поражающий ЦНС или головной мозг) и травматическое повреждение головного мозга.

Кроме того, настоящее изобретение имеет отношение к способу создания антитела, применимого для переноса терапевтического соединения, такого как лекарственное средство против неврологического нарушения, через гематоэнцефалический барьер, включающему отбор антитела против рецептора гематоэнцефалического барьера (R ГЭБ), поскольку оно обладает аффинностью к R ГЭБ, которая составляет от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 мкМ. В одном варианте осуществления антитело отбирают из панели антител, поскольку оно обладает желаемой аффинностью. Альтернативно или дополнительно, создают антитело, которое обладает желаемой аффинностью. Необязательно способ, кроме того, включает связывание антитела с терапевтическим соединением, таким как лекарственное средство против неврологического нарушения. Например, способ может включать создание полиспецифического антитела, которое включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном головного мозга.

Настоящим изобретением, кроме того, обеспечивается способ лечения неврологического нарушения у млекопитающего, включающий лечение млекопитающего полиспецифическим антителом, которое связывается как с рецептором гематоэнцефалического барьера (R ГЭБ), так и с антигеном головного мозга, причем антитело против R ГЭБ выбрано так, что обладает низкой аффинностью к R ГЭБ, и в силу этого увеличивает доставку в головной мозг антитела против антигена головного мозга. Необязательно полиспецифическое антитело связывается как с рецептором трансферрина (TfR), так и с BACE1 или Aβ.

Будет понятно, что любой из вышеприведенных способов и композиций настоящего изобретения можно объединить с одним другим и/или с дополнительными аспектами настоящего изобретения, приведенными здесь в описании настоящего изобретения.

Краткое описание фигур

На фиг. 1А-Е отобразено значительное поглощение сосудами головного мозга системно вводимого антитела против Tfr. На фиг. 1А демонстрируется доставка в головной мозг после внутривенного введения следовых доз (приблизительно 50 мкг/кг) [^{131}I]анти-Tfr^A и контрольного [^{125}I]IgG мышам, и ее определяли как средний процент введенной дозы на грамм головного мозга через 5, 30 мин, 1, 4, 24, 48 и 72 ч после внутривенного введения (n=6). Доставка [^{131}I]анти-Tfr^A уменьшалась в результате введения вместе с 4 мкг/кг немеченого анти-Tfr^A (не содержащего радиоактивных веществ). На фиг. 1В демонстрируется количественное определение средней доставки антитела в головной мозг через 1 и 24 ч после внутривенного введения 20 мкг/кг контрольного IgG или анти-Tfr^A (**p=0,0002, n=10). На фиг. 1С демонстрируется отношение концентрации в головном мозге к таковой в сыворотке в виде среднего процента (**p=0,003, n=10). На фиг. 1D и 1E отобразено иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга после внутривенного введения анти-Tfr^A (фиг. 1D, верхние панели), которое демонстрирует солокализацию с антиколлаген IV, маркером сосудов (нижняя панель). Внутривенное введение контрольного IgG (фиг. 1E, верхняя панель) демонстрирует размещение в сосудах головного мозга только через 1 ч и отсутствие антитела спустя 24 ч. Масштабная полоска = 50 мкм.

На фиг. 2А-F демонстрируется, что аффинность антител против Tfr и степень доставки в головной мозг обратно пропорциональны после введения в терапевтически соответствующей дозе (20 мкг/кг) по сравнению с низкой следовой дозой (приблизительно 50 мкг/кг). На фиг. 2А отобразен ELISA конкурентного связывания, в котором увеличивающиеся концентрации вариантов анти-Tfr^{A,B,C,D,E} используются для конкуренции с биотинированным анти-Tfr^A за связыванием с Tfr. ELISA конкуренции с использованием анти-Tfr выполняли в планшетах Maxisorp (Neptune, N.J.), покрытых 2,5 мкг/мл очищенного экстраклеточного домена Tfr мыши в PBS при 4°C в течение ночи. Планшеты промывали PBS/0,05% Tween 20 и блокировали, используя буфер для блокирования Superblock в PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Титрование анти-Tfr^A, анти-Tfr^B, анти-Tfr^C или анти-Tfr^D (1:3 последовательное разведение) объединяли с биотинированным анти-Tfr^A (конечная концентрация = 0,5 нМ) и добавляли в планшет на 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали PBS/0,05% Tween 20, и HRP-стрептавидин (Southern Biotech, Birmingham) добавляли в планшет, и осуществляли инкубацию в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали PBS/0,05% Tween 20, и биотинированное анти-Tfr^A, связанное с планшетом, выявляли, используя субстрат TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). Представленные на фиг. 2А результаты представляют собой данные одного эксперимента, в котором отдельно оценивали все пять вариантов анти-Tfr. Значения IC₅₀, определенные, исходя из этих данных, представлены в таблице 2. На фиг. 2В отобразено количественное определение средней доставки в головной мозг после внутривенного введения следовых доз (приблизительно 50 мкг/кг) вариантов [^{125}I]анти-Tfr^{A,B,C,D,E} через 5 мин, 1, 4, 6 и 24 ч (n=3). Представленные на фиг. 2В результаты представляют собой данные одного эксперимента, в котором отдельно оценивали все пять вариантов анти-Tfr. На фиг. 2С демонстрируется количественное определение средней доставки в головной мозг после внутривенного введения 20 мкг/кг вариантов анти-Tfr через 1 и 24 ч, используя способы, описанные по поводу фиг. 1В. Этот эксперимент был повторен в тех же условиях, используя анти-Tfr^E, и все результаты представлены на фиг. 2С. Фиг. 2D представляет собой модель, иллюстрирующую обратную зависимость между аффинностью и доставкой в головной мозг. Фиг. 2Е представляет собой сравнение иммуногистохимического окрашивания срезов головного мозга после внутривенного введения или анти-Tfr^A с высокой аффинностью, или антител с более низкими аффинностями - анти-Tfr^{B,C,D}, демонстрирующее различия в распределении антитела (окрашивание в левых панелях на предмет только анти-Tfr) и степени солокализации с NeuN (окрашивание в правых панелях на предмет как анти-Tfr, так и NeuN). Масштабная полоска = 50 мкм. Фиг. 2F представляет собой репрезентативное изображение с большим увеличением локализации анти-Tfr^D в нейронах (на что указывает окрашивание NeuN); эти данные указывают на то, что анти-Tfr^D и NeuN солокализуются, и, следовательно, что анти-Tfr^D пересекает ГЭБ и взаимодействует с нейронами, тогда как анти-Tfr^A, главным образом, локализуется в сосудистой сети в противоположность нейронам. Масштабная полоска = 20 мкм.

На фиг. 3А-Г демонстрируется, что биспецифическое антитело против Tfr/BACE1 ингибирует A β *in vitro* и аккумулируется в головном мозге. Фиг. 3А представляет собой схему биспецифического антитела, которое было создано для связывания и Tfr, и β -секретазы (BACE1). На фиг. 3В демонстрируется аффинность связывания с Tfr родительского анти-Tfr^A и анти-Tfr^A/BACE1, определенная с помощью анализа ELISA конкуренции с использованием анти-Tfr, описанного выше в случае фиг. 2А. На фиг. 3С демонстрируется количественное определение уровней A β , продуцируемых клетками НЕК293, стабильно экспрессирующими APP, после обработки анти-Tfr^A/BACE1, анти-BACE1 и контрольным IgG в анализе на основе клеток. Способность антител к ингибированию продукции A β ₁₋₄₀ в клетках НЕК293, стабильно экспрессирующих белок-предшественник амилоида человека дикого типа, оценивали, как описа-

но ниже. Клетки НЕК293-APPWT засеивали на ночь в концентрации, составляющей 3×10^4 клеток/лунку, в 96-луночный планшет. 50 мкл свежей среды (DMEM + 10% FBS), содержащей антитело против BACE1 или контрольное антитело изотипа IgG1, инкубировали с клетками в течение 24 ч при 37°C. Клеточную среду собирали и исследовали на присутствие $A\beta_{1-40}$, используя анализ $A\beta_{1-40}$ HTRF® (CisBio) в соответствии с инструкциями производителя. Значения $A\beta_{1-40}$ приводили к жизнеспособности клеток, определяемой, используя люминесцентное исследование жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega). Эксперименты выполняли по крайней мере три раза, и каждую точку в каждом эксперименте повторяли дважды. На фиг. 3D отображено количественное определение средней доставки в головной мозг после введения следовых доз [^{125}I]-меченного антитела через 30 мин, 6, 24 и 48 ч после внутривенного введения мышам (n=4). На фиг. 3E демонстрируется количественное определение средней доставки антитела в головной мозг, а на фиг. 3F среднее отношение головной мозг к сыворотке через 1, 12, 24 и 48 ч после внутривенного введения 20 мг/кг антитела мышам (n=10).

Эксперимент, представленный на фиг. 3E и 3F, выполняли, используя протокол, одинаковый с таковым эксперимента, описанного по поводу фиг. 1B. На фиг. 3G демонстрируется иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга мышей через 24 ч после внутривенного введения или анти-TfR/BACE1 (левые панели), или контрольного IgG (правые панели). Солокализация антитела с NeuN отмечается после лечения анти-TfR^A/BACE1 (NeuN нейронное окрашивание совпадает с окрашиванием проникающего антитела), но отсутствует у мышей, подвергнутых лечению контрольным IgG (наблюдается лишь NeuN нейронный профиль окрашивания, нет окрашивания антитела).

На фиг. 4A-E демонстрируется, что однократная системная доза анти-TfR^A/BACE1 значительно уменьшает центральный и периферический $A\beta_{1-40}$. На фиг. 4A-D демонстрируется количественное определение уровней $A\beta_{1-40}$ в головном мозге (A, B) и плазме (C, D) после внутривенного введения 25 мг/кг или 50 мг/кг контрольного IgG, анти-BACE1 или анти-TfR/BACE1. Вкратце, для измерений $A\beta_{1-40}$ полушферы головного мозга гомогенизировали в буфере, содержащем 5M гуанидин гидрохлорид, и образцы перешивали вращательным движением в течение 3 ч при комнатной температуре до разбавления (1:10) в 0,25% казеине, 5 mM EDTA (pH 8,0) в PBS, содержащем только что добавленный аprotинин (20 мг/мл) и лейпептид (10 мг/мл). Разбавленные гомогенаты центрифугировали при 14 000 об./мин в течение 20 мин, и супернатанты отделяли для измерения $A\beta_{1-40}$. Для определений концентраций антител соответствующую полушферу головного мозга каждой мыши гомогенизировали в 1% NP-40, как описано выше. Цельную кровь отбирали в пробирки-микроконтейнеры с EDTA (BD Diagnostics) до перфузии, центрифугировали при 5000×g в течение 15 мин, и супернатант отделяли для определения концентраций $A\beta_{1-40}$ мыши и анти-TfR/BACE1 в плазме. Концентрации всего $A\beta_{1-40}$ мыши в плазме и головном мозге определяли, используя сэндвич-ELISA, следуя процедуре, схожей с таковой, описанной выше. Планшеты покрывали кроличьим поликлональным антителом, специфическим для C-конца $A\beta_{1-40}$ (Millipore, Bedford MA), и биотинилированное моноклональное антитело M3.2. против $A\beta$ мыши (Covance, Dedham MA) использовали для выявления. Значения нижнего предела количественного определения в анализе составляли 1,96 пг/мл в плазме и 39,1 пг/г в головном мозге. Статистический анализ различий между экспериментальными группами выполняли, используя двусторонний критерий Стьюдента для одной выборки. * представляет значимость по сравнению с контрольным IgG, в то время как # представляет значимость по сравнению с анти-BACE1. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001; n=10 для всех групп. На фиг. 4E демонстрируется среднее уменьшение $A\beta_{1-40}$, исходя из данных, представленных в (A-D), рассчитанное как процент уровней $A\beta_{1-40}$ относительно мышей, которым вводили контрольный IgG.

На фиг. 5A-B изображены аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей анти-BACE1 клона YW412.8, полученного из библиотеки фагового дисплея, не подвергнутого какому-либо воздействию типа природного разнообразия, и форм YW412.8 с созревшей аффинностью. На фиг. 5A представлены совмещения последовательностей переменных областей легких цепей (VL) (SEQ ID NO: 1-6). На фиг. 5B представлены совмещения последовательностей переменных областей тяжелых цепей (VH) (SEQ ID NO: 7-8). На обеих фигурах последовательности HVR каждого клона указаны прямоугольниками, при этом первый прямоугольник указывает на HVR-L1 (фиг. 5A) или HVR-H1 (фиг. 5B), второй прямоугольник указывает на HVR-L2 (фиг. 5A) или HVR-H2 (фиг. 5B), а третий прямоугольник указывает на HVR-L3 (фиг. 5A) или HVR-H3 (фиг. 5B).

На фиг. 6A-B изображены аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей клона Fab 12, полученного из библиотеки фагового дисплея, не подвергнутого какому-либо воздействию типа искусственного разнообразия, и форм Fab 12 с созревшей аффинностью. На фиг. 6A представлены совмещения последовательностей переменных областей легких цепей (SEQ ID NO: 9-12). На фиг. 6B представлены совмещения последовательностей переменных областей тяжелых цепей (SEQ ID NO: 13). На обеих фигурах последовательности HVR каждого клона указаны прямоугольниками, при этом первый прямоугольник указывает на HVR-L1 (фиг. 6A) или HVR-H1 (фиг. 6B), второй прямоугольник указывает на HVR-L2 (фиг. 6A) или HVR-H2 (фиг. 6B), а третий прямоугольник указывает на HVR-L3 (фиг. 6A) или HVR-H3 (фиг. 6B).

На фиг. 7A-B отображена тяжелая цепь (фиг. 7A; SEQ ID NO: 14) и легкая цепь (фиг. 7B; SEQ ID NO: 15) приводимого в качестве примера антитела против $A\beta$.

На фиг. 8А-В отобрано количественное определение анти-TfR^{A,B,C,D,E} в сыворотке (фиг. 8А) и головном мозге (фиг. 8В) после однократного введения терапевтической дозы мышам. В случае всех исследований использовали самок мышей C57B/6 дикого типа возрастом шесть-восемь недель. Мышам внутривенно вводили 20 мг/кг вариантов анти-TfR или контрольного IgG. Уровни антител в головном мозге и сыворотке определяли через 1 и 12 ч и 1, 2, 4, 5, 6 и 8 дней после введения. Общий вводимый объем не превышал 260 мкл, и антитела разводили в D-PBS (Invitrogen) в случае необходимости. Эксперимент выполняли, используя протокол, одинаковый с таковым эксперимента, результаты которого представлены на фиг. 1В.

На фиг. 9А-Е демонстрируются меняющиеся степени, в которых биспецифические антитела анти-TfR^{A,D,E}/BACE1 аккумулируются в головном мозге и ингибируют продукцию Аβ *in vivo*. На фиг. 9А отобраны результаты анализа ELISA конкуренции с использованием анти-TfR, используя анти-TfR^{A,D,E}/BACE1, следуя той же процедуре, которая описана на фиг. 2А. Значения IC₅₀, определенные исходя из этих данных, представлены в табл. 3. На фиг. 9В и 9D отобрано определение количества наблюдаемого антитела (9В) и количества Аβ₁₋₄₀ (9D), отмечаемого в плазме через 1, 2, 4, 6, 8 и 10 дней после внутривенного введения 50 мг/кг антител мышам (n=6). На фиг. 9С отобрано количественное определение средней доставки в головной мозг, а на фиг. 9Е отобрано количество Аβ₁₋₄₀, отмечаемое в головных мозгах тех же подвергнутых лечению мышей через 1, 2, 4, 6, 8 и 10 дней после лечения. Для всех исследований использовали самок мышей C57B/6 дикого типа возрастом от шести до восьми недель. Мышам внутривенно вводили 50 мг/кг вариантов анти-TfR/BACE1, контрольного IgG или анти-BACE1. После указанного периода времени мышам вводили D-PBS путем его инъекции в кровеносные сосуды, и концентрацию антител в головном мозге и плазме каждого животного определяли, как описано выше. Анализ выполняли, как описано в описании фиг. 4.

На фиг. 10 и 11 демонстрируются меняющиеся степени, в которых биспецифические антитела анти-TfR^{A,D,E}/Аβ аккумулируются в головном мозге мышей PS2APP (фиг. 10) и мышей дикого типа (фиг. 11). На фиг. 10А и 11А отобрано определение количества наблюдаемого антитела в плазме через 1 день после внутрибрюшинного введения 50 мг/кг антител мышам (n=4-6). На фиг. 10В и 11В отобрано количественное определение средней доставки в головной мозг у тех же подвергнутых лечению мышей.

Подробное описание вариантов осуществления настоящего изобретения

I. Определения

"Гематоэнцефалический барьер" или "ГЭБ" относится к физиологическому барьеру между периферическим кровообращением и головным мозгом и спинным мозгом, который образован плотными контактами цитоплазматических мембран эндотелиальных клеток капилляров головного мозга, создавая непроницаемый барьер, который ограничивает перенос в головной мозг молекул, даже очень небольших молекул, таких как мочевины (60 Дальтон). Гематоэнцефалический барьер в головном мозге, барьер между кровью и спинным мозгом в спинном мозге и гематоретинальный барьер в сетчатке являются смежными капиллярными барьерами в ЦНС, и их называют здесь в совокупности гематоэнцефалическим барьером или ГЭБ. ГЭБ также включает барьер между кровью и CSF (хороидным сплетением), который состоит из эпендимоцитов, а не из эндотелиальных клеток капилляров.

"Центральная нервная система" или "ЦНС" относится к комплексу нервных тканей, которые контролируют функционирование организма, и включает головной мозг и спинной мозг.

"Рецептор гематоэнцефалического барьера" (здесь сокращенно "R ГЭБ") является трансмембранным белком-рецептором, представленным на эндотелиальных клетках головного мозга, который способен к переносу молекул через гематоэнцефалический барьер. Примеры R ГЭБ здесь включают рецептор трансферрина (TfR), рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста (рецептор IGF), рецепторы липопротеинов низкой плотности, включающие, без ограничения, родственные рецепторам липопротеинов низкой плотности белок 1 (LRP1) и родственные рецепторам липопротеинов низкой плотности белок 8 (LRP8), и связывающийся с гепарином, подобный эпидермальному фактору роста фактор роста (HB-EGF). Приводимым в качестве примера здесь R ГЭБ является рецептор трансферрина (TfR).

"Рецептор трансферрина" ("TfR") представляет собой трансмембранный гликопротеин (с молекулярной массой, равной приблизительно 180000), состоящий из двух связанных дисульфидной связью субъединиц (каждая с выявляемой молекулярной массой, равной приблизительно 90000), вовлеченный в поглощение железа у позвоночных. В одном варианте осуществления TfR здесь является TfR человека, включающий аминокислотную последовательность, как в Schneider et al. Nature 311: 675-678 (1984), например.

Как здесь используется, "неврологическое нарушение" относится к заболеванию или нарушению, которое поражает ЦНС, и/или причина возникновения которого находится в ЦНС. Приводимые в качестве примера заболевания или нарушения ЦНС включают, но без ограничения, невропатию, амилоидоз, рак, болезнь или нарушение глаз, вирусную или микробную инфекцию, воспаление, ишемию, нейродегенеративное заболевание, эпилептический припадок, нарушения поведения и лизосомную болезнь накопления. В рамках этой заявки ЦНС, как будет подразумеваться, включает глаз, который в норме отде-

лен от остальной части тела гематоретинальным барьером. Конкретные примеры неврологических нарушений включают, но без ограничения, нейродегенеративные заболевания (включающие, но без ограничения, болезнь телец Леви, постполиомиелитический синдром, синдром Шая-Дрейджера, оливопонтocerebellарную атрофию, болезнь Паркинсона, множественную системную атрофию, стриатонигральную дегенерацию, таупатии (включающие, но без ограничения, болезнь Альцгеймера и супрануклеарный паралич), прионные инфекции (включающие, но без ограничения, губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота, скрепи, синдром Крейцфельда-Якоба, куру, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, хроническую болезнь, вызывающую истощение, и спорадическую фатальную инсомнию), бульбарный паралич, заболевание двигательных нейронов и гетеродегенеративные нарушения нервной системы (включающие, но без ограничения, болезнь Канавана, болезнь Хантингтона, нейрональный цероидный липофуциноз, болезнь Александра, синдром Туретта, синдром курчавых волос Менкеса, синдром Коккейна, синдром Галлервордена-Шаттаца, болезнь Лафора, синдром Ретта, гепатолентикулярную дегенерацию, синдром Леша-Найхана и синдром Унферрихта-Лундборга), деменцию (включая, но без ограничения, болезнь Пика и спиноцереbellарную атаксию), рак (например, ЦНС и/или головного мозга, включая метастазы в головной мозг, происходящие в результате рака где-то в другом месте тела).

"Лекарственное средство против неврологического нарушения" представляет собой лекарственное или терапевтическое средство, которое лечит одно или более неврологических нарушений. Лекарственные средства против неврологических нарушений настоящего изобретения включают, но без ограничения, антитела, пептиды, белки, природные лиганды одной или более мишеней в ЦНС, модифицированные варианты природных лигандов одной или более мишеней в ЦНС, аптамеры, ингибирующие нуклеиновые кислоты (т.е. небольшие ингибирующие РНК (короткие интерферирующие РНК) и короткие шпилечные РНК (кшРНК)), рибозимы и небольшие молекулы, или активные фрагменты любого из вышеприведенных средств. Приводимые в качестве примера лекарственные средства против неврологических нарушений настоящего изобретения описаны здесь и включают, но без ограничения, антитела, аптамеры, белки, пептиды, ингибирующие нуклеиновые кислоты и небольшие молекулы и активные фрагменты любого из вышеприведенных средств, которые или сами или специфически распознают и/или действуют на (т.е. ингибируют, активируют или выявляют) антиген ЦНС, или их мишенью является такая молекула, как, но без ограничения, белок-предшественник амилоида или его части, амилоид бета, бета-секретеза, гамма-секретеза, тау, альфа-синуклеин, паркин, хантингтин, DR6, пресенилин, ApoE, маркеры глиомы или других раковых заболеваний ЦНС, и нейротрофины. Не ограничивающие примеры лекарственных средств против неврологических нарушений и нарушений, для лечения которых они могут использоваться, представлены в следующей табл. 1.

Таблица 1

Не ограничивающие примеры лекарственных средств против неврологических нарушений и соответствующих нарушений, для лечения которых они могут использоваться

Лекарственное средство	Неврологическое нарушение
Антитело против BACE1	Болезнь Альцгеймера, острое и хроническое повреждение головного мозга, удар
Антитело против Aβ	Болезнь Альцгеймера
Нейротрофин	Удар, острое повреждение головного мозга, повреждение спинного мозга
Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор 2 роста фибробластов (FGF-2)	Хроническое повреждение головного мозга (развития нервной клетки)
Антитело против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR)	Рак головного мозга
Нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF)	Болезнь Паркинсона
Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF)	Амиотрофический боковой склероз, депрессия
Лизосомальный фермент	Лизосомные болезни накопления головного мозга

Цилиарный нейротрофический фактор (CNTF)	Амиотрофический боковой склероз
Нейрегулин-1	Шизофрения
Антитело против HER2 (например, трастузумаб)	Метастазы в головной мозг, происходящие из HER2-положительного рака

"Визуализирующим агентом" является соединение, обладающее одним или более свойств, которые позволяют непосредственно или опосредованно выявить его присутствие и/или локализацию. Примеры таких визуализирующих агентов включают белки и соединения в виде небольших молекул, включающие меченую составляющую, которая делает возможным выявление.

"Антигеном ЦНС" или "антигеном головного мозга" является антиген, экспрессируемый в ЦНС, включая головной мозг, который может быть мишенью антитела или небольшой молекулы. Примеры таких антигенов включают, без ограничения, бета-секретазу 1 (BACE1), амилоид бета ($A\beta$), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), Тау, аполипопротеин E4 (ApoE4), альфа-синуклеин, CD20, хантингтин, прионный белок (PrP), киназу 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркин, пресенилин 1, пресенилин 2, гамма-секретазу, рецептор 6 смерти (DR6), белок-предшественник амилоида (APP), рецептор нейротрофина p75 (p75NTR) и каспазу 6. В одном варианте осуществления антигеном является BACE1.

Используемый в настоящем документе термин "BACE1" относится к любой встречающейся в природе бета-секретазе 1 (также называемой расщепляющим белок-предшественник амилоида в β -сайте ферментом 1, связанной с мембраной аспарагиновой протеазой 2, мемапсином 2, аспартилпротеазой 2 или Asp2) из любого являющегося позвоночным животным источника, в том числе млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызунов (например, мыши и крысы), кроме особо оговоренных случаев. Этот термин включает "полноразмерную", не подвергнутую процессированию BACE1, а также любую форму BACE1, являющуюся результатом процессирования в клетке. Этот термин также включает встречающиеся в природе варианты BACE1, например, варианты сплайсинга или аллельные варианты. Аминокислотной последовательностью приводимого в качестве примера полипептида BACE1 является последовательность BACE1 человека, изоформы A, сообщенная в Vassar et al., Science 286: 735-741 (1999), который включен сюда в качестве ссылки в полном объеме. Существует несколько других изоформ BACE1 человека, включая изоформы B, C и D. См. UniProtKB/Swiss-Prot Entry P56817, который включен сюда в качестве ссылки в полном объеме.

Термины "антитело против бета-секретазы", "антитело против BACE1", "антитело, которое связывается с бета-секретазой" и "антитело, которое связывается с BACE1", относятся к антителу, которое способно к связыванию с BACE1 с достаточной аффинностью, так что антитело применимо в качестве диагностического и/или терапевтического средства при таргетинге BACE1. В одном варианте осуществления степень связывания антитела против BACE1 с неродственным, не являющимся BACE1 белком составляет менее приблизительно 10% связывания антитела с BACE1, что определено, например, с помощью радиоиммуноанализа (RIA). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с BACE1, характеризуется константой диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В некоторых вариантах осуществления антитело против BACE1 связывается с эпитопом BACE1, который является сохраненным среди BACE1 различных видов и изоформ. В одном варианте осуществления обеспечивается антитело, которое связывается с эпитопом BACE1, с которым связывается антитело против BACE1 YW412.8.31. В других вариантах осуществления обеспечивается антитело, которое связывается с экзосайтом в BACE1, находящимся в каталитическом домене BACE1. В одном варианте осуществления обеспечивается антитело, которое конкурирует с пептидами, идентифицированными в Kornacker et al., Biochem. 44: 11567-11573 (2005), который включен сюда в качестве ссылки в полном объеме, (т.е. пептидами 1, 2, 3, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 2-12, 3-12, 4-12, 5-12, 6-12, 7-12, 8-12, 9-12, 10-12, 4, 5, 6, 5-10, 5-9, зашифрованными, Y5A, P6A, Y7A, F8A, I9A, P10A и L11A) за связывание с BACE1. Приводимые в качестве примера последовательности антител против BACE1 представлены на фиг. 5A-B и фиг. 6A-B. Одно приводимое в качестве примера здесь антитело включает переменные домены антитела YW412.8.31 (например, как на фиг. 5A-B).

Белок "со встречающейся в природе последовательностью" здесь относится к белку, включающему аминокислотную последовательность белка, обнаруживаемого в природе, включая встречающиеся в природе варианты белка. Используемый в настоящем документе термин включает белок, выделенный из его природного источника или рекомбинантно продуцированный.

Термин "антитело" используется здесь в самом широком значении и относится, в частности, к моноклональным антителам, поликлональным антителам, полиспецифическим антителам (например, биспецифическим антителам), образованным из по крайней мере двух интактных антител, и фрагментам антител, если они проявляют желаемую биологическую активность.

"Фрагменты антител" здесь включают часть интактного антитела, которая сохраняет способность к связыванию антигена. Примеры фрагментов антител включают Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, образующие популяцию, являются идентичными и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов, которые могут возникнуть во время продукции моноклонального антитела, при этом такие варианты, как правило, присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной антигенной детерминанты. Помимо их специфичности, преимущество моноклональных антител заключается в том, что они не загрязнены другими иммуноглобулинами. Атрибут "моноклональное" указывает на то, что характеристикой антитела является то, что его получают из по существу гомогенной популяции антител, и не должен рассматриваться как требование продукции антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, можно создать с помощью гибридной технологии, впервые описанной в Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), или можно создать с помощью методов рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" можно также выделить из библиотек антител в фагах, используя методы, описанные в Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), например. Конкретные примеры моноклональных антител здесь включают химерные антитела, гуманизированные антитела и антитела человека, включая их антигенсвязывающие фрагменты.

Моноклональные антитела здесь включают, в частности, "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из конкретного вида или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие здесь интерес, включают "приматизированные" антитела, включающие антигенсвязывающие последовательности переменных доменов, происходящие из не являющегося человеком примата (например, марьяшковых, таких как павиан, макак-резус или яванский макак), и последовательности константных областей человека (патент США № 5693780).

"Гуманизированные" формы нечеловеческих (например, мышинных) антител являются химерными антителами, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из нечеловеческого иммуноглобулина. В большинстве случаев гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в котором остатки из гипервариабельного участка реципиента заменены остатками из гипервариабельного участка иммуноглобулина не являющегося человеком вида (донорного антитела), такого как мышь, крыса, кролик или не являющийся человеком примат, имеющего желаемую специфичность, аффинность и способность. В некоторых случаях остатки каркасных областей (FR) иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками нечеловеческого иммуноглобулина. Кроме того, гуманизированные антитела могут включать остатки, не обнаруживаемые в реципиентном антителе или донорном антителе. Эти модификации осуществляют для дальнейшего улучшения характеристики антитела. Как правило, гуманизированное антитело будет включать по существу все из по крайней мере одного и обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все из гипервариабельных участков соответствуют таковым из нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по существу все из FR являются FR последовательности иммуноглобулина человека, за исключением замен(ы) в FR, отмеченных выше. Гуманизированное антитело необязательно также будет включать по крайней мере часть константной области иммуноглобулина, обычно таковую иммуноглобулина человека. В отношении дальнейших подробностей см. Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); и Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-586 (1992)).

"Антитело человека" здесь представляет собой антитело, включающее структуру - аминокислотную последовательность, которая соответствует структуре - аминокислотной последовательности антитела, получаемого из В-клетки человека, и включает антигенсвязывающие фрагменты антител человека. Такие антитела можно идентифицировать или создать с помощью ряда методов, включающих, но без ограничения, продукцию трансгенными животными (например, мышами), которые способны, после иммунизации, продуцировать антитела человека в отсутствие продукции эндогенных иммуноглобулинов (см., например, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); и патенты США № 5591669, 5589369 и 5545807)); отбор из библиотек фагового дисплея, экспрессирующих антитела человека или фрагменты антител человека (см., например, McCafferty et al., *Nature* 348: 552-553 (1990); Johnson et al., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993); Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol.*

Biol. 222: 581-597 (1991); Griffith et al., EMBO J. 12: 725-734 (1993); патенты США № 5565332 и 5573905); создание через посредство *in vitro* активированных В-клеток (см. патенты США № 5567610 и 5229275); и выделение из продуцирующих антитела человека гибридом.

"Полиспецифическим антителом" здесь является антитело, обладающее специфичностью связывания с по крайней мере двумя различными эпитопами. Приводимые в качестве примера полиспецифические антитела могут связываться как с R ГЭБ, так и с антигеном головного мозга. Полиспецифические антитела можно приготовить в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, F(ab')₂ биспецифических антител). Также предусматриваются созданные антитела с двумя, тремя или более (например, четырьмя) функциональными антигенсвязывающими сайтами (см., например, заявку на патент США № 2002/0004587 A1, Miller et al.). Полиспецифические антитела можно приготовить в виде полноразмерных антител или фрагментов антител.

Антитела здесь включают "варианты аминокислотной последовательности" с измененной антигенсвязывающей или биологической активностью. Примеры таких изменений аминокислот включают антитела с увеличенной аффинностью к антигену (например, антитела с "созревшей аффинностью") и антитела с измененной Fc-областью, в случае ее присутствия, например, с измененной (увеличенной или уменьшенной) антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) и/или комплементзависимой цитотоксичностью (CDC) (см., например, WO 00/42072, Presta, L. и WO 99/51642, Iduosogie et al.); и/или увеличенным или уменьшенным полупериодом существования в сыворотке (см., например, WO 00/42072, Presta, L.).

"Вариант с измененной аффинностью" содержит один или более замененных остатков в гипервариабельном участке(ах) или каркасной области(ях) родительского антитела (например, родительского химерного, гуманизованного антитела или антитела человека), которые изменяют (увеличивают или уменьшают) аффинность. В одном варианте осуществления результирующий вариант(ы), отобранный для дальнейшей разработки, будет обладать уменьшенной аффинностью к R ГЭБ в соответствии с настоящим изобретением. В подходящем способе создания таких вариантов с заменой(ами) используется фаговый дисплей. Вкратце, мутируют несколько сайтов в гипервариабельном участке(ах) (например, 6-7 сайтов) с созданием всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Созданные таким образом варианты антитела представляют в одновалентной форме на поверхности частиц нитчатых фагов в виде слияний с продуктом гена III M13, пакуемых в каждой частице. Представленные на фагах варианты затем подвергают скринингу на предмет их биологической активности (например, активности связывания). Для идентификации сайтов-кандидатов на модификацию в гипервариабельном участке(ах) может быть выполнен сканирующий аланином мутагенез для идентификации остатков в гипервариабельном участке(ах), вносящих значительный вклад в связывание с антигеном. Альтернативно или дополнительно, может быть полезен анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело для идентификации точек контактирования антитела со своей мишенью. Такие контактные остатки и близлежащие остатки являются кандидатами на замену в соответствии с методами, разработанными здесь. После создания таких вариантов, панель вариантов подвергают скринингу, и антитела с измененной аффинностью можно отобрать для дальнейшей разработки.

Антитело здесь может быть конъюгировано с "гетерологичной молекулой", например, для увеличения полупериода существования или стабильности или иного улучшения антитела. Например, антитело можно связать с одним из множества небелковоподобных полимеров, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ), полипропиленгликолем, полиоксиалкиленами или сополимерами полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля. Фрагменты антител, такие как Fab', связанные с одной или более молекул ПЭГ, являются приводимым в качестве примера вариантом осуществления настоящего изобретения.

Антитело здесь может быть "вариантом гликозилирования", вследствие чего изменен какой-либо углевод, присоединенный к Fc-области, в случае ее присутствия. Например, антитела со зрелой углеводной структурой, в которой отсутствует фукоза, присоединенной к Fc-области антитела, описаны в заявке на патент США № US 2003/0157108 (Presta, L.). См. также US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). На антитела с бисекторным N-ацетилглюкозаминном (GlcNAc) в углеводе, присоединенном к Fc-области антитела, ссылаются в WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. и патенте США № 6602684, Umana et al. Об антителах с по крайней мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области антитела, сообщают в WO 1997/30087, Patel et al. См. также WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.), которые имеют отношение к антителам с измененным углеводом, присоединенным к их Fc-области. См. также US 2005/0123546 (Umana et al.), в которой описываются антитела с измененным гликозилированием.

Термин "гипервариабельный участок" при использовании здесь относится к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание антигена. Гипервариабельный участок включает аминокислотные остатки из "определяющего комплементарность участка" или "CDR" (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) и/или аминокислотные остатки из "гипервариабельного петлевого участка" (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и

91-96 (L3) в переменном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Остатками "каркасной области" или "FR" являются те остатки переменного домена, которые отличны от остатков гиперпеременного участка, определенных здесь.

"Полноразмерным антителом" является антитело, которое включает антигенсвязывающую переменную область, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут быть константными доменами со встречающимися в природе последовательностями (например, константными доменами со встречающимися в природе у человека последовательностями) или вариантами их аминокислотных последовательностей.

"Не конъюгированным антителом" является антитело (определенное здесь), которое не конъюгировано с гетерологичной молекулой, такой как цитотоксическая составляющая, полимер или радиоактивная метка.

"Эффекторные функции" антитела относятся к тем биологическим активностям, которые связаны с Fc-областью (Fc-областью со встречающейся в природе последовательностью или Fc-областью с вариантом аминокислотной последовательности) антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q, комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание Fc-рецептора, антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и т.д. В одном варианте осуществления у антитела здесь по существу отсутствует эффекторная функция.

Полноразмерные антитела в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей можно отнести к различным "классам". Существуют пять основных классов полноразмерных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно далее разбить на "подклассы" (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам антител, называются альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантное антитело" относится к антителу (например, химерному, гуманизированному антителу или антителу человека или его антигенсвязывающему фрагменту), которое экспрессируется рекомбинантной клеткой-хозяином, включающей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело. Примеры "клеток-хозяев" для продуцирования рекомбинантных антител включают: (1) клетки млекопитающих, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO), COS, клетки миеломы (включая клетки Y0 и NSO), клетки почки детеныша хомячка (BHK), клетки Hela и Vero; (2) клетки насекомых, например, sf9, sf21 и Tn5; (3) клетки растений, например, растений, относящихся к роду *Nicotiana* (например, *Nicotiana tabacum*); (4) дрожжевые клетки, например, те, которые относятся к роду *Saccharomyces* (например, *Saccharomyces cerevisiae*) или роду *Aspergillus* (например, *Aspergillus niger*); (5) бактериальные клетки, например, клетки *Escherichia coli* или клетки *Bacillus subtilis* и т.д.

Как здесь используется, "специфически связывающееся" или "специфически связывается" относится к антителу, селективно или предпочтительно связывающемуся с антигеном. Аффинность связывания, как правило, определяют, используя стандартный анализ, такой как анализ Скэтчарда, или метод с использованием поверхностного плазмонного резонанса (например, используя BIACORE®).

"Антитело, которое связывается с тем же эпитопом", что и эталонное антитело, относится к антителу, которое блокирует связывание эталонного антитела со своим антигеном в анализе конкуренции на 50% или более, и в свою очередь эталонное антитело блокирует связывание антитела со своим антигеном в анализе конкуренции на 50% или более. В одном варианте осуществления антитело против BACE1 связывается с эпитопом BACE1, с которым связывается YW412.8.31.

Используемый в настоящем документе термин "цитотоксический агент" относится к веществу, ингибирующему или препятствующему функционированию клеток и/или вызывающему гибель или разрушение клеток. Цитотоксические агенты включают, но без ограничения, радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства (например, метотрексат, адриамицин, винкалкалоиды (винкрестин, винбластин, этопозид), доксорубин, мелфалан, митомин С, хлорамбуцил, даунорубин или другие интеркалирующие агенты), ингибирующие рост агенты, ферменты и их фрагменты, такие как нуклеазы, антибиотики, токсины, такие как токсины в виде небольших молекул или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, в том числе их фрагменты и/или варианты.

"Эффективное количество" агента, например, фармацевтического препарата, относится к количеству, эффективному, в требуемых дозах и в течение требуемых периодов времени, для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата.

Термин "Fc-область" здесь используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по крайней мере часть константной области. Этот термин включает Fc-область со встречающимися в природе последовательностями и варианты Fc-областей. В одном варианте осуществления Fc-область тяжелой цепи IgG человека простирается от Cys226, или от Pro230, до карбок-

сильного конца тяжелой цепи. Однако С-концевой лизин (Lys447) Fc-области может присутствовать или может не присутствовать. Кроме случаев, оговоренных здесь особо, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует EU системе нумерации, также называемой EU индексом, описанной в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Каркасная область" или "FR" относится к остаткам варибельного домена, отличным от остатков гиперварибельного участка (HVR). FR варибельного домена, как правило, состоит из четырех FR-доменов: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности HVR и FR, как правило, обнаруживаются в следующем порядке в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

"Иммуноконъюгат" представляет собой антитело, конъюгированное с одной или более гетерологичных молекул, включающий, но без ограничения, метку или цитотоксический агент. Необязательно такое конъюгирование имеет место через линкер.

Как здесь используется, "линкер" представляет собой структуру, которая ковалентно или нековалентно соединяет антитело против R ГЭБ с гетерологичной молекулой. В некоторых вариантах осуществления линкером является пептид. В других вариантах осуществления линкером является химический линкер.

"Меткой" является маркер, связанный с антителом здесь и используемый для выявления или визуализации. Примеры таких меток включают радиоактивную метку, флуорофор, хромофор или аффинную метку. В одном варианте осуществления меткой является радиоактивная метка, используемая для диагностической визуализации, например, ^{99m}Tc или ¹²³I, или спиновая метка для визуализации с использованием ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известной как магнитно-резонансная томография, MRI), такая как снова йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец, железо и т.д.

"Индивидуумом" или "индивидом" является млекопитающее. Млекопитающие включают, но без ограничения, одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и не являющихся людьми приматов, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В некоторых вариантах осуществления индивидуумом или индивидом является человек.

"Изолированным антителом" является антитело, которое было отделено от компонента его природного окружения. В некоторых вариантах осуществления антитело очищено до степени чистоты, превышающей 95% или 99%, как определено, например, с помощью электрофоретических способов (например, электрофореза в SDS-ПААГ, изоэлектрофокусировки (IEF), капиллярного электрофореза) или хроматографических способов (например, ионообменной HPLC или HPLC с обращенной фазой). Ради обзора способов оценки степени чистоты антител см., например, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848: 79-87 (2007).

Термин "листовка-вкладыш", как используется, относится к инструкциям, обычно включаемым в промышленные упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозе, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предостережений в отношении применения терапевтических продуктов.

Термин "фармацевтический препарат" относится к препарату, который находится в такой форме, которая позволяет биологической активности активного ингредиента, содержащегося в нем, быть эффективной, и который не содержит дополнительные компоненты, которые являются неприемлемо токсичными для индивида, которому вводился бы препарат.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту фармацевтического препарата, отличному от активного ингредиента, который является нетоксичным для индивида. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но без ограничения, буфер, наполнитель, стабилизатор или консервант.

Как здесь используется, "лечение" (и его грамматические вариации, такие как "лечить" или "осуществление лечения") относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение болезни индивида, подвергаемого лечению, и может проводиться или для профилактики, или во время течения клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают, но без ограничения, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, смягчение симптомов, сокращение любых прямых или непрямых патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или ослабление болезненного состояния и ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления для отсрочки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания используются антитела настоящего изобретения.

II. Композиции и способы

1. Продукция антител против R ГЭБ и их конъюгатов.

В способах и изделиях настоящего изобретения используется, или они включают, антитело, которое связывается с R ГЭБ. Антиген в виде R ГЭБ, используемый для продукции, или скрининга на предмет, антител, может быть, например, его растворимой формой или его частью (например, экстраклеточным доменом), содержащей желаемый эпитоп. Альтернативно или дополнительно, клетки, на поверхности которых представлен R ГЭБ, могут использоваться для создания, или скрининга на предмет, антител.

Для квалифицированных в данной области техники специалистов будут очевидны другие формы R ГЭБ, применимые для создания антител. Примеры R ГЭБ здесь включают рецептор трансферрина (TfR), рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-R), родственные рецепторам липопротеинов низкой плотности белок 1 (LRP1) и (LRP8) и т.д., и связывающийся с гепарином, подобный эпидермальному фактору роста фактор роста (HB-EGF).

В соответствии с настоящим изобретением антитело против R ГЭБ (например, против TfR) с "низкой аффинностью" выбрано на основе данных здесь, демонстрирующих, что в случае таких антител обнаруживается увеличенная доставка в ЦНС (например, головной мозг). Для идентификации таких антител с низкой аффинностью в наличии имеются различные анализы для определения аффинности антитела, включающие, без ограничения, анализ Скэтчарда и метод с использованием поверхностного плазмонного резонанса (например, используя BIACORE®). В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения антитело обладает аффинностью к антигену в виде R ГЭБ (например, к TfR), составляющей от приблизительно 5 нМ, или от приблизительно 20 нМ, или от приблизительно 100 нМ, до приблизительно 10 мкМ, или до приблизительно 1 мкМ, или до приблизительно 500 нМ. Таким образом, аффинность может находиться в диапазоне от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 мкМ, или в диапазоне от приблизительно 20 нМ до приблизительно 1 мкМ, или в диапазоне от приблизительно 100 нМ до приблизительно 500 нМ, например, как определено с помощью анализа Скэтчарда или BIACORE®).

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу создания антитела, применимого для переноса лекарственного средства против неврологического нарушения через гематоэнцефалический барьер, включающий отбор антитела из панели антител против рецептора гематоэнцефалического барьера (R ГЭБ), поскольку оно обладает аффинностью к R ГЭБ, которая находится в диапазоне от приблизительно 5 нМ, или от приблизительно 20 нМ, или от приблизительно 100 нМ, до приблизительно 10 мкМ, или до приблизительно 1 мкМ, или до приблизительно 500 мкМ. Таким образом, аффинность может находиться в диапазоне от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 мкМ или в диапазоне от приблизительно 20 нМ до приблизительно 1 мкМ или в диапазоне от приблизительно 100 нМ до приблизительно 500 нМ, например, как определено с помощью анализа Скэтчарда или BIACORE®. Как будет понятно специалисту со средним уровнем компетентности в данной области техники, конъюгирование гетерологичной молекулы/соединения с антителом будет часто уменьшать аффинность антитела к его мишени вследствие, например, стерического несоответствия или даже ликвидации одного связывающего плеча, если антитело создано полиспецифическим с использованием одного или более плеч, связывающихся с антигеном, отличным от первоначальной мишени антитела. В одном варианте осуществления антитело с низкой аффинностью настоящего изобретения, специфическое в отношении TfR, конъюгированного с BACE1, характеризуется Kd для TfR, определяемой с помощью BIACORE, равной приблизительно 30 нМ. В другом варианте осуществления антитело с низкой аффинностью настоящего изобретения, специфическое в отношении TfR, конъюгированного с BACE1, характеризуется Kd для TfR, определяемой с помощью BIACORE, равной приблизительно 600 нМ.

Один приводимый в качестве примера анализ для оценки аффинности антитела осуществляют с помощью анализа Скэтчарда. Например, представляющее интерес антитело против R ГЭБ можно подвергнуть йодированию, используя способ с использованием лактопероксидазы (Bennett and Horuk, Methods in Enzymology 288, p. 134-148 (1997)). Меченное изотопом антитело против R ГЭБ очищают от свободного ¹²⁵I-Na с помощью гель-фильтрации, используя колонку NAP-5, и определяют его специфическую активность. Конкурирующие реакционные смеси объемом 50 мкл, содержащие неизменную концентрацию йодированного антитела и уменьшающиеся концентрации последовательно разведенного меченого антитела, помещают в 96-луночные планшеты. Клетки, транзитивно экспрессирующие R ГЭБ, культивируют в средах для выращивания, состоящих из модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM) (Genentech), дополненной 10% FBS, 2 мМ L-глутамином и 1 х пенициллином-стрептомицином, при 37°C в 5% CO₂. Клетки отсоединяют от чашек, используя раствор для отделения клеток Sigma, и промывают буфером для связывания (DMEM с 1% бычьего сывороточного альбумина, 50 мМ HEPES, pH 7,2, и 0,2% азида натрия). Отмытые клетки добавляют в соответствующей концентрации, составляющей 200000 клеток в 0,2 мл буфера для связывания, в 96-луночные планшеты, содержащие 50 мкл конкурирующих реакционных смесей. Конечная концентрация меченого антитела в конкурирующей реакции с клетками меняется, начиная с 1000 нМ и затем уменьшаясь в результате разведения в 1:2 раза на протяжении 10 концентраций и включая образец без добавления, образец в виде только буфера. Конкурирующие реакции с клетками для каждой концентрации меченого антитела анализируют в трех повторах. Конкурирующие реакции с клетками инкубируют в течение 2 ч при комнатной температуре. После инкубации в течение 2 ч конкурирующие реакции переносят в планшет с фильтрами и промывают четыре раза буфером для связывания для освобождения от связанного йодированного антитела. Фильтры считывают с помощью счетчика гамма-излучения, и касающиеся связывания данные оценивают, используя алгоритм подгонки Munson и Rodbard (1980) для определения аффинности связывания антитела.

Приводимый в качестве примера анализ Скэтчарда, используя композиции настоящего изобре-

ния, можно выполнить, как описано ниже. Анти-TFR^A подвергали йодированию, используя способ с использованием лактопероксидазы (Bennett and Horuk, *Methods in Enzymology* 288 pg. 134-148 (1997)). Меченное изотопом анти-TFR^A очищали от свободного ¹²⁵I-Na с помощью гель-фильтрации, используя колонку NAP-5, очищенное анти-TFR^A имело специфическую активность, составляющую 19,82 мкКи/мкг. Конкурирующие реакционные смеси объемом 50 мкл, содержащие неизменную концентрацию йодированного антитела и уменьшающиеся концентрации последовательно разведенного немеченого антитела, помещали в 96-луночные планшеты. Клетки 293, транзитивно экспрессирующие мышинный Tfr, культивировали в средах для выращивания, состоящих из модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM) (Genentech), дополненной 10% FBS, 2 mM L-глутамином и 1× пенициллином-стрептомицином, при 37°C в 5% CO₂. Клетки отсоединяли от чашек, используя раствор для отделения клеток Sigma, и промывали буфером для связывания (DMEM с 1% бычьего сывороточного альбумина, 50 mM HEPES, pH 7,2, и 0,2% азида натрия). Отмытые клетки добавляли в соответствующей концентрации, составляющей 200000 клеток в 0,2 мл буфера для связывания, в 96-луночные планшеты, содержащие 50 мкл конкурирующих реакционных смесей. Конечная концентрация йодированного антитела в каждой конкурирующей реакции с клетками составляла 100 пМ (134000 имп./мин в 0,25 мл). Конечная концентрация немеченого антитела в конкурирующей реакции с клетками менялась, начиная с 1000 нМ и затем уменьшаясь в результате разведения в 1:2 раза на протяжении 10 концентраций и включая образец без добавления, образец в виде только буфера. Конкурирующие реакции с клетками для каждой концентрации немеченого антитела анализировали в трех повторах. Конкурирующие реакции с клетками инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. После инкубации в течение 2 ч конкурирующие реакции переносили в планшет с фильтрами Millipore Multiscreen и промывали четыре раза буфером для связывания для освобождения от связанного йодированного антитела. Фильтры считывали с помощью счетчика гамма-излучения Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences; Waltham, MA). Касающиеся связывания данные оценивали, используя программное обеспечение New Ligand software (Genentech), в случае которого используется алгоритм подгонки Munson и Rodbard (1980) для определения аффинности связывания антитела.

Приводимый в качестве примера анализ с использованием BIACORE®, используя композиции настоящего изобретения, можно выполнить, как описано ниже. Kd определяли, используя анализы с использованием поверхностного плазмонного резонанса, используя BIACORE®-2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), при 25°C, используя набор с антителом против Fc человека (BiAcCore Inc., Piscataway, NJ). Вкратце, биосенсорные чипы со слоем, модифицированным карбоксиметилированным декстраном, (CM5, BIACORE, Inc.) активировали с использованием N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антитело против Fc человека разводили 10 mM ацетатом натрия, pH 4,0, до 50 мкг/мл до инъекции со скоростью потока, составляющей 5 мкл/мин, для достижения приблизительно 10000 единиц ответа (ЕО) связанного белка. После инъекции антитела инъецировали 1 М этаноламин для блокирования не вступивших в реакцию групп. Для кинетических измерений варианты антител против Tfr инъецировали в HBS-P для достижения приблизительно 220 ЕО, затем двукратные последовательные разведения MuTfr-His (0,61-157 нМ) инъецировали в HBS-P при 25°C со скоростью потока, составляющей приблизительно 30 мкл/мин. Константы ассоциации (k_{on}) и константы диссоциации (k_{off}) рассчитывали, используя простую модель связывания в отношении один к одному Лэнгмюра (версию 3.2 программного обеспечения для оценки BIACORE®), посредством одновременной подгонки сенсограмм, соответствующих ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (Kd) рассчитывали как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293: 865-881 (1999).

В соответствии с другим вариантом осуществления Kd определяют, используя анализы с использованием поверхностного плазмонного резонанса, с использованием устройства BIACORE®-2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C, используя набор с антителом против Fc человека (BiAcCore Inc., Piscataway, NJ). Вкратце, биосенсорные чипы со слоем, модифицированным карбоксиметилированным декстраном, (CM5, BIACORE, Inc.) активируют с использованием N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антитело против Fc человека разводят 10 mM ацетатом натрия, pH 4,0, до 50 мкг/мл до инъекции со скоростью потока, составляющей 5 мкл/мин, для достижения приблизительно 10000 единиц ответа (ЕО) связанного белка. После инъекции антитела инъецируют 1 М этаноламин для блокирования не вступивших в реакцию групп. Для кинетических измерений варианты антител против R ГЭБ инъецируют в HBS-P для достижения приблизительно 220 ЕО, затем двукратные последовательные разведения (R ГЭБ) -His (0,61-157 нМ) инъецируют в HBS-P at 25°C со скоростью потока, составляющей приблизительно 30 мкл/мин. Константы ассоциации (k_{on}) и константы диссоциации (k_{off}) рассчитывают, используя простую модель связывания в отношении один к одному Лэнгмюра (версию 3.2 программного обеспечения для оценки BIACORE®), посредством одновременной подгонки сенсограмм, соответствующих ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (Kd) рассчитывают как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293: 865-881 (1999).

Определением по косвенным показателям аффинности одного или более антител к R ГЭБ является полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC_{50}), показатель того, какое количество антитела необходимо для ингибирования связывания известного лиганда R ГЭБ с R ГЭБ на 50%. Несколько способов определения IC_{50} для конкретного соединения известно в данной области техники; общим подходом является выполнение анализа конкурентного связывания, например, такого, который описан здесь в примерах, т.е. относительно фиг. 2А. В общем, высокая IC_{50} указывает на то, что большее количество антитела необходимо для ингибирования связывания известного лиганда, и, следовательно, что аффинность антитела к этому лиганду является относительно низкой. Наоборот, низкая IC_{50} указывает на то, что меньшее количество антитела необходимо для ингибирования связывания известного лиганда, и, следовательно, что аффинность антитела к этому лиганду является относительно высокой.

Приводимым в качестве примера анализом ELISA конкуренции для определения IC_{50} является анализ, в котором используются увеличивающиеся концентрации вариантов антител против TfR или против TfR/антигена головного мозга (т.е. против TfR/BACE1, TfR/AP и т.п.) для конкуренции с биотинилированным анти-TfR^A за связывание с TfR. ELISA конкуренции с использованием антитела против TfR проводили в планшетах Maxisorp (Nephtune, N.J.), покрытых 2,5 мкг/мл очищенного экстраклеточного домена TfR мыши в PBS при 4°C в течение ночи. Планшеты промывали PBS/0,05% Tween 20 и блокировали, используя буфер для блокирования Superblock в PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Титрование каждого отдельного антитела против TfR или против TfR/антигена головного мозга (т.е. против TfR/BACE1 или против TfR/Аβ) (1:3 последовательное разведение) объединяли с биотинилированным анти-TfR^A (конечная концентрация = 0,5 нМ) и добавляли в планшет на 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали PBS/0,05% Tween 20, и в планшет добавляли HRP-стрептавидин (Southern Biotech, Birmingham), и осуществляли инкубацию в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали PBS/0,05% Tween 20, и биотинилированное анти-TfR^A, связанное с планшетом, выявляли, используя субстрат TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

В одном варианте осуществления антитело против R ГЭБ с низкой аффинностью здесь связано с меткой и/или лекарственным средством против неврологического нарушения или визуализирующим агентом для более эффективного переноса метки и/или лекарственного средства или визуализирующего агента через ГЭБ. Такого связывания можно достичь с помощью химических сшивателей или посредством создания гибридных белков и т.д.

Ковалентное конъюгирование может быть либо непосредственным, либо через линкер. В некоторых вариантах осуществления непосредственное конъюгирование осуществляют посредством создания слияния белков (т.е. посредством генетического слияния двух генов, кодирующих антитело против R ГЭБ и лекарственное неврологическое средство, и экспрессии в виде одного белка). В некоторых вариантах осуществления непосредственное конъюгирование осуществляют посредством образования ковалентной связи между реакционноспособной группой в одной из двух частей антитела против R ГЭБ и соответствующей группой или акцептором в лекарственном неврологическом средстве. В некоторых вариантах осуществления непосредственное конъюгирование осуществляют посредством модификации (т.е. генетической модификации) одной из двух молекул, подвергаемых конъюгированию, с включением реакционноспособной группы (в качестве не ограничивающих примеров, сульфгидрильной группы или карбоксильной группы), которая порождает ковалентное присоединение к другой молекуле, подвергавшейся конъюгированию в соответствующих условиях. В качестве одного не ограничивающего примера, молекулу (т.е. аминокислоту) с желаемой реакционноспособной группой (т.е. остатком цистеина) можно ввести, например, в антитело против R ГЭБ, и образовать дисульфидную связь с лекарственным неврологическим средством. В данной области техники также известны способы ковалентного соединения нуклеиновых кислот с белками (т.е. фотосшивание, см., например, Zatschin et al. *Russ. Chem. Rev.* 74: 77-95 (2005)). Нековалентное конъюгирование можно осуществить с помощью любого способа нековалентного присоединения, включая гидрофобные связи, ионные связи, электростатические взаимодействия и т.п., как будет легко понято специалистом со средним уровнем компетентности в данной области техники. Конъюгирование можно также выполнить, используя множество линкеров. Например, антитело против R ГЭБ и лекарственное неврологическое средство можно конъюгировать с использованием ряда бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидата HCl), активные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Можно также использовать пептидные линкеры, состоящие из одной-двадцати аминокислот, соединенных пептидными связями. В некоторых таких вариантах осуществления аминокислоты выбирают из двадцати встречающихся в природе аминокислот. В некоторых других таких вариантах осуществления одну или более аминокислот выбирают из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. Линкер может быть "расщепляемым линкером", облегчающим освобождение лекарственного неврологического средства после доставки в головной мозг.

Например, кислотонеустойчивый линкер, чувствительный к пептидазе линкер, фоточувствительный линкер, диметильный линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., *Cancer Res.* 52: 127-131 (1992); патент США № 5208020) могут использоваться.

В настоящем изобретении здесь специально предусмотрены, но без ограничения, конъюгаты, приготовленные с использованием сшивающих агентов, включающих, но без ограничения, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB, и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые имеются в продаже (например, от Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., США).

Для невропатического нарушения можно выбрать лекарственное неврологическое средство, которое представляет собой анагетик, включая, но без ограничения, наркотические/опиоидные анагетики (т.е. морфин, фентанил, гидрокодон, меперидин, метадон, оксиморфин, пентазоцин, пропоксифен, трамадол, кодеин и оксикодон), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID) (т.е. ибупрофен, напроксен, диклофенак, дифлунизал, этодолак, фенпрофен, флурбипрофен, индометацин, кеторолак, мефенаминовую кислоту, мелоксикам, набуметон, оксапрозин, пироксикам, сулиндак и толметин), кортикостероид (т.е. кортизон, преднизон, преднизолон, дексаметазон, метилпреднизолон и триамцинолон), средство от мигрени (т.е. суматриптин, алмотриптан, фроватриптан, суматриптан, ризатриптан, элетриптан, золмитриптан, дигидроэрготамин, элетриптан и эрготамин), ацетаминофен, салицилат (т.е. аспирин, холина салицилат, магния салицилат, дифлунизал и салсалат), противосудорожное средство (т.е. карбамазепин, клоназепам, габапентин, ламотригин, прегабалин, тиагабин и топирамат), обезболивающее средство (т.е. изофлуран, трихлорэтилен, галотан, севофлюран, бензокаин, хлорпрокаин, кокаин, циклометикаин, диметоксаин, пропоксикаин, прокаин, новокаин, пропаракаин, тетракаин, артикаин, бупивакаин, картикаин, цинхокаин, этидокаин, левобупивакаин, лидокаин, мепивакаин, пиперокаин, прилокаин, ропивакаин, тримекаин, сакситоксин и тетродотоксин) и ингибитор соx-2 (т.е. целекоксиб, рофекоксиб и валдекоксиб). Для нарушения в виде невропатии с вызовом головокружения можно выбрать лекарственное неврологическое средство, которое представляет собой средство от головокружения, включая, но без ограничения, меклизин, дифенгидрамин, прометазин и диазепан). Для нарушения в виде невропатии с вызовом тошноты можно выбрать лекарственное неврологическое средство, которое представляет собой средство от тошноты, включая, но без ограничения, прометазин, хлорпромазин, прохлорперазин, триметобензамид и метоклопрамид. Для нейродегенеративного заболевания можно выбрать лекарственное неврологическое средство, которое является гормоном роста или нейротрофическим фактором; примеры включают, но без ограничения, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-4/5, фактор 2 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 сосудистого эндотелия (VEGF), антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейрутин, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), херегулин, нейрегулин, артемин, персефин, интерлейкины, глиальный нейротрофический фактор (GFR), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (CSF), гранулоцитарно-макрофагальный CSF, нетрины, кардиотрофин-1, белки хеджеоги, ингибирующий лейкоз фактор (LIF), мидкин, плейотрофин, костные морфогенетические белки (BMP), нетрины, сапозины, семафорины и фактор роста стволовых клеток (SCF).

Для рака можно выбрать лекарственное неврологическое средство, которое является химиотерапевтическим средством. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид CYTOXAN®; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включающие алтреамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелесин, карзелесин и бизелесин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид мехлоретаминоксида, мелфалан; новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, в частности калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II (см., например, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); динемистин, в том числе динемистин А; эсперамистин, а также неокарциностафинный хромофор и родственные хромофоры хромопротеиновых эне-

диновых антибиотиков), алкациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофиллин, хромомизины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин ADRIAMYCIN® (в том числе морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин, митомизины, такие как митомизин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомизины, пепломицин, потфиромицин, пуромизин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калуостерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; антагонисты гормонов коры надпочечников, такие как аминоклоротетимид, митотан, трилостан; наполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидгликозид; аминоклевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; эллиптиния ацетат; эпотионин; этоглуцид; галлия нитрат; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтансиноиды, такие как майтансин 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; теназоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндесин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); тиотепу; таксоиды, например паклитаксел TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ без кремофора, препарат сконструированных на основе альбумина наночастиц паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) и доксетаксел TAXOTERE® (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Франция); хлоранбуцил; гемцитабин (GEMZAR®); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин (VELBAN®); платину; эпопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин (ONCOVIN®); оксалиплатин; лейкововин, винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин (XELODA®); фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из приведенных выше лекарственных средств; а также комбинации двух или более приведенных выше лекарственных средств, такие как СНОР, сокращение для комбинированной терапии с использованием циклофосфамида, доксорубина, винкристина и преднизолона, и FOLFOX, сокращение для схемы лечения оксалиплатином (ELOX-ATINTM) в сочетании с 5-FU и лейковорином.

В это определение химиотерапевтических средств также включены антигормональные средства, которые действуют с регулированием, уменьшением, блокированием или ингибированием эффектов гормонов, которые могут активировать рост рака, и часто присутствуют в форме системного лечения, или лечения всего организма. Они сами могут представлять собой гормоны. Примеры включают антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогенов (SERM), включающие, например, тамоксифен (включая тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен EVISTA®, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен FARESTON®; антипрогестероны; ингибиторы рецепторов эстрогенов (ERD); агенты, которые действуют с подавлением или отключением яичников, например, агонисты лютеинизирующий гормон-релизинг гормона (LHRH), такие как лейпролида ацетат LUPRON® и ELIGARD®, гозерелина ацетат, бузерелина ацетат и триптерелин; другие антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; и ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, которые регулируют продукцию эстрогенов в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклоротетимид, мегестрола ацетат MEGASE®, эксместан AROMASIN®, форместан, фадрозол, ворозол RIVISOR®, летрозол FEMARA® и анастрозол ARIMIDEX®. Кроме того, такое определение химиотерапевтических средств включает бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат DIDROCAL®, NE-58095, золедроновую кислоту/золедронат ZOMETHA®, алендронат FOSAMAX®, памидронат AREDIA®, тилудронат SKELID® или ризедронат AC-TONEL®; а также троксацитабин (аналог цитозина нуклеотизида - 1,3-диоксалан); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности, те, которые ингибируют экспрессию генов в путях передачи сигналов, вовлеченных в aberrantную пролиферацию клеток, таких как, например, PKC-альфа, Raf, H-Ras и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина THERATOPE® и вакцины для генотерапии, например вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы 1 LURTOTECAN®; gmRH ABARELLX®; лапатиниба дитозилат (двойной ингибитор тирозинкиназ ErbB-2 и EGFR в виде небольшой молекулы, также известный как GW572016); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из приведенных выше лекарственных

средств.

Другой группой соединений, которые можно выбрать в качестве лекарственных неврологических средств для лечения или предупреждения рака, являются противораковые иммуноглобулины (включающие, но без ограничения, трастузумаб, бевацизумаб, алемтуксумаб, цетуксимаб, гемтузумаб озогамин, ибритумомаб тиуксетан, панитумумаб и ритуксимаб). В некоторых случаях антитела вместе с токсической меткой, включающие, но без ограничения, тозитумомаб вместе с радиоактивной меткой ^{131}I , могут использоваться для таргетинга и уничтожения желаемых клеток (т.е. раковых клеток).

Для болезни или нарушения глаз можно выбрать лекарственное неврологическое средство, которое представляет собой антиангиогенное средство для глаз (т.е. бевацизумаб, ранибициумаб и пегаптант), средство от болезни глаз - глаукомы (т.е. карбахол, эпинефрин, демекария бромид, апраклонидин, бримонидин, бринзоламид, левобунолол, тимонол, бетаксол, дорзоламид, биматопрост, картеолол, метипранолол, дипивефрин, травопрол и латанопрост), ингибитор карбоангидразы (т.е. метазоламид и ацетазоламид), антигистаминное средство для глаз (т.е. нафазолин, фенилэфрин и тетрагидрозолин), смазку для глаз, стероид для глаз (т.е. фторметолон, преднизолон, лотепреднол, дексаметазон, лифлупреднат, римексолон, флуоцинолон, медризон и триамцинолон), обезболивающее средство для глаз (т.е. лидокаин, пропаракан и тетракаин), противомикробное средство для глаз (т.е. левофлоксацин, гатифлоксацин, ципрофлоксацин, моксифлоксацин, хлорамфеникол, бацитрацин/полимиксин b, сульфацил, тобрамицин, азитромицин, бесифлоксацин, норфлоксацин, сульфасоксазол, гентамицин, идоксиридин, эритромицин, натамицин, грамицидин, неомицин, офлоксацин, трифлуридин, ганцикловир, видарабин), противовоспалительное средство для глаз (т.е. непафенак, кеторолак, флурбипрофен, супрофен, циклопорин, триамцинолон, диклофенак и бромфенак), антигистаминное средство или противоотечное средство для глаз (т.е. кетотифен, олопатадин, эпинастин, нафазолин, кромолин, тетрагидрозолин, пемироласт, бепотастин, нафазолин, фенилэфрин, недокромил, лодоксамид, фенилэфрин, эмедастин и азеластин).

Для нарушения в виде эпилептического припадка можно выбрать лекарственное неврологическое средство, которое представляет собой противосудорожное средство или противоэпилептическое средство, включая, но без ограничения, противосудорожные барбитураты (т.е. примидон, метарбитал, мефобарбитал, аллобарбитал, амобарбитал, апробарбитал, альфенал, барбитал, браллобарбитал и фенобарбитал), противосудорожные средства на основе бензодиазепинов (т.е. диазепам, клоназепам и лоразепам), противосудорожные средства на основе карбаматов (т.е. фелбамат), противосудорожные средства - ингибиторы карбоангидразы (т.е. ацетазоламид, топирамат и зонисамид), противосудорожные средства на основе дибензазепинов (т.е. руфинамид, карбамазепин и окскарбазепин), противосудорожные средства производные жирных кислот (т.е. дивалпрокс и вальпровую кислоту), 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), противосудорожные средства на основе гидантоина (т.е. фенитоин, этотин, фосфенитоин и мефенитоин), разные противосудорожные средства (т.е. лакосамид и сульфат магния), прогестины (т.е. прогестерон), противосудорожные средства на основе оксазолидиндионов (т.е. параметидин и триметидион), противосудорожные средства на основе пирролидинов (т.е. леветирацетам), сукцинимидные противосудорожные средства (т.е. этосуксимид и метсуксимид), противосудорожные средства на основе триазинов (т.е. ламотригин) и противосудорожные средства на основе мочевины (т.е. фенацетид и фенетурин).

Для лизосомной болезни накопления можно выбрать лекарственное неврологическое средство, которое само является ферментом или в противном случае воспроизводит активность фермента, который является нарушенным при этой болезни.

Приводимые в качестве примера рекомбинантные ферменты для лечения лизосомных болезней накопления включают, но без ограничения, те, которые изложены, например, в публикации заявки на патент США № 2005/0142141 (т.е. альфа-L-идуронидаза, идуронат-2-сульфатаза, N-сульфатаза, альфа-N-ацетилглюкозаминидаза, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатаза, бета-галактозидаза, арилсульфатаза B, бета-глюкуронидаза, кислая альфа-глюкозидаза, глюкоцереброзидаза, альфа-галактозидаза A, гексозамидаза A, кислая сфингомелиназа, бета-галактоцереброзидаза, бета-галактозидаза, арилсульфатаза A, кислая церамидаза, аспартоацилаза, пальмитол-протеин-тиоэстераза 1 и трипептидил-аминопептидаза 1).

Для амилоидоза можно выбрать лекарственное неврологическое средство, которое включает, но без ограничения, антитело или другую связывающую молекулу (включая, но без ограничения, небольшую молекулу, пептид, аптамер или другое белок-связывающее вещество), которое специфически связывается с мишенью, выбираемой из бета-секретазы, тау, пресенилина, белка-предшественника амилоида или его частей, пептида - амилоида бета или его олигомеров или фибрилл, рецептора б смерти (DR6), рецептора для ускоренных конечных продуктов гликациона (RAGE), паркина и хантингтина; ингибитор холинэстеразы (т.е. галантамин, донепезил, ривастигмин и такрин); антагонист рецепторов NMDA (т.е. мемантин), средство для уменьшения моноаминов (т.е. тетрабеназин); эрголоида мезилат; антихолинэргическое средство против паркинсонизма (т.е. проциклидин, дифенгидрамин, тригексилфенидил, бензтропин, бипериден и тригексифенидил); допаминергическое средство против паркинсонизма (т.е. энтакапон, селегилин, прамипексол, бромкриптин, ротиготин, селегилин, ропинирол, разагилин, апоморфин, карбидопу,

леводопу, перголид, толкапон и амантадин); тетрабеназин; противовоспалительное средство (включая, но без ограничения, нестероидное противовоспалительное средство (т.е. индометацин и другие соединения, перечисленные выше); гормон (т.е. эстроген, прогестерон и лейпролид); витамин (т.е. фолат и никотинамид); димеболин; гомотаурин (т.е. 3-аминопропансульфонокислоту; 3APS); модулятор активности рецепторов серотонина (т.е. ксалипроден); интерферон и глюкокортикоид.

Для вирусного или микробного заболевания можно выбрать лекарственное неврологическое средство, которое включает, но без ограничения, противовирусное соединение (включающее, но без ограничения, противовирусный адамантан (т.е. римантадин и амантадин), противовирусный интерферон (т.е. пэгинтерферон альфа-2b), антагонист рецепторов хемокинов (т.е. маравирок), ингибитор переноса цепи интегразой (т.е. ралтегравир), ингибитор нейраминидазы (т.е. осельтамивир 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, зальцитабин, телбивудин и диданозин), ингибитор протеаз (т.е. даунавивир, атазанавир, фосампренавивир, типранавир, ритонавивир, нелфинавивир, ампренавивир, индинавивир и саквинавивир) пуриновый нуклеозид (т.е. валацикловир, фамцикловир, ацикловир, рибавирин, ганцикловир, валганцикловир и цидофовир), и разное противовирусное средство (т.е. энфувиртид, форкарнет, паливизумаб и фомивирсен)), антибиотик (включая, но без ограничения, аминопенициллин (т.е. амоксициллин, ампициллин, оксациллин, нафциллин, клоксациллин, диклоксациллин, флукоксациллин, темоциллин, азлоциллин, карбенициллин, тикарциллин, мезлоциллин, пиперациллин и бакампициллин), цефалоспорины (т.е. цефазолин, цефалексин, сефалотин, сефамандол, цефтриаксон, цефотаксим, цефподоксим, цефтазидим, цефадроксил, цефрадин, лоракарбеф, цефотетан, цефуроксим, цефпрозил, цефаклор и цефокситин), карбапенем/пенем (т.е. имипенем, меропенем, эртапенем, фаропенем и дорипенем), монобактам (т.е. азтреонам, тигемонам, норкардицин А и табтоксинин-бета-лактамы, ингибитор бета-лактамазы (т.е. клавулановую кислоту, тазобактам и сульбактам) вместе 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), 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, спарфлоксацин и темафлоксацин), сульфонамид (т.е. мафенид, сульфонамидохризоидин, сульфациетамид, сульфадиазин, сульфаметизол, сульфаниламид, сульфасалазин, сульфисоксазол, 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, петостатин и валрубицин) и разное антибактериальное соединение (т.е. бацитрацин, колистин и полимиксин В)), противогрибковое средство (т.е. метронидазол, нитазоксанид, тинидазол, хлорохин, йодохинол и паромомицин) и антипаразитарное средство (включая, но без ограничения, хинин, хлорохин, амодиахин, пириметамин, сульфадоксин, прогуанил, мефлохин, атоваквон, примакхин, артемесинин, галофантрин, доксициклин, клиндамицин, мебендазол, пирантела памоат, триабендазол, диэтилкарбамазин, ивермектин, рифампин, амфотерицин В, меларсопрол, эфорнитин и альбендазол).

Для ишемии можно выбрать лекарственное неврологическое средство, которое включает, но без ограничения, тромболитическое средство (т.е. урокиназу, альтеплазу, ретеплазу и тенектеплазу), ингибитор агрегации тромбоцитов (т.е. аспирин, цилостазол, клопидогрель, прасугрель и дипиридамола), статины (т.е. ловастатин, правастатин, флувастатин, розувастатин, аторвастатин, симвастатин, церивастатин и питавастатин) и соединения для улучшения кровотока или эластичности сосудов, включая лекарственные средства от кровяного давления.

Для нарушения поведения лекарственное неврологическое средство можно выбрать из изменяющего поведение соединения, включающего, но без ограничения, атипичное антипсихотическое средство (т.е. рисперидон, оланзапин, априпипразол, кветиапин, палиперидон, асенапин, клозапин, илоперидон и зипрасидон), антипсихотическое средство на основе фенотиазина (т.е. прохлорперазин, хлорпромазин, флуфеназин, перфеназин, трифлуоперазин, тиоридазин и мезоридазин), тioxантен (т.е. тиотиксен), разное антипсихотическое средство (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. доксефин, кломипрамин, амоксапин, нортриптилин, амитриптилин, тримипрамин, имипрамин, протриптилин и дезипрамин), тетрациклический антидепрессант (т.е. миртазапин и мапротилин), антипсихотическое средство на основе фенилпиперазинов (т.е. тразодон и нефазодон), ингибитор моноаминоксидазы (т.е. изокарбоксазид, фенелзин, селегилин и транилципромин), бензодиазепин (т.е. альпразолам, эстазолам, флуразептам, клоназепам, лоразепам и диазепам), ингибитор обратного захвата норэпинефрина-допамина (т.е. бупропион), стимулятор ЦНС (т.е. фентермин, диэтилпропион, метамфетамин, декстроамфетамин, амфетамин, метилфенидат, дексметил-

фенидат, лиздексамфетамин, модафинил, пемолин, фендиметразин, бензфетамин, фендиметразин, армодафинил, диэтилпропион, кофеин, атомоксетин, доксапрам и мазиндол), анксиолитическое/седативное/снотворное средство (включая, но без ограничения, барбитурат (т.е. секобарбитал, фенобарбитал и мефобарбитал), бензодиазепин (описанный выше) и разное анксиолитическое/седативное/снотворное средство (т.е. дифенгидрамин, натрия оксидат, залеплон, гидроксизин, хлоралгидрат, золпидем, биспирон, доксепин, эзопиклон, рамелтеон, мепробамат и этхлорвинол)), секретин (см., например, Ratliff-Schaub et al. *Autism* 9: 256-265 (2005)), опиоидный пептид (см., например, Cowen et al., *J. Neurochem.* 89: 273-285 (2004)) и нейропептид (см., например, Hethwa et al. *Am. J. Physiol.* 289: E301-305 (2005)).

Для воспаления ЦНС можно выбрать лекарственное неврологическое средство, которое борется с самим воспалением (т.е. нестероидное противовоспалительное средство, такое как ибупрофен или напроксен), или которое действует на причину, лежащую в основе воспаления (т.е. противовирусное или противораковое средство).

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения "связывания" достигаются с помощью создания полиспецифического антитела (например, биспецифического соединения). Полиспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые обладают специфичностями связывания с по крайней мере двумя различными сайтами. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывает R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает антиген головного мозга, такой как бета-секретаза 1 (BACE1) или Аβ, и другие антигены головного мозга, описанные здесь.

Приводимым в качестве примера антигеном головного мозга, с которым связывается такое полиспецифическое/биспецифическое антитело, является BACE1, а приводимым в качестве примера антителом, связывающимся с ним, является антитело YW412.8.31, представленное на фиг. 5A, B здесь.

В другом варианте осуществления антигеном головного мозга является Аβ, при этом приводимые в качестве примера антитела против него описаны в WO2007068412, WO2008011348, WO20080156622 и WO2008156621, которые включены в словесной форме сюда посредством ссылки, при этом приводимое в качестве примера антитело против Аβ включает антитело изотипа IgG4 MABT5102A, включающее аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей, представленные на фиг. 7a и 7b соответственно.

Методы получения полиспецифических антител включают, но без ограничения, рекомбинантную соэкспрессию двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулинов, обладающих различными специфичностями, (см. Milstein and Cuellar, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829 и Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), и создание "выступа-во-впадину" (см., например, патент США № 5731168). Полиспецифические антитела можно также получить посредством создания эффектов электростатического управления для получения Fc-гетеродимерных молекул антител (WO 2009/089004A1); сшивки двух или более антител или фрагментов (см., например, патент США № 4676980 и Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); использования "лейциновых молний" для получения биспецифических антител (см., например, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); использования технологии "диател" для получения фрагментов биспецифических антител (см., например, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)); и использования димеров одноцепочечных Fv (sFv) (см., например, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); и приготовления триспецифических антител, как описано, например, в Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Сюда также включены сконструированные антитела с тремя или более функциональными антигенсвязывающими сайтами, включая "антитела-осминоги" или "иммуноглобулины с двойственно вариабельными доменами" (DVD) (см., например, US 2006/0025576A1, и Wu et al. *Nature Biotechnology* (2007)).

Антитело или фрагмент здесь также включает "двойственно действующий Fab" или "DAF", включающий антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ (например, TfR), а также антигеном головного мозга (например, BACE1) (см. US 2008/0069820, например).

В одном варианте осуществления антителом является фрагмент антитела, при этом различные такие фрагменты описаны здесь.

В другом варианте осуществления антителом является интактное или полноразмерное антитело. Интактные антитела в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей можно отнести к различным классам. Существуют пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно далее разбить на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам антител, называются α, δ, ε, γ и μ соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В одном варианте осуществления у интактного антитела отсутствует эффекторная функция.

Методы создания антител известны, и примеры предоставлены выше в разделе "Определения" этого документа. В одном варианте осуществления антителом является химерное, гуманизованное анти-

тело или антитело человека, или его антигенсвязывающий фрагмент.

В наличии имеются различные методы для определения связывания антитела с R ГЭБ. Одним таким анализом является иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA) для подтверждения способности к связыванию с R ГЭБ человека (и антигеном головного мозга). В соответствии с этим анализом планшеты, покрытые антигеном (например, рекомбинантным растворимым R ГЭБ), инкубируют с образцом, включающим антитело против R ГЭБ, и определяют связывание антитела с представляющим интерес антигеном.

В одном аспекте проверяют антигенсвязывающую активность антитела настоящего изобретения, например, с помощью известных способов, таких как ELISA, Вестерн-блоттинг и т.д.

Анализ для оценки доставки системно вводимого антитела и другой биологической активности антитела можно выполнить, как описано в примерах или как известно для представляющего интерес антитела против антигена головного мозга.

Теперь будут описаны приводимые в качестве примера анализы, в которых полиспецифическое антитело связывается с BACE1.

Анализ конкуренции могут использоваться для идентификации антитела, которое конкурирует с любым из антител или Fab, описанным здесь, например, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10, за связывание с BACE1. В некоторых вариантах осуществления такое конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается любое из антител или Fab, описываемых здесь, например, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10. Детальные, приводимые в качестве примера способы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены в Morris (1996), "Epitope Mapping Protocols," в *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

В приводимом в качестве примера анализе конкуренции иммобилизованную BACE1 инкубируют в растворе, включающем первое меченое антитело, которое связывается с BACE1 (например, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10), и второе немеченое антитело, которое проверяют в отношении его способности конкурировать с первым антителом за связывание с BACE1. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованную BACE1 инкубируют в растворе, включающем первое меченое антитело, но не второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, допускающих связывание первого антитела с BACE1, избыточное количество не связавшегося антитела удаляют, и определяют количество метки, связавшейся с иммобилизованной BACE1. Если количество метки, связавшейся с иммобилизованной BACE1, заметно уменьшено в исследуемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это означает, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с BACE1. См. Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

В одном аспекте обеспечиваются анализы для идентификации антител против BACE1, обладающих биологической активностью. Биологическая активность может включать, например, ингибирование аспартилпротеазной активности BACE1. Также обеспечиваются антитела, обладающие такой активностью *in vivo* и/или *in vitro*, например, определяемой с помощью гомогенного флуоресцентного анализа с разрешением по времени (HTRF) или микрофлюидного капиллярного электрофоретического анализа (MCE), используя синтетические пептиды-субстраты, или *in vivo* в линиях клеток, экспрессирующих субстраты для BACE1, такие как APP.

Антитело (в том числе полиспецифическое антитело) здесь необязательно рекомбинантно продуцируют в клетке-хозяине, трансформированной последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующих его тяжелую и легкую цепи (например, когда клетка-хозяин была трансформирована одним или более векторов с нуклеиновой кислотой в них). Клеткой-хозяином необязательно является клетка млекопитающего, например клетка яичника китайского хомячка (CHO).

2. Фармацевтические препараты.

Терапевтические препараты антител, используемые в соответствии с настоящим изобретением, готовят для хранения смешиванием антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают буферы, например, фосфат, цитрат, гистидин и другие органические кислоты; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид; бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метилпарабен или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA;

сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Препарат здесь может также содержать более одного активного соединения, если необходимо, не обязательно соединения с дополнительными активностями, которые не оказывают неблагоприятный эффект друг на друга. Тип и эффективные количества таких лекарственных средств зависят, например, от количества антитела, присутствующего в препарате, и клинических показателей индивида. Приводимые в качестве примера такие лекарственные средства обсуждаются ниже.

Активные ингредиенты можно также поместить в микрокапсулы, приготовленные, например, с помощью методов коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и микрокапсулы из поли(метилметакрилата), соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Можно приготовить препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, которые находятся в форме изделий, имеющих определенную форму, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают полиэфир, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и лейпролида ацетата), и поли-D-(-)-3-гидроксипропановую кислоту.

Препараты, используемые для *in vivo* введения, должны быть стерильными. Это легко осуществить с помощью фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

В одном варианте осуществления препарат является изотоническим.

3. Терапевтические применения антител против R ГЭБ.

Антитела против R ГЭБ (в том числе полиспецифические антитела, включающие их) могут использоваться в ряде *in vivo* способов. Например, настоящее изобретение относится к способу переноса терапевтического соединения через гематоэнцефалический барьер, включающий выдержку антитела против R ГЭБ, связанного с терапевтическим соединением, (например, полиспецифического антитела, которое связывает и R ГЭБ, и антиген головного мозга) на ГЭБ, так что антитело переносит связанное с ним терапевтическое соединение через ГЭБ. В другом примере настоящее изобретение относится к способу переноса лекарственного средства против неврологического нарушения через гематоэнцефалический барьер, включающий выдержку антитела против R ГЭБ, связанного с лекарственным средством против неврологического нарушения, (например, полиспецифического антитела, которое связывает как R ГЭБ, так и антиген головного мозга) на ГЭБ, так что антитело переносит связанное с ним лекарственное средство против неврологического нарушения через ГЭБ. В одном варианте осуществления ГЭБ здесь существует у млекопитающего (например, человека), например, у млекопитающего, имеющего неврологическое нарушение, в том числе, без ограничения: болезнь Альцгеймера (AD), удар, деменцию, мышечную дистрофию (MD), рассеянный склероз (MS), амиотрофический боковой склероз (ALS), муковисцидоз, синдром Ангельмана, синдром Лиддла, болезнь Паркинсона, болезнь Пика, болезнь Педжета, рак, травматическое повреждение головного мозга и т.д.

В одном варианте осуществления неврологическое нарушение выбирают из невропатии, амилоидоза, рака (например, включающего в себя ЦНС или головной мозг), болезни или нарушения глаз, вирусной или микробной инфекции, воспаления (например, ЦНС или головного мозга), ишемии, нейродегенеративного заболевания, эпилептического припадка, нарушения поведения, лизосомной болезни накопления и т.д.

Невропатические нарушения представляют собой заболевания или патологии нервной системы, характеризующиеся несоответствующей или неконтролируемой передачей сигнала по нервным волокнам или ее отсутствием, и включают, но без ограничения, хроническую боль (включая ноцицептивную боль), боль вследствие повреждения тканей организма, включая связанную с раком боль, невропатическую боль (боль вследствие патологий нервов, спинного мозга или головного мозга) и психогенную боль (полностью или главным образом связанную с психологическим нарушением), головную боль, мигрень, невропатию и симптомы и синдромы, часто сопровождающие такие невропатические нарушения, такие как головокружение или тошнота.

Амилоидозы являются группой заболеваний и нарушений, связанных с экстраклеточными белковыми отложениями в ЦНС, включающих, но без ограничения, вторичный амилоидоз, возрастной амилоидоз, болезнь Альцгеймера (AD), умеренное нарушение когнитивных функций (MCI), деменцию, связанную с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча), сочетанную деменцию Гуама-Паркинсона, церебральную амилоидную ан-

гиопатию, болезнь Хантингтона, прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, трансмиссивную губчатую энцефалопатию, связанную с ВИЧ деменцию, амиотрофический боковой склероз (ALS), миозит с включенными тельцами (IBM) и болезни глаз, связанные с отложением бета-амилоида (т.е. дегенерацию желтого пятна, связанную с друзами невропатию зрительного нерва и катаракту).

Окологические заболевания ЦНС характеризуются аберрантной пролиферацией одной или более клеток ЦНС (т.е. нервной клетки) и включают, но без ограничения, глиому, мультиформную глиобластому, менингиому, астроцитому, неврому слухового нерва, хондрому, олигодендроглиому, медуллобластому, ганглиоглиому, шванному, нейрофибромому, нейробластому и экстрадуральные, интрадуральные или интрадуральные опухоли.

Заболевания или нарушения глаза являются заболеваниями или нарушениями глаза, который в рамках настоящего изобретения считается органом ЦНС, подпадающим под действие ГЭБ. Заболевания или нарушения глаза включают, но без ограничения, нарушения склеры, роговицы, радужной оболочки и цилиарного тела (т.е. склерит, кератит, язву роговицы, эрозию роговицы, снежную слепоту, ожог глаз, поверхностный точечный кератит Тайджесона, неоваскуляризацию роговицы, дистрофию Фукса, кератоконус, сухой кератоконъюнктивит, ирит и увеит), нарушения хрусталика глаза (т.е. катаракту), нарушения сосудистой оболочки и сетчатки (т.е. отслоение сетчатки, расслоение сетчатки, гипертензивную ретинопатию, диабетическую ретинопатию, ретинопатию, ретинопатию недоношенных, возрастную дегенерацию желтого пятна, дегенерацию желтого пятна (влажную или сухую форму), эпиретинальную мембрану, ретинит пигментный и отек желтого пятна), глаукому, мушки перед глазами, нарушения зрительного нерва и зрительных путей (т.е. наследственную оптическую невропатию Лебера и друзы диска зрительного нерва), нарушения мышц глаза/бинокулярного зрения, аккомодации/рефракции (т.е. косоглазие, офтальмопарез, прогрессирующую наружную офтальмоплеггию, сходящееся косоглазие, расходящееся косоглазие, дальновзоркость, близорукость, астигматизм, анизометропию, старческую дальновзоркость и офтальмоплеггию), нарушения зрения и слепоту (т.е. амблиопию, врожденный амавроз Левера, скотому, цветовую слепоту, ахроматопсию, никталопию, слепоту, онхоцеркоз с полной слепотой и микрофтальмию/колодому), красный глаз, зрачок Аргилла Робертсона, кератомикоз, ксерофтальмию и аниридию.

Вирусные и микробные инфекции ЦНС включают, но без ограничения, инфекционные заболевания, вызванные вирусами (т.е. вирусом гриппа, ВИЧ, 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 neoformans*), паразиты (т.е. *Toxoplasma gondii*) или амебы, приводящими к патофизиологиям ЦНС, включающим, но без ограничения, менингит, энцефалит, миелит, васкулит и абсцесс, которые могут быть острыми или хроническими.

Воспаление ЦНС представляет собой воспаление, причиной которого является повреждение ЦНС, которое может быть физическим повреждением (т.е. вследствие несчастного случая, хирургического вмешательства, травмы головного мозга, повреждения спинного мозга, сотрясения) или повреждением, обусловленным одним или более других заболеваний или нарушений ЦНС (т.е. абсцессом, раком, вирусной или микробной инфекцией) или связанным с ними.

Ишемия ЦНС, как здесь используется, относится к группе нарушений, связанных с аберрантным кровотоком или состоянием сосудов в головном мозге или их причинами, и включает, но без ограничения, фокальную ишемию головного мозга, глобальную ишемию головного мозга, удар (т.е. субарахноидальное кровоизлияние и внутримозговое кровоизлияние) и аневризму.

Нейродегенеративные заболевания представляют собой группу заболеваний и нарушений, связанных с утратой функции нервных клеток или их гибелью в ЦНС, и включают, но без ограничения, аденолейкодистрофию, болезнь Александра, болезнь Альпера, амиотрофический боковой склероз, атаксию-телеангиэстазию, болезнь Баттена, синдром Коккейна, кортикобазальную дегенерацию, дегенерацию, обусловленную амилоидозом или связанную с ним, атаксию Фридрейха, дегенерацию лобно-височных долей, болезнь Кеннеди, множественную системную атрофию, рассеянный склероз, первичный боковой склероз, прогрессирующий надъядерный паралич, спинальную мышечную атрофию, попеременный миелит, болезнь Рефсума и спиноцеребеллярную атаксию.

Эпилептические заболевания и нарушения ЦНС являются результатом несоответствующей и/или аномальной электрической проводимости в ЦНС и включают, но без ограничения, эпилепсию (т.е. малые эпилептические припадки, атонические припадки, роландическую (доброкачественную детскую) эпилепсию, детскую абсансную эпилепсию, клонические судороги, комплексные парциальные судороги, лобнодолевую эпилепсию, фебрильные судороги, судороги младенческие, ювенильную миоклоническую эпилепсию, ювенильную абсансную эпилепсию, синдром Леннокса-Гасто, синдром Ландау-Креффнера, синдром Дравета, синдром Отахара, синдром Веста, миоклонические судороги, митохондриальные нарушения, прогрессирующие миоклонические эпилепсии, психогенные припадки, рефлекторную эпилепсию, синдром Расмуссена, простые парциальные припадки, вторично генерализованные припадки, височнодолевую эпилепсию, тоникоклонические судороги, тонические судороги, психомоторные припадки, лимбическую эпилепсию, парциальные припадки, генерализованные припадки, эпилептическое со-

стояние, абдоминальную эпилепсию, акинетические припадки, автономные приступы, массивный билатеральный миоклонус, менструальную эпилепсию, приступы падения, вызванные эмоциями припадки, фокальные эпилептические припадки, эпилептические припадки смеха, эпилепсию Джексона, болезнь Лафора, двигательные припадки, мультифокальные эпилептические припадки, ночные припадки, фоточувствительную эпилепсию, псевдоприпадки, сенсорные припадки, едва заметные припадки, эпилептические припадки Сильвана, абстинентные эпилептические припадки и зрительные рефлекторные припадки).

Нарушения поведения являются нарушениями ЦНС, характеризующимися аберрантным поведением со стороны пораженного индивида, и включают, но без ограничения, расстройства сна (т.е. инсомнию, парасомнии, ночные страхи, относящиеся к суточному ритму расстройства сна и нарколепсию), расстройства настроения (т.е. депрессию, депрессию с суицидальными мыслями, страх, постоянные расстройства настроения, фобии, приступы паники, обсессивно-компульсивное расстройство, синдром дефицита внимания с гиперактивностью (ADHD), синдром дефицита внимания (ADD), синдром хронической усталости, агорафобию, посттравматическое стрессовое расстройство, биполярное расстройство), нарушения пищевого поведения (т.е. анорексию или булимия, психозы, относящиеся к развитию нарушения поведения (т.е. аутизм, синдром Ретта, синдром Аспергера), расстройства личности и психотические расстройства (т.е. шизофрению, бредовое расстройство и т.п.).

Лизосомные болезни накопления являются метаболическими нарушениями, которые в некоторых случаях связаны с ЦНС или характеризуются специфическим для ЦНС симптомами; такие нарушения включают, но без ограничения, болезнь Тай-Сакса, болезнь Гоше, болезнь Фабри, мукополисахаридоз (типов I, II, III, IV, V, VI и VII), гликогеноз, ганглиозидоз GM1, метахроматическую лейкодистрофию, болезнь Фарбера, лейкодистрофию Канавана и нейрональный цероидный липофуциноз типов 1 и 2, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Помпе и болезнь Краббе.

В одном аспекте антитело используется для выявления неврологического нарушения до возникновения симптомов и/или для оценки тяжести или длительности заболевания или нарушения. В одном аспекте антитело позволяет выявить и/или визуализировать, в том числе визуализировать с помощью рентгенографии, томографии или магнитно-резонансной томографии (MRI), неврологическое нарушение.

В одном аспекте обеспечивается антитело против R ГЭБ с низкой аффинностью для применения в качестве лекарственного средства. В дальнейших аспектах обеспечивается антитело против R ГЭБ с низкой аффинностью для применения при лечении неврологического заболевания или нарушения (например, болезни Альцгеймера). В некоторых вариантах осуществления обеспечивается антитело против R ГЭБ с низкой аффинностью для применения в способе лечения. В некоторых вариантах осуществления настоящим изобретением обеспечивается антитело против R ГЭБ с низкой аффинностью для применения в способе лечения индивида, имеющего неврологическое заболевание или нарушение, включающем введение индивиду эффективного количества антитела против R ГЭБ (необязательно связанного с лекарственным средством против неврологического нарушения). В одном таком варианте осуществления способ, кроме того, включает введение индивиду эффективного количества по крайней мере одного дополнительного терапевтического средства. В дальнейших вариантах осуществления настоящим изобретением обеспечивается антитело против R ГЭБ для применения для уменьшения или ингибирования образования амилоидных бляшек у пациента, подверженного риску развития неврологического заболевания или нарушения или страдающего им (например, болезнью Альцгеймера). "Индивидом" в соответствии с любым из вышеприведенных вариантов осуществления необязательно является человек. В определенном аспекте антитело против R ГЭБ для применения в способах настоящего изобретения увеличивает доставку лекарственного средства против неврологического нарушения, с которым оно связано.

В дальнейшем аспекте настоящим изобретением обеспечивается применение антитела против R ГЭБ с низкой аффинностью для производства или приготовления лекарственного средства. В одном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для лечения неврологического заболевания или нарушения. В дальнейшем варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения неврологического заболевания или нарушения, включающем введение индивиду, имеющему неврологическое заболевание или нарушение, эффективного количества лекарственного средства. В одном таком варианте осуществления способ, кроме того, включает введение индивиду эффективного количества по крайней мере одного дополнительного терапевтического средства.

В дальнейшем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения болезни Альцгеймера. В одном варианте осуществления способ включает введение индивиду, имеющему болезнь Альцгеймера, эффективного количества полиспецифического антитела, которое связывает как BACE1, так и Tfr. В одном таком варианте осуществления способ, кроме того, включает введение индивиду эффективного количества по крайней мере одного дополнительного терапевтического средства. "Индивидом" в соответствии с любым из вышеприведенных вариантов осуществления может быть человек.

Антитела против R ГЭБ настоящего изобретения можно использовать или отдельно, или в комбинации с другими агентами при лечении. Например, антитело против R ГЭБ настоящего изобретения можно вводить вместе с по крайней мере одним дополнительным терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является терапевтическое

средство, эффективное в лечении того же неврологического нарушения, для лечения которого используется антитело против R ГЭБ или отличного от него. Приводимые в качестве примера, дополнительные терапевтические средства включают, но без ограничения, различные лекарственные неврологические средства, описанные выше, ингибиторы холинэстеразы (такие как донепезил, галантамин, ровастигмин и такрин), антагонисты рецепторов NMDA (такие как мемантин), ингибиторы агрегации пептида - амилоида бета, антиоксиданты, модуляторы γ -секретазы, имитаторы фактора роста нервов (NGF) или NGF-генотерапия, агонисты PPAR γ , ингибиторы HMG-CoA-редуктазы (статины), ампакины, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты рецепторов GABA, ингибиторы киназы гликогенсинтазы, иммуноглобулин для внутривенного применения, агонисты мускариновых рецепторов, модуляторы никотиновых рецепторов, активную или пассивную иммунизацию пептидом - амилоидом бета, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты рецепторов серотонина и антитела против пептида в виде амилоида бета. В некоторых вариантах осуществления по крайней мере одно дополнительное терапевтическое средство выбирают из-за его способности подавлять один или более побочных эффектов лекарственного неврологического средства.

Такие комбинированные терапии, отмеченные выше, включают совместное введение (когда два или более терапевтических средств включены в одну и ту же композицию или отдельные композиции) и раздельное введение, в случае которого введение антитела настоящего изобретения может иметь место до, одновременно и/или после назначения дополнительного терапевтического средства и/или вспомогательного средства.

Антитела настоящего изобретения могут также использоваться в комбинации с другими интервенционными терапиями, такими как, но без ограничения, лучевая терапия, поведенческая терапия или другие терапии, известные в данной области техники и подходящие для неврологического нарушения, подлежащего лечению или предупреждаемого.

Антитело против R ГЭБ настоящего изобретения (или любое дополнительное терапевтическое средство) можно вводить любым подходящим способом, в том числе с помощью парентерального, внутривенного и интраназального введения, и, при желании, для местного лечения, введения внутрь повреждения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Введение доз может осуществляться с помощью любого подходящего способа, например, с использованием инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, в зависимости частично от того, является введение коротким или постоянным. Здесь предусматриваются различные схемы введения доз, включающие, но без ограничения, однократные или многократные введения в различные моменты времени, струйное болюсное введение и импульсную инфузию.

Основанные на липидах способы переноса антитела или его фрагмента через гематоэнцефалический барьер включают, но без ограничения, заключение антитела или его фрагмента в липосомы, которые связаны со связывающими фрагментами антител, которые связываются с рецепторами сосудистого эндотелия гематоэнцефалического барьера (см., например, публикацию заявки на патент США № 20020025313), и нанесение слоя антитела или его активного фрагмента на частицы липопротеинов низкой плотности (см., например, публикацию заявки на патент США № 20040204354) или аполипопротеин E (см., например, публикацию заявки на патент США № 20040131692).

Антитела настоящего изобретения будут составлять в фармацевтический препарат, дозировать и вводить способом, согласующимся с хорошей медицинской практикой. Принимаемые во внимание в этой связи факторы включают конкретное подвергаемое лечению нарушение, конкретное подвергаемое лечению млекопитающее, клиническое состояние отдельного пациента, причину нарушения, место доставки агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антитело необязательно составляют в препараты с одним или несколькими агентами, в настоящее время используемыми для предупреждения или лечения нарушения, о котором идет речь. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в препарате, типа нарушения или лечения и других факторов, обсуждавшихся выше. Они обычно используются в тех же дозах и вводятся теми же путями, которые описаны здесь, или составляют приблизительно 1-99% от доз, приведенных здесь, или в любой дозе или с использованием любого пути, которая(ый), как эмпирически/клинически определено, является соответствующей.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая доза антитела настоящего изобретения (при использовании отдельно или в комбинации с одним или более других дополнительных терапевтических средств) будет зависеть от типа подвергаемого лечению заболевания, типа антитела, тяжести и течения заболевания, от того, вводится ли антитело с профилактической или терапевтической целью, предшествующей терапии, анамнеза пациента и ответа на антитело, и усмотрения лечащего врача. Антитело подходящим образом вводят пациенту один раз или на протяжении ряда лечений. В зависимости от типа и тяжести заболевания от приблизительно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-10 мг/кг) антитела могут быть первоначальной возможной дозой для введения пациенту, или, например, посредством одного или нескольких отдельных введений, или с помощью непрерывной инфузии. Одна типичная су-

точная доза может колебаться от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от вышеупомянутых факторов. Для повторных введений на протяжении нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение будет, как правило, продолжаться, пока не будет иметь место желаемое подавление симптомов заболевания. Одна приводимая в качестве примера доза антитела будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,05 до приблизительно 10 мг/кг. Таким образом, одна или более доз, составляющая приблизительно 0,5, 2,0, 4,0 или 10 мг/кг (или любая их комбинация) может вводиться пациенту. Такие дозы могут вводиться с перерывами, например, раз в неделю или раз в три недели (например, так что пациент получает от приблизительно двух до приблизительно двадцати, или, например, приблизительно шесть доз антитела). Может вводиться первоначальная более высокая ударная доза с последующей одной или несколькими более низкими дозами. Однако могут применяться другие схемы введения доз. Прогресс этой терапии легко контролировать с помощью общепринятых методов и анализов.

Понятно, что любой из вышеприведенных препаратов или терапевтических способов может быть выполнен с использованием иммуноконъюгата настоящего изобретения вместо антитела против R ГЭБ или помимо него.

4. Изделия.

В другом аспекте настоящего изобретения обеспечивается изделие, содержащее вещества, применимые для лечения, предупреждения и/или диагностики описанных выше нарушений. Изделие включает контейнер и этикетку или листовку-вкладыш, прикрепленную к контейнеру или вложенную в него. Подходящие контейнеры включают, например, пузырьки, флаконы, шприцы, мешки с растворами для внутривенного введения и т.п. Контейнеры могут состоять из множества материалов, таких как стекло или пластмасса. В контейнере хранится композиция, которая является сама по себе или после объединения с другой композицией эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностики состояния, и он может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может быть мешком с раствором для внутривенного введения или флаконом с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). По крайней мере один активный агент в композиции является антителом настоящего изобретения. Этикетка или листовка-вкладыш указывает на то, что композиция используется для лечения предпочтительного состояния. Кроме того, изделие может включать (а) первый контейнер с композицией, содержащейся в нем, причем композиция включает антитело настоящего изобретения; и (b) второй контейнер с композицией, содержащейся в нем, причем композиция включает дополнительный цитотоксический или в другом отношении терапевтический агент. В этом варианте осуществления настоящего изобретения изделие может дополнительно включать листовку-вкладыш, указывающую на то, что композиции могут использоваться для лечения конкретного состояния. Альтернативно или дополнительно, изделие может, кроме того, включать второй (или третий) контейнер, включающий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекции (BWI), забуференный фосфатом солевой раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может, кроме того, включать другие материалы, желаемые с коммерческой точки зрения и точки зрения пользователя, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иголки и шприцы.

Понятно, что любое из вышеприведенных изделий может включать иммуноконъюгат настоящего изобретения вместо антитела против R ГЭБ или помимо него.

Изделие необязательно, кроме того, включает листовку-вкладыш с инструкциями в отношении лечения неврологического нарушения у индивида, причем в инструкциях указывается на то, что лечение антителом, раскрытым здесь, применяется для лечения неврологического нарушения, и необязательно указывается на то, что это антитело характеризуется увеличенной доставкой через ГЭБ вследствие его низкой аффинности к R ГЭБ.

III. Примеры

В этом примере оценивали рецептор трансферрина (TfR), который опосредует перенос железа в головной мозг через посредство комплекса голотрансферрина (Skarlatos et al. Brain Res 683: 164-171 (1995)). Человеческое химерное антитело против рецептора трансферрина мыши (анти-TfR^A), которое не конкурирует с эндогенным трансферрином, связывающимся с TfR, сравнивали с человеческим контрольным IgG в эксперименте с использованием двух меток в отношении доставки в головной мозг мыши дикого типа. Однократную следовую дозу (приблизительно 50 мкг/кг) [¹³¹I]анти-TfR^A и контрольного [¹²⁵I]IgG вводили мышам дикого типа внутривенно, и определяли доставку в головной мозг через 5 мин, 0,5, 1, 4, 24, 48 и 72 ч. Значительное увеличение доставки [¹³¹I]анти-TfR^A в головной мозг, определяемой как процент введенной дозы на грамм головного мозга, отмечали во все моменты времени (фиг. 1A). В ее максимуме через 1 ч после введения отмечалось >11-кратное различие в аккумуляции [¹³¹I]анти-TfR^A в головном мозге по сравнению с контрольным [¹²⁵I]IgG (n=6). В случае совместного введения также немеченого анти-TfR^A (4 мг/кг веса тела) аккумуляция в головном мозге [¹³¹I]анти-TfR^A уменьшалась почти до уровня контрольного IgG, что указывает на специфическую, управляемую мишенью доставку.

Для оценки того, протекает ли значительная доставка в головной мозг антитела также на уровнях терапевтических доз, мышам дикого типа вводили внутривенно или анти-TfR^A, или контрольный IgG в дозе, равной 20 мг/кг. Концентрацию антитела человека в коре головного мозга и сыворотке определяли

через 1 и 24 ч после введения, используя сэндвич-ELISA Fc человека. Вкратце, после указанного периода времени от введения мышам вводили D-PBS путем его инъекции в кровеносные сосуды со скоростью, составляющей 2 мл/мин, в течение 8 мин. Головные мозги извлекали и кору головного мозга и гиппокамп отделяли, гомогенизировали в 1% NP-40 (Cal-Biochem) в PBS, содержащем таблетки полного миникоктейля ингибиторов протеаз без EDTA (Roche Diagnostics). Гомогенизированные образцы головного мозга перемешивали вращательным движением при 4°C в течение 1 ч до центрифугирования при 14000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант отделяли для измерения антитела в головном мозге. Цельную кровь отбирали до перфузии в пробирки-микрочтейнеры для отделения сыворотки (BD Diagnostics), допускали свертывание в течение по крайней мере 30 мин и центрифугировали при 5000×g в течение 90 с. Супернатант отделяли для измерений антитела в сыворотке. Концентрации антитела в образцах сыворотки и головного мозга мыши определяли с помощью ELISA. 384-Луночные Maxisorp иммунопланшеты NUNC (Neptune, NJ) покрывали F(ab')₂-фрагментом ослиного поликлонального антитела против IgG человека, специфического для Fc-фрагмента, (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) в течение ночи при 4°C. Планшеты блокировали PBS, содержащим 0,5% BSA, в течение 1 ч при 25°C. Каждое антитело использовали в качестве внутреннего стандарта для определения концентрации соответствующего антитела. Планшеты промывали PBS, содержащим 0,05% Tween-20, используя промыватель для микропланшетов (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). Стандарты и образцы разводили в PBS, содержащем 0,5% BSA, 0,35 M NaCl, 0,25% CHAPS, 5 mM EDTA, 0,05% Tween-20 и 15 ч./млн. Proclin, и добавляли в микропланшеты на два часа при 25°C. Связанное антитело выявляли с использованием конъюгированного с пероксидазой хрена F(ab')₂ козьего поликлонального антитела против IgG человека, специфического для Fc, (Jackson ImmunoResearch), окраску развивали, используя 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) (KPL, Inc., Gaithersburg, MD), и оптическую плотность измеряли при 450 нм в считывающем устройстве Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Hudson, NH). Концентрации определяли, исходя из стандартной кривой, используя программу линейной регрессии с использованием четырех параметров. Анализ имел значения для нижнего предела количественного определения (LLOQ), составляющие 3,12 нг/мл в сыворотке и 15,6 нг/г в головном мозге. Статистический анализ различий между экспериментальными группами выполняли, используя двусторонний критерий Стьюдента для одной выборки.

По сравнению с контрольным IgG концентрация анти-TfR^A была значимо выше в головном мозге через 24 ч после введения антитела (фиг. 1B, p=0,0002, n=10). Кроме того, концентрация IgG человека в головном мозге была в >2,5 раз выше таковой в сыворотке для анти-TfR^A по сравнению с контрольным IgG через 24 ч (фиг. 1C, p=0,003, n=10). Вместе с данными, касающимися следов радиоактивной метки, эти результаты указывают на то, что системно вводимое анти-TfR^A может накапливаться в головном мозге, однако оставалось узнать о распределении антитела в ткани головного мозга.

Для изучения распределения системно вводимых антител в головном мозге мышам дикого типа внутривенно вводили 20 мг/кг или анти-TfR^A, или контрольного IgG, вводили PBS путем его инъекции в кровеносные сосуды для вымывания любого остающегося циркулирующего антитела, и срезы головного мозга окрашивали флуоресцентным вторым антителом против IgG человека для определения локализации антитела. Спустя 1 ч циркуляции анти-TfR^A имело ясно выраженное внутрисосудистое распределение, на что указывала его солокализация с маркером базальной мембраны - антиколлаген IV (фиг. 1D, левая колонка). Хотя с меньшей степенью выраженности, контрольный IgG также локализовался в сосудистой сети, что означает, что спустя 1 ч воздействия уровни терапевтической дозы системно введенного IgG сохраняют внутрисосудистое размещение (фиг. 1E, левая колонка). Однако отмечалось заметное различие в локализации антитела через 24 ч после введения. Размещение анти-TfR^A дольше не было только внутрисосудистым, а вместо этого продемонстрировало умеренное окрашивание паренхимы (фиг. 1D, правые колонки). В отличие от этого, антитело в виде контрольного IgG почти совершенно отсутствовало в ткани головного мозга спустя 24 ч после введения (фиг. 1E, правые колонки). Эти результаты указывают на то, что после введения доз на терапевтически соответствующих уровнях анти-TfR^A может проходить сквозь ГЭБ, доказательством чего служило умеренное окрашивание паренхимы, однако большая часть аккумулируемого в головном мозге антитела в значительной степени локализовалась в эндотелиальных клетках ГЭБ.

Для аккумуляции в паренхиме необходимо связывание с TfR, представленными на поверхности эндотелиальных клеток головного мозга, а также диссоциация от рецептора после RMT. Без ограничения какой-либо теорией, была выдвинута гипотеза, что уменьшенная аффинность к TfR может способствовать диссоциации после RMT и сделать возможной увеличенную аккумуляцию в паренхиме. Кроме того, антитело против TfR с уменьшенной аффинностью, возможно, будет менее эффективно захватываться и переноситься в среде с ограничением концентрации, такой как головной мозг, в котором концентрации антитела против TfR являются низкими. Однако в клинических условиях уровни в сыворотке терапевтического средства на основе антитела против TfR, возможно, будут все еще достаточно высокими для сохранения насыщения рецептора в просвете сосудов.

Для проверки этого предсказания были созданы варианты анти-TfR^A, у которых варьирует аффинность связывания с TfR. Эти варианты были проверены в анализе ELISA конкуренции (фиг. 2A); анти-

TfR^A обладало наибольшей аффинностью к TfR и наименьшей IC₅₀ из исследованных антител, и каждое из анти-TfR^{B,C,D} имело постепенно меньшую аффинность и большую IC₅₀. Позже вариант анти-TfR^E был создан и проверен в том же анализе наряду с вариантами анти-TfR^{A,B,C,D}; как продемонстрировано на фиг. 2А, он был значительно менее способным к конкуренции за связывание с TfR, чем любое из других исследованных антител против TfR, и он характеризовался соответствующим высоким значением IC₅₀ (табл. 2).

Таблица 2

Определения IC ₅₀ для антител против TfR		
Антитело	IC ₅₀ (нМ)	Среднеквадратическое отклонение
Анти-TfR ^A	1,7	0,1
Анти-TfR ^B	6,9	0,4
Анти-TfR ^C	65	12
Анти-TfR ^D	111	16
Анти-TfR ^E	>5×10 ⁴	-

Эти варианты были проверены как в условиях ненасыщения TfR (введение следовой дозы), так и в условиях насыщения TfR (введение терапевтической дозы). Следовые уровни [¹²⁵I]анти-TfR^A, [¹²⁵I]анти-TfR^B, [¹²⁵I]анти-TfR^C, [¹²⁵I]анти-TfR^D и [¹²⁵I]анти-TfR^E (аффинность которых к TfR варьирует, при этом аффинность анти-TfR^A > аффинности анти-TfR^B > аффинности анти-TfR^C > аффинности анти-TfR^D > аффинности анти-TfR^E) вводили внутривенно мышам, и доставку в головной мозг определяли через 1, 4 или 24 ч после введения. Этот анализ, результаты которого представлены на фиг. 2В, сначала был выполнен с использованием [¹²⁵I]анти-TfR^A, [¹²⁵I]анти-TfR^B, [¹²⁵I]анти-TfR^C и [¹²⁵I]анти-TfR^D, а позже был повторен после создания [¹²⁵I]анти-TfR^E. В соответствии с предложенной моделью следовые уровни доз антител против TfR с более низкой аффинностью приводили к меньшей доставке в головной мозг по сравнению с вариантами с более высокой аффинностью (фиг. 2В). Однако, в явном отличии от введения следовых доз, введение тех же самых вариантов с более низкой аффинностью на терапевтических уровнях (20 мг/кг, в соответствии с оценкой через 1 и 24 ч) продемонстрировало увеличенную доставку в головной мозг через 24 ч, когда аффинность была пониженной, в то время как значимое различие в доставке не отмечалось через 1 ч (фиг. 2С). Эти данные служат подтверждением гипотезы, что антитела, подвергаемые RMT, с более низкой аффинностью будут демонстрировать уменьшенный перенос при лимитирующих концентрациях, в то время как перенос при насыщающих концентрациях будет неизменным.

Соответственно, предлагается следующая модель: по сравнению с антителом с высокой аффинностью меньшее количество антител с низкой аффинностью связывается с рецепторами со стороны просвета сосудистой сети при ненасыщающих концентрациях, приводя к меньшему поглощению эндотелием (фиг. 2D, левые панели). В более высокой терапевтической дозе, однако, люминальные рецепторы будут насыщенными независимо от аффинности, приводя к схожему поглощению эндотелием (фиг. 2D, правые панели). В этих условиях подвергаемые RMT антитела с более низкой аффинностью могут достичь большей аккумуляции в головном мозге в результате 1) максимизации диссоциации от мишени RMT, что способствует выбросу в головной мозг, и 2) уменьшения вероятности оттока из головного мозга, поскольку концентрации являются ограниченными с паренхимной стороны ГЭБ. Таким образом, в терапевтических условиях антитело с более низкой аффинностью к мишени RMT является, как ни удивительно, преимущественным в отношении аккумуляции в паренхиме.

Для определения локализации этих вариантов, демонстрирующих увеличенную доставку в головной мозг, мышам внутривенно вводили дозы, равные 20 мг/кг, или анти-TfR^A с высокой аффинностью, или вариантов анти-TfR^{B,C,D} с более низкими аффинностями. Через 24 ч животным вводили PBS путем его инъекции в кровеносные сосуды, и срезы головного мозга соокрашивали на предмет IgG человека и маркера нейронов NeuN (фиг. 2Е). Как отмечалось ранее, у животных, подвергнутых лечению анти-TfR^A с высокой аффинностью, наблюдалось, главным образом, сосудистое окрашивание с низкими уровнями паренхимного сигнала (фиг. 2Е, верхний ряд). Однако в случае TfR^{B,C,D} с более низкой аффинностью наблюдалось значительно более выраженное клеточное окрашивание, не отображающее кровеносные сосуды коры головного мозга (фиг. 2Е, данные для анти-TfR^{B,C,D}). Кроме того, солокализованное окрашивание NeuN указывало на перераспределение антитела из сосудистой сети в нейроны. Это является особенно выраженным на репрезентативном изображении варианта анти-TfR^D с большим увеличением (фиг. 2F). Вместе с данными, касающимися доставки в головной мозг, эти результаты указывают на то, что значительно большая аккумуляция антитела в головном мозге может быть достигнута при понижении аффинности анти-TfR к TfR, и что антитела с более низкой аффинностью, такие как анти-TfR^D, селективно размещаются в нейронах.

Перенос антител против TfR через ГЭБ был, кроме того, установлен после оценки биспецифического антитела (анти-TfR^A/BACE1), которое связывает как TfR, так расщепляющий белок-предшественник

амилоида (APP) фермент, бета-секретазу (BACE1) (фиг. 3А). Анти-TfR^A с высокой аффинностью было использовано для создания TfR-связывающего плеча биспецифического антитела, используя стандартную технологию создания биспецифического антитела - "выступа-во-впадину" (см., например, Ridgway et al., Protein Eng. (1996) 9(7): 617-621). Помимо мутаций в Fc для создания выступа (для анти-BACE1) и впадины (для анти-TfR), анти-TfR плечо антитела включало мутацию в Fc-области, которая аннулировала гликозилирование (N297G). Половины антител в виде выступа и впадины были очищены по отдельности и гибрированы с созданием негликозилированного биспецифического IgG *in vitro*. Аффинность связывания анти-TfR^A/BACE1 с TfR была значительно уменьшенной по сравнению с родительским анти-TfR^A вследствие утраты двухвалентного связывания (фиг. 3В). BACE1 экспрессируется в основном в нейронах ЦНС и, как считают, является основным участником образования бета-амилоида (A β ₁₋₄₀) через расщепление APP (Vassar et al., Science 286: 735-741 (1999)). Антитело против BACE1 было описано как эффективное средство для ингибирования активности BACE1, и может уменьшить продукцию A β ₁₋₄₀ *in vivo*. Ингибирование BACE1 с помощью анти-TfR/BACE1 было проверено в линии клеток НЕК293, стабильно экспрессирующих APP. По сравнению с антителом против BACE1 биспецифическое антитело обладало схожей и эффективностью, и активностью в ингибировании продукции A β ₁₋₄₀, что говорит о том, что антитело против TfR/BACE1 является полностью функциональным ингибитором в виде большой молекулы активности BACE1 (фиг. 3С). Основываясь на этой модели, можно было бы ожидать, что это биспецифическое антитело с более низкой аффинностью будет более подходящим кандидатом для увеличенной доставки по сравнению с антителом против только TfR. Для исследования аккумуляции биспецифического антитела в головном мозге следовые дозы [¹²⁵I]анти-TfR^A/BACE1 сравнивали с [¹²⁵I]анти-TfR^A и [¹²⁵I]анти-BACE1, и доставку в головной мозг оценивали через 30 мин, 6, 24 и 48 ч после внутривенного введения. Значительно большая доставка в головной мозг отмечалась при использовании [¹²⁵I]анти-TfR/BACE1, чем [¹²⁵I]анти-BACE1 во все моменты времени (фиг. 3D, n=4). В соответствии с гипотезой, связанной с аффинностью, доставка в головной мозг этой не насыщающей следовой дозы [¹²⁵I]анти-TfR^A была намного выше таковой [¹²⁵I]анти-TfR^A/BACE1 с меньшей аффинностью. Для оценки аккумуляции антитела на уровнях терапевтических доз мышам внутривенно вводили анти-TfR^A/BACE1 или анти-BACE1 в дозе, равной 20 мг/кг, и доставку в головной мозг антитела определяли спустя 1, 12, 24 и 48 ч. По сравнению с моноспецифическим антителом против BACE1 введение биспецифического анти-TfR^A/BACE1 приводило к значительно большей доставке в головной мозг во все моменты времени (фиг. 3Е). Как предсказывалось в соответствии с моделью, связанной с аффинностью, степень доставки была значительно выше, чем в случае антитела против только TfR (анти-TfR^A) с более высокой аффинностью (сравните фиг. 3Е с 1В). Максимальная аккумуляция была достигнута через 24 ч после введения, достигая концентраций, составляющих ~20 нМ, и оставалась увеличенной через 48 ч после введения, несмотря на то, что периферические уровни антитела уменьшались до ~12% его концентрации через 1 ч. Увеличенная доставка с помощью биспецифического антитела ярко видна при сравнении среднего процента антитела в головном мозге в сравнении с сывороткой (фиг. 3F).

Для определения локализации анти-TfR^A/BACE1 после системного введения мышам вводили PBS путем его инъекции в кровеносные сосуды через 24 ч после введения, и распределение антитела визуализировали с помощью флуоресцентного второго антитела против антитела человека (фиг. 3G). Подобно локализации антитела против TfR с более низкой аффинностью, отмечалось существенное окрашивание паренхимы помимо окрашивания сосудов. Паренхимная солокализация вместе с NeuN указывала на то, что эти антитела локализуются в популяции нейронов. В отличие от этого, животные, которым вводили контрольный IgG, продемонстрировали полное отсутствие окрашивания и сосудов, и паренхимы. Вместе эти данные указывают на то, что биспецифическое анти-TfR^A/BACE1 пересекает ГЭБ и может накапливаться в значительной степени в паренхиме головного мозга.

Для оценки эффективности анти-TfR^A/BACE1 в отношении продукции A β ₁₋₄₀ *in vivo* мышам дикого типа вводили однократную, составляющую 25 мг/кг или 50 мг/кг дозу контрольного IgG, анти-BACE1 или анти-TfR/BACE1. Основываясь на наблюдении, что доставка антитела в головной мозг достигает максимума через 24 ч после введения (см. фиг. 3Е), уровни A β ₁₋₄₀ в головном мозге и плазме определяли через 24 и 48 ч после внутривенного введения антитела. В дозе, равной 25 мг/кг, анти-TfR^A/BACE1 было способно к значительному уменьшению уровней A β ₁₋₄₀ в головном мозге по сравнению с контрольным IgG и через 24 (p=0,001, n=10), и через 48 (p=0,0003, n=10) ч после введения, в то время как анти-BACE1 не оказывало эффект на уменьшение A β ₁₋₄₀ (фиг. 4А). В дозе, равной 50 мг/кг, анти-TfR^A/BACE1 оказывало даже более существенный эффект на уменьшение A β ₁₋₄₀ в головном мозге в оба момента времени по сравнению с контрольным IgG (фиг. 3В, p<0,0001, n=10 и для 24 ч, и для 48 ч). Введение анти-BACE1 в этой дозе также значительно уменьшало уровни A β ₁₋₄₀ в головном мозге по сравнению с контролем (p<0,0001, n=10 для 24 ч; p=0,006, n=10 для 48 ч), хотя в значительно меньшей степени, чем в случае биспецифического анти-TfR^A/BACE1 (p<0,0001, n=10 для и 24 ч, и для 48 ч). А именно, способность биспецифического антитела к уменьшению A β ₁₋₄₀ была в 2-3 раза выше таковой анти-BACE1 во все определенные моменты времени и во всех дозах. Максимальный эффект анти-TfR^A/BACE1 был достигнут через 48 ч после введения в дозе, равной 50 мг/кг, с составляющим 50,0 ± 1,9% уменьшением A β ₁₋₄₀ в

головном мозге по сравнению с контрольным IgG (фиг. 4E). Значительные уменьшения периферического $A\beta_{1-40}$ также отмечались в обеих дозах и в оба момента времени в случае анти-TfR^A/BACE1 (фиг. 4C-D). Лечение антителом против BACE1 вызывало уменьшение периферического $A\beta_{1-40}$ только в момент времени = 24 ч ($p=0,01$ в случае 25 мг/кг, $p=0,002$ в случае 50 мг/кг; $n=10$ в каждом случае). Эти данные служат подтверждением того, что антитела, созданные для пересечения ГЭБ, могут быть фармакодинамически эффективными. Кроме того, увеличение проникновения в головной мозг биспецифического антитела делает его более сильным лекарственным средством - ингибитором BACE1 в результате значительного уменьшения уровней $A\beta_{1-40}$ в головном мозге.

Однако в терапевтических дозах, составляющих 20 мг/кг, проникаемость ГЭБ и поступление в несосудистые части ЦНС были увеличенными у животных, подвергаемых лечению анти-TfR^E, по сравнению с животными, подвергаемыми лечению анти-TfR^A или анти-TfR^D (фиг. 8B). А именно, анти-TfR^D достигало более высокой первоначальной концентрации в головном мозге, которая неуклонно уменьшалась после дня 2; анти-TfR^E, с другой стороны, сохраняло постоянно высокий уровень воздействия на головной мозг в течение исследованного 8-дневного периода. Вместе с этим, концентрация анти-TfR^E в сыворотке уменьшалась меньше всего из всех антител против TfR в течение оцениваемого периода (фиг. 8A). В общем, эти данные указывают на то, что, как правило, более низкая аффинность к TfR, как ни удивительно, уменьшает клиренс из сыворотки и увеличивает воздействие на головной мозг, но в некотором пороговом значении более низкая аффинность начинает уменьшать максимальное воздействие на головной мозг, достигаемое с использованием этого антитела. В этом примере оптимальное значение, по-видимому, будет находиться между аффинностями антител анти-TfR^D и анти-TfR^E к рецептору трансферрина.

Важно, что эти данные выдвигают на первый план несколько причинных механизмов, обуславливающих увеличенную доставку антитела в ЦНС, используя подход с использованием антитела с более низкой аффинностью. Во-первых, обладающие высокой аффинностью антитела против TfR (например, анти-TfR^A, фиг. 1D) ограничивают доставку в головной мозг в результате быстрого насыщения TfR в сосудистой сети головного мозга, уменьшая, таким образом, общее количество антитела, доставляемого в головной мозг, а также ограничивая его распределение в сосудистой сети. Поразительно, что уменьшение аффинности (например, анти-TfR^{B-E} и анти-TfR^{A,D,E}/BACE1, фиг. 2C, 2E, 2F, 3E-G и 9C) увеличивает доставку в головной мозг и распределение в нем, при этом сильный сдвиг в локализации отмечается от сосудистой сети к нейронам и связанному с ними нейропиллю. Во-вторых, более низкая аффинность антитела к TfR, как предполагают, уменьшает способность антитела к возврату на сосудистую сторону ГЭБ через посредство TfR с ЦНС-стороны мембраны, поскольку общая аффинность антитела к TfR является низкой, а локальная концентрация антитела с ЦНС-стороны ГЭБ является ненасыщающей вследствие быстрого рассредоточения антитела в компартменте ЦНС (см., например, фиг. 1D, 2E и 2F). В-третьих, *in vivo* антитела с меньшей аффинностью к TfR не подвергаются клиренсу из системы столь эффективно, как антитела с большей аффинностью к TfR (см. фиг. 8A и 9B), и, соответственно, остаются в больших концентрациях в циркуляции, чем их аналоги с большей аффинностью. Это является преимущественным, поскольку уровни циркулирующего антитела с более низкой аффинностью поддерживаются на терапевтических уровнях в течение большего периода времени, чем антитела с более высокой аффинностью, вследствие чего увеличивается доставка антитела в головной мозг в течение большего периода времени (сравните анти-TfR^A/BACE1 с анти-TfR^D/BACE1 на фиг. 9C). Кроме того, это увеличение нахождения и в плазме, и в головном мозге может уменьшить частоту введения доз в клинике, что будет, возможно, полезным не только для соблюдения больным режима и схемы лечения и удобства, но также в уменьшении любых возможных побочных эффектов или нецелевых эффектов антитела и/или терапевтического соединения, связанного с ним.

Были выполнены дальнейшие исследования для определения того, может ли дальнейшее уменьшение аффинности биспецифического анти-TfR^A/BACE1 увеличить дополнительно его проникаемость через ГЭБ и паренхимную проникаемость. Были созданы два дополнительных биспецифических антитела: анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1, используя ту же методологию создания, которая использовалась для создания анти-TfR^A/BACE1. Анализы ELISA конкуренции были выполнены (фиг. 9A), и результирующие IC₅₀ были следующими.

Таблица 3
Измерения IC₅₀/аффинности антител против TfR/BACE1

Антитело	IC ₅₀	Kd (Biacore) (нМ)
Анти-TfR ^A /BACE1	15 нМ	33,3±1,7
Анти-TfR ^D /BACE1	1,6 мкМ	630±50
Анти-TfR ^E /BACE1	>50 мкМ	не определено

Измерения Kd с использованием поверхностного плазмонного резонанса были также выполнены для связывания между каждым биспецифическим антителом и TfR. Представленный в табл. 3 анализ с использованием BIACORE® был выполнен, как описано ниже. Kd определяли, используя анализы с ис-

пользованием поверхностного плазмонного резонанса, используя BIACORE®-T-100 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), при 25°C, используя захват с помощью Ат с пента-His (Qiagen, Valencia, CA). Вкратце, биосенсорные чипы со слоем, модифицированным карбоксиметилированным декстраном, (CM5, BIACORE, Inc.) активировали с использованием N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида гидрохлорида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антитело с пента-His разводили 100 мМ ацетатом натрия, pH 4,0, до 50 мкг/мл до инъекции со скоростью потока, составляющей 5 мкл/мин, для достижения приблизительно 10000 единиц ответа (ЕО) связанного белка. После инъекции антитела инъецировали 1 М этаноламин для блокирования не вступивших в реакцию групп. Для кинетических измерений MuTfR-His инъецировали в HBS-P для достижения приблизительно 50 ЕО, затем двукратные последовательные разведения анти-TfR^A/BACE1 (от 1,95 нМ до 1000 нМ) или анти-TfR^D/BACE1 (от 9,75 нМ до 5000 нМ) инъецировали в HBS-P при 25°C со скоростью потока, составляющей приблизительно 30 мкл/мин. Константы ассоциации (k_{on}) и константы диссоциации (k_{off}) рассчитывали, используя простую модель связывания в отношении один к одному Лэнгмюра (версию 3.2 программного обеспечения для оценки BIACORE®), посредством одновременной подгонки сенсограмм, соответствующих ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (Kd) рассчитывали как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999). Аффинность анти-TfR^E/BACE1 была слишком слабой, чтобы ее определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Как продемонстрировано на фиг. 9А и табл. 2 и 3, биспецифические анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^D/BACE1 связывались заметно хуже с TfR, чем соответствующие моноспецифические анти-TfR^A и анти-TfR^D (сравните фиг. 9А с фиг. 2А). В случае анти-TfR^E/BACE1 кривые неполного связывания для моноспецифических и моноспецифических антител также говорят о том, что биспецифическое анти-TfR^E/BACE1 характеризуется намного более высокой IC₅₀, чем соответствующее моноспецифическое анти-TfR^E.

Эти антитела были проверены в том же анализе *in vivo* продукции Aβ₁₋₄₀, который описан выше. Вкратце, мышам C57Bl/6 дикого типа возрастом 6-8 недель вводили внутривенно посредством инъекции в хвостовую вену однократную, составляющую 50 мг/кг дозу контрольного IgG, моноспецифического анти-BACE1, или биспецифического анти-TfR^A/BACE1, анти-TfR^D/BACE1 или анти-TfR^E/BACE1, 6 мышам в каждой группе лечением антителом в каждый момент времени, в общем количестве = 180 мышам, подвергнутым лечению. Уровни Aβ₁₋₄₀ в головном мозге и в плазме определяли через 1, 2, 4, 6, 8 и 10 дней после внутривенного введения антител (фиг. 9В-9Е). Концентрация биспецифических антител, обнаруженных в головном мозге (фиг. 9С) в самый ранний момент времени, была наибольшей в случае анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^D/BACE1, каждое в концентрации, превышающей в более чем в два раза концентрацию, достигаемую анти-TfR^E/BACE1 в момент времени = 1 дню. Однако уровни концентраций анти-TfR^A/BACE1 в головном мозге возвращались к контрольным уровням к дню 6, а уровни анти-TfR^D/BACE1 возвращались к контрольным уровням к дню 10. В отличие от этого, биспецифическое антитело с самой низкой аффинностью анти-TfR^E/BACE1 характеризовалось намного меньшим относительным снижением концентрации антитела в головном мозге по сравнению с анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^D/BACE1, в соответствии с предложенной моделью, что более низкая аффинность к TfR приводит к уменьшенной возможности антитела быть экспортированным из паренхимного пространства. Уровни Aβ₁₋₄₀ в головном мозге (фиг. 9Е) были уменьшенными в приблизительно той же доле, которая ожидалась в соответствии с отмечаемыми концентрациями биспецифического антитела в головном мозге: анти-TfR^A/BACE1 и анти-TfR^D/BACE1 схожим образом уменьшали уровни Aβ₁₋₄₀, отмечаемые в головном мозге, в самые ранние моменты времени (дни 1-2), которые или быстро увеличивались в последующие моменты времени (анти-TfR^A/BACE1), или более умеренно увеличивались в последующие моменты времени (анти-TfR^D/BACE1), в соответствии с отмечаемыми уменьшениями концентрации в головном мозге каждого из этих антител (фиг. 9С). Примечательно, что, хотя лечение анти-TfR^E/BACE1 приводило к относительно более умеренному уменьшению уровней Aβ₁₋₄₀ в головном мозге, чем в случае других биспецифических антител, это уменьшение было стойким в целом во все моменты времени (фиг. 9Е).

Измерения в плазме (фиг. 9В) показали, что полный клиренс анти-TfR^A/BACE1 происходил к дню 4, в то время как анти-TfR^D/BACE1 оставалось на относительно низких уровнях в целом во все моменты времени, а уровни анти-TfR^E/BACE1 оставались схожими с контролями в целом во все моменты времени. В соответствии с этим обнаружением, отмечаемые уровни Aβ₁₋₄₀ в плазме (фиг. 9D) были схожим образом уменьшенными по сравнению с контрольными уровнями анти-gD в целом во все моменты времени в случае каждого из анти-TfR^D/BACE1, анти-TfR^E/BACE1 и анти-BACE1. Анти-TfR^A/BACE1 продемонстрировало схожие уменьшения в моменты времени = 1, 2 и 4 дням, быстро возвращаясь к контрольным уровням в более поздние моменты времени, в соответствии с отмечаемым исчезновением антитела из плазмы.

Эти результаты снова указывают на то, что биспецифические антитела против TfR/BACE1 эффективно пересекают ГЭБ и ингибируют активность BACE1 в *in vivo* системе - у млекопитающего. Они также говорят о том, что аффинность к TfR между аффинностями анти-TfR^D/BACE1 и анти-TfR^E/BACE1

может обеспечить оптимальное сочетание проницаемости и активности в паренхиме/головном мозге. Однако следует отметить, что в случае каждой мишени в головном мозге эффективность плеча биспецифического антитела, специфического для этой мишени, будет определять, сколько специфического антитела против TfR/мишени должно присутствовать с ЦНС-стороны ГЭБ для достижения желаемых результатов, и, следовательно, какая степень аффинности анти-TfR к TfR должна использоваться в биспецифическом антителе для достижения этой концентрации. Этим изобретением обеспечивается способ определения и конструирования биспецифического антитела для достижения таких целевых уровней в ЦНС после введения с непривилегированной стороны ГЭБ.

Эти результаты были подтверждены и расширены, используя другое биспецифическое антитело против TfR, анти-TfR/A β , которое связывает как TfR, так и амилоид бета. Были приготовлены три биспецифических варианта: анти-TfR^A/A β , анти-TfR^D/A β и анти-TfR^E/A β , используя те же способы, которые использовались для приготовления биспецифического антитела против TfR/BACE1 выше. A β является основной составной частью амилоидных бляшек, которые, как полагают, вовлечены в развитие AD. Ингибирование образования бляшек посредством связывания и удаления A β , или в его свободном состоянии, или в олигомеризованном состоянии, может подавить развитие или прогрессирование AD. Были оценены фармакокинетические свойства каждого из этих биспецифических антител.

Однократную, составляющую 50 мг/кг дозу контрольного IgG, моноспецифического антитела против A β или каждого биспецифического антитела вводили внутривенно мышам C57BL/6J дикого типа возрастом 8-16 недель или мышам, экспрессирующим и пресенилин 2 человека, и белок-предшественник амилоида человека (PS2APP). Из-за ограниченного числа трансгенных животных только два биспецифических варианта (анти-TfR^D/A β и анти-TfR^E/A β) были исследованы на мышах PS2APP. В каждой группе лечения четырем-шести мышам-репликам вводили дозу. Мышей умерщвляли через 24 ч, и уровни лекарственных средств определяли и в головном мозге, и в плазме, как и в случае исследований биспецифического антитела против TfR/BACE1. До умерщвления кровь также отбирали через 6 ч после введения дозы для ранней оценки концентраций антител в плазме. Определения концентрации антитела в плазме (фиг. 10A и 11A) показали, что все антитела присутствуют на схожих уровнях через 6 ч после введения дозы. Однако уровни контрольного моноспецифического антитела против A β были уменьшенными по сравнению с контрольным IgG к 24 ч. Это соответствует прежним наблюдениям в отношении этой молекулы против A β . Через 24 ч анти-TfR^A/A β продемонстрировало схожие с анти-A β уровни на периферии, тогда как анти-TfR^D/A β и анти-TfR^E/A β продемонстрировали слегка повышенные уровни, промежуточные между анти-A β и контрольным IgG.

Концентрация биспецифических антител, обнаруживаемых в головном мозге, была увеличенной по сравнению и с контрольным IgG, и с анти-A β (фиг. 10B и 11B). По сравнению с анти-A β концентрация анти-TfR^A/A β была в 12 раз выше, концентрация анти-TfR^D/A β была в 8-15 раз выше, а концентрация анти-TfR^E/A β была в 4-5 раз выше. Увеличение доставки в головной мозг антител анти-TfR^{A,D,E}/A β по сравнению с анти-A β было даже больше увеличений, наблюдаемых для биспецифических антител анти-TfR^{A,D,E}/BACE1 по сравнению с анти-BACE1. Вероятно, это обусловлено уменьшенным периферическим нахождением анти-A β по сравнению с контрольным IgG через 24 ч после введения дозы, что приводит к более низким уровням анти-A β в головном мозге по сравнению с контрольным IgG.

Эти обнаружения являются первой демонстрацией того, что антитела - большие молекулы, вводимые в терапевтически соответствующих дозах, могут пересекать ГЭБ и порождать значительную и длительную доставку в головной мозг. Кроме того, эти результаты, демонстрирующие обратную связь между аффинностью антитела и степенью доставки в головной мозг, способствуют пониманию динамики RMT. Это новое понимание может применяться к множеству других потенциальных мишеней RMT для обеспечения более эффективной стратегии для доставки лекарственного средства на основе антитела в ЦНС. Кроме того, эти *in vivo* результаты указывают на то, что биспецифическое антитело может значительно увеличить эффективность многообещающего антиамилоидогенного терапевтического средства в результате значительного увеличения проникновения в головной мозг лекарственного средства на основе антитела против мишени. Это могло бы быть в высокой степени преимущественным, поскольку увеличенная доставка лекарственного средства, вероятно, будет претворяться в меньшие возможные побочные эффекты вследствие введения более низких терапевтических доз, которые будут требоваться. В общем, эта технология имеет огромный потенциал быть примененной к терапевтическим средствам для широкого ряда заболеваний ЦНС и представляет собой усовершенствованный подход для обеспечения безопасных лекарственных средств на основе антител.

Хотя вышеприведенное изобретение было описано довольно подробно в качестве иллюстрации и примера с целью четкости понимания, описания и примеры не должны рассматриваться как ограничение объема настоящего изобретения. Описания всей патентной и научной литературы, приведенной здесь, включены в словесной форме в их полном объеме посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ переноса соединения через гематоэнцефалический барьер, включающий введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с аффинностью от приблизительно 20 нМ до приблизительно 10 мкМ с рецептором гематоэнцефалического барьера (R ГЭБ), связанного с соединением, так что антитело переносит связанное с ним соединение через гематоэнцефалический барьер.

2. Способ лечения неврологического нарушения у млекопитающего, включающий введение млекопитающему антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с R ГЭБ, которое связано с соединением, предназначенным для лечения неврологического нарушения, причем антитело обладает аффинностью от приблизительно 20 нМ до приблизительно 10 мкМ к R ГЭБ.

3. Способ по п.1 или 2, в котором соединением является лекарственное средство против неврологического нарушения или визуализирующий агент.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не уменьшают связывание R ГЭБ с одним или более его природных лигандов.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором пациент представляет собой млекопитающее.

6. Способ по п.5, в котором млекопитающее страдает неврологическим нарушением.

7. Способ по п.6, в котором неврологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (AD), удара, деменции, мышечной дистрофии (MD), рассеянного склероза (MS), амиотрофического бокового склероза (ALS), муковисцидоза, синдрома Ангельмана, синдрома Лиддла, болезни Паркинсона, болезни Пика, болезни Педжета, рака и травматического повреждения головного мозга.

8. Способ по любому из пп.5-7, в котором млекопитающим является человек.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 100 нМ до приблизительно 10 мкМ.

10. Способ по любому из пп.1-8, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связанное с соединением, обладает аффинностью к R ГЭБ, составляющей от приблизительно 20 нМ до приблизительно 1 мкМ.

11. Способ по любому из пп.1-10, в котором R ГЭБ выбрано из группы, состоящей из рецептора трансферрина (TfR), рецептора инсулина, рецептора инсулиноподобного фактора роста (рецептора IGF), родственного рецепторам липопroteинов низкой плотности белка 8 (LRP8), родственного рецепторам липопroteинов низкой плотности белка 1 (LRP1) и связывающего с гепарином, подобного эпидермальному фактору роста фактора роста (HB-EGF).

12. Способ по п.11, в котором R ГЭБ является рецептор трансферрина.

13. Способ по п.12, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не ингибируют связывание TfR с трансферрином.

14. Способ по любому из пп.2-13, в котором связанное с соединением антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в терапевтической дозе.

15. Способ по п.14, в котором терапевтическая доза является R ГЭБ-насыщающей.

16. Способ по любому из пп.1-15, в котором антителом или его антигенсвязывающим фрагментом являются полиспецифическое антитело или его связывающий фрагмент, и соединение необязательно образует одну часть полиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

17. Способ по п.16, в котором полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном головного мозга.

18. Способ по п.17, в котором антиген головного мозга выбран из группы, состоящей из бета-секретазы 1 (BACE1), A β , рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), Тау, аполипoteина E4 (ApoE4), альфа-синуклеина, CD20, хантингтина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора 6 смерти (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина p75 (p75NTR) и каспазы 6.

19. Способ по п.17, в котором полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются как с TfR, так и с BACE1.

20. Способ по п.17, в котором полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются как с TfR, так и с A β .

21. Полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое включает первый антигенсвязывающий сайт, который связывается с R ГЭБ, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном головного мозга, где первый антигенсвязывающий сайт связывается с рецептором трансферрина (TfR) с аффинностью от приблизительно 20 нМ до приблизительно 10 мкМ, и где второй антигенсвязывающий сайт связывается с антигеном головного мозга, выбранным из бета-секретазы 1 (BACE1), A β , рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), Тау, аполипoteина E4 (ApoE4), альфа-синуклеина, CD20, хантингтина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина

1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора 6 смерти (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина р75 (р75NTR) и каспазы 6.

22. Полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.21, где антигеном головного мозга является BACE1.

23. Полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.21, где антигеном головного мозга является Аβ.

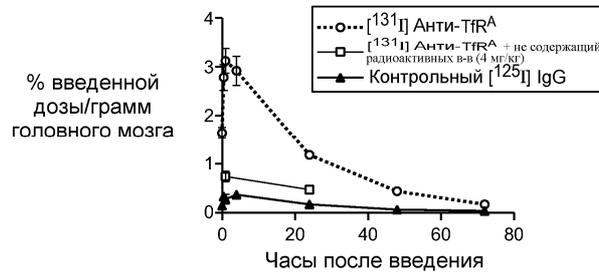
24. Полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.21-23, которые являются полноразмерным антителом или фрагментом антитела.

25. Полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.21-24, где аффинность первого антигенсвязывающего сайта для TfR составляет от приблизительно 20 нМ до приблизительно 1 мкМ.

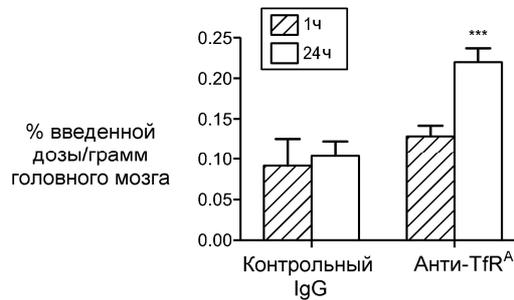
26. Полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.21-24, где аффинность первого антигенсвязывающего сайта для TfR составляет от приблизительно 100 нМ до приблизительно 10 мкМ.

27. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.21-26 для производства лекарственного средства для лечения неврологического нарушения.

28. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.21-26 для лечения неврологического нарушения.



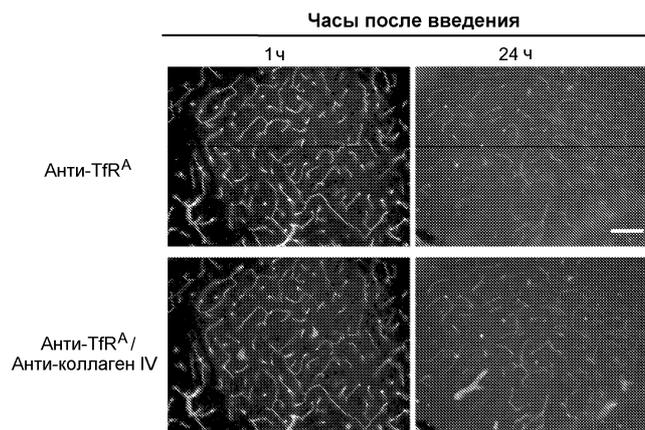
Фиг. 1А



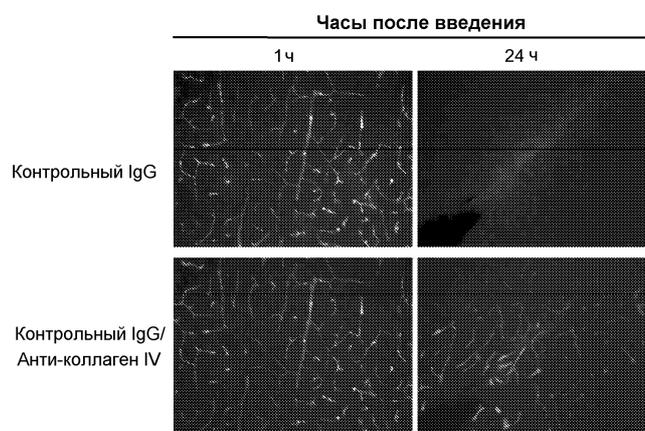
Фиг. 1В



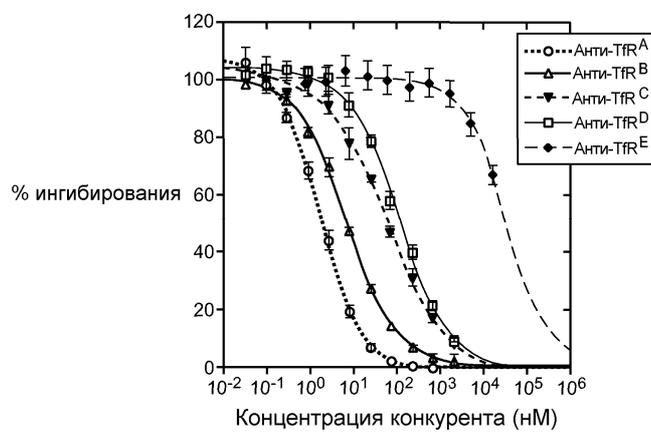
Фиг. 1С

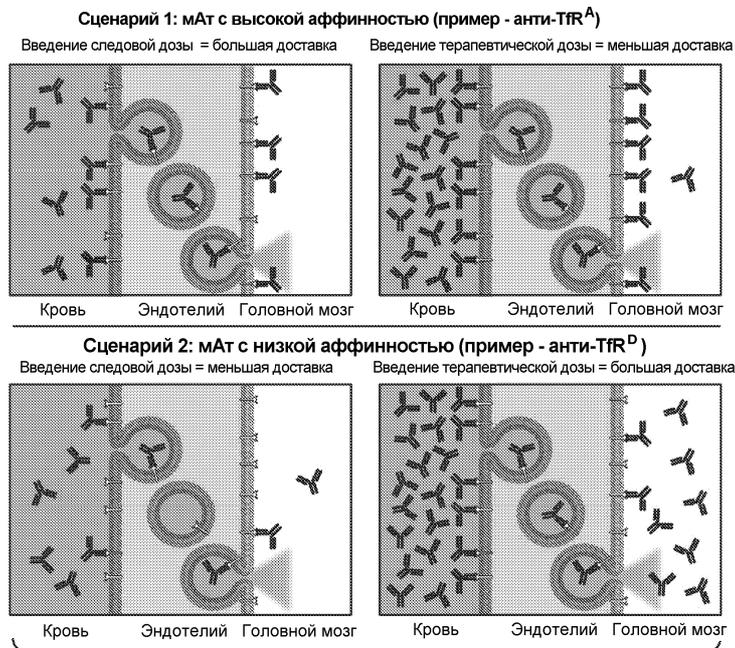
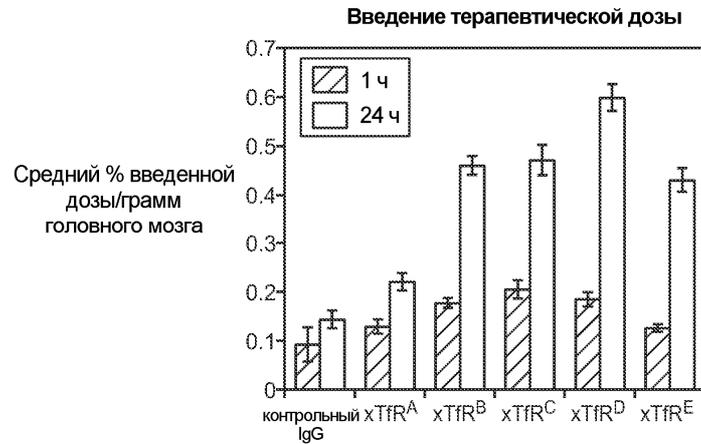
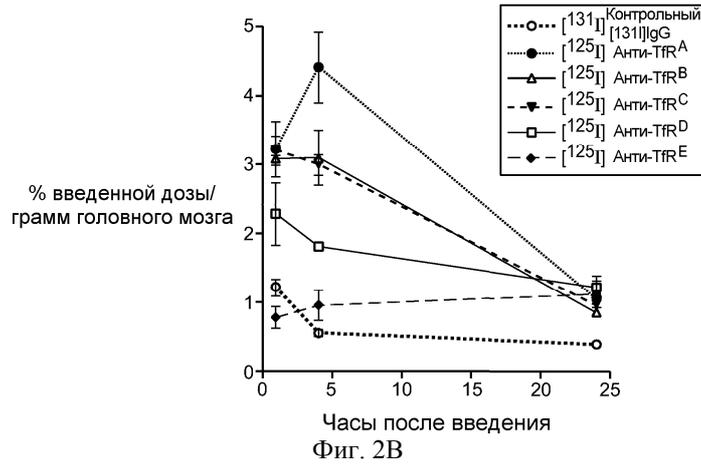


Фиг. 1D

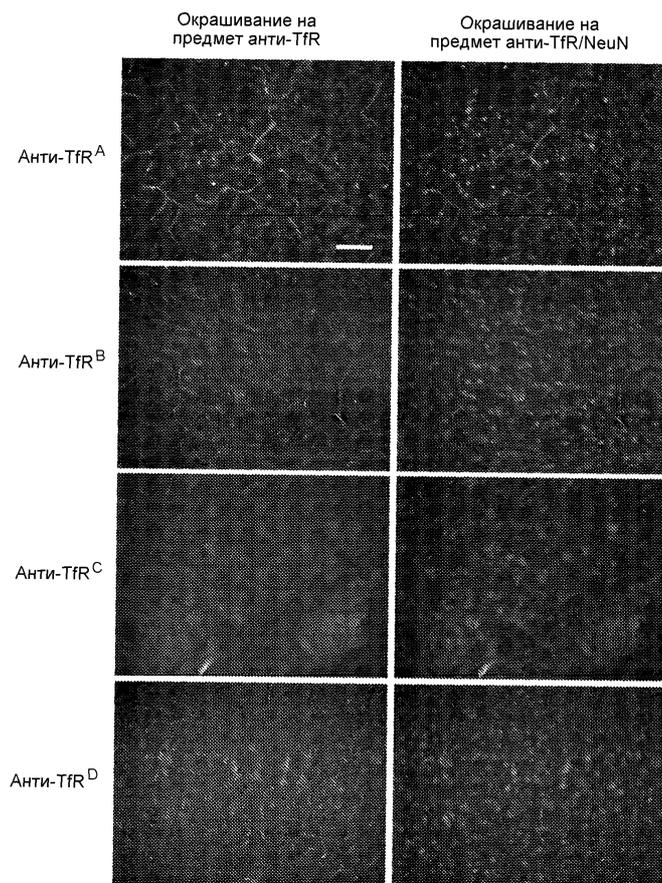


Фиг. 1E

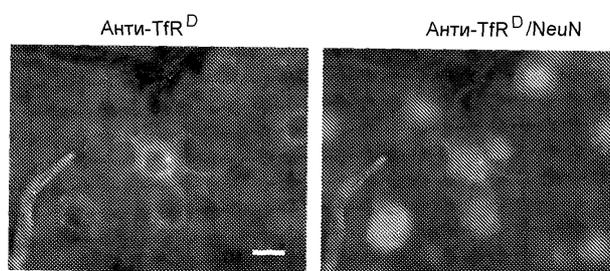




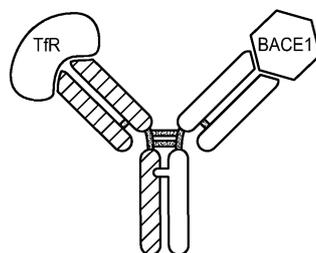
Фиг. 2D



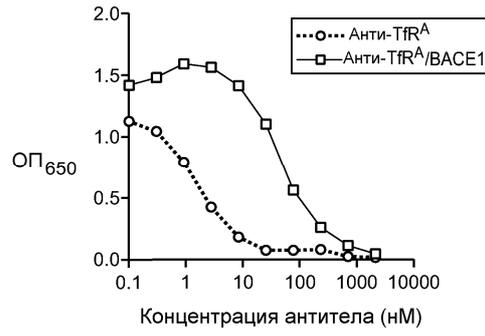
Фиг. 2Е



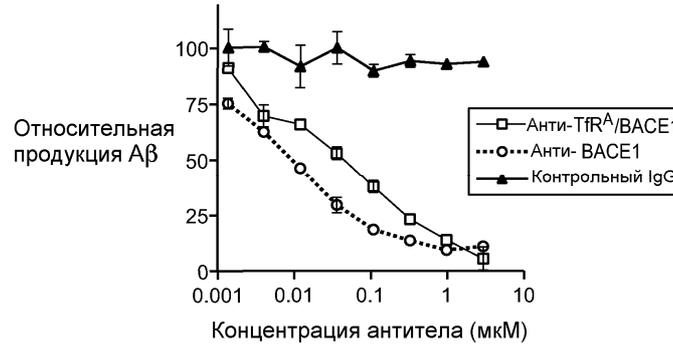
Фиг. 2F



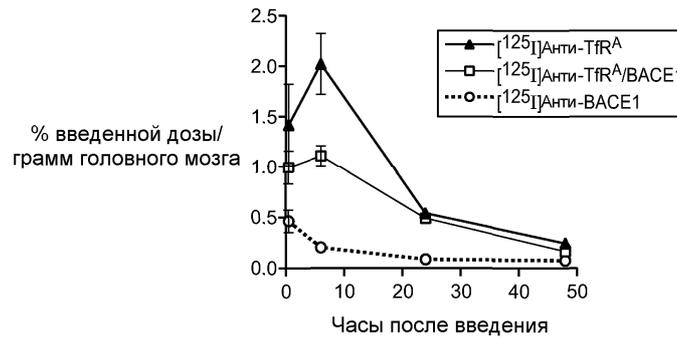
Фиг. 3А



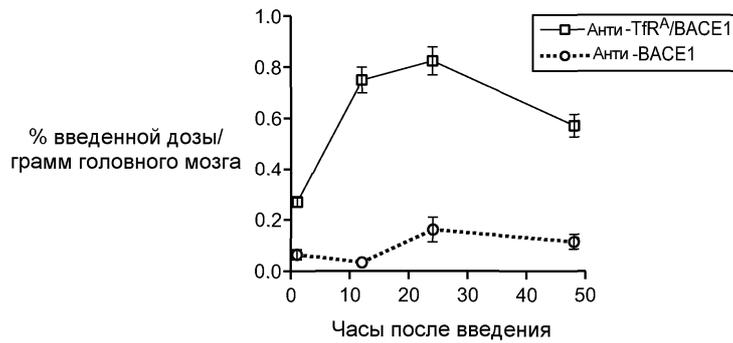
Фиг. 3В



Фиг. 3С

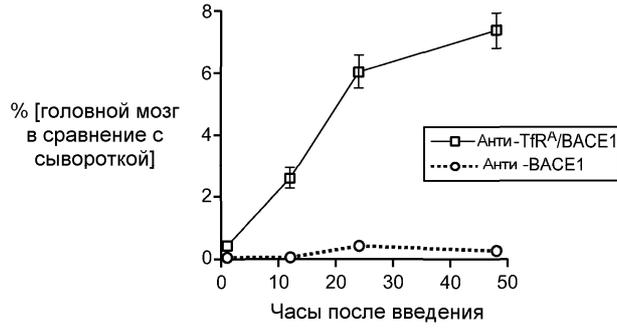


Фиг. 3D

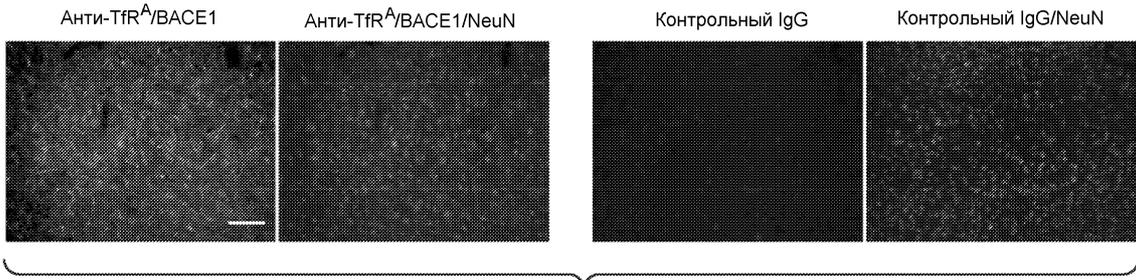


Фиг. 3Е

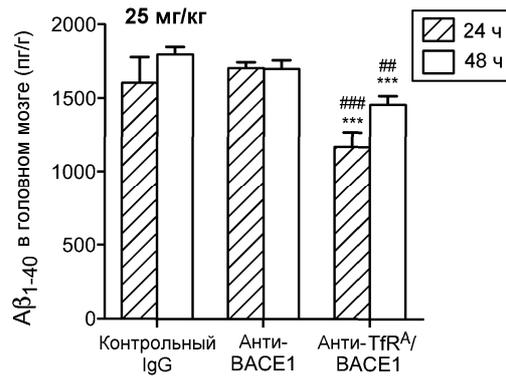
034333



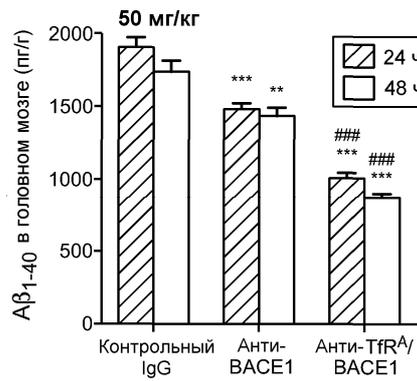
Фиг. 3F



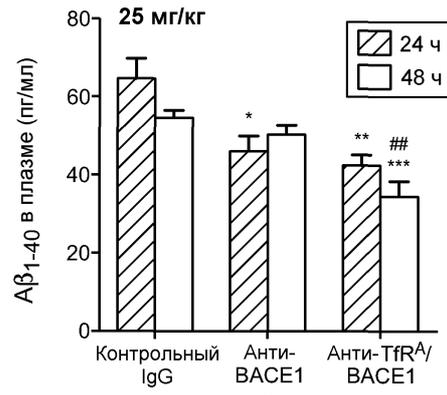
Фиг. 3G



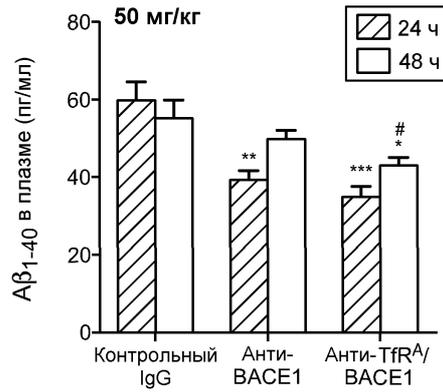
Фиг. 4A



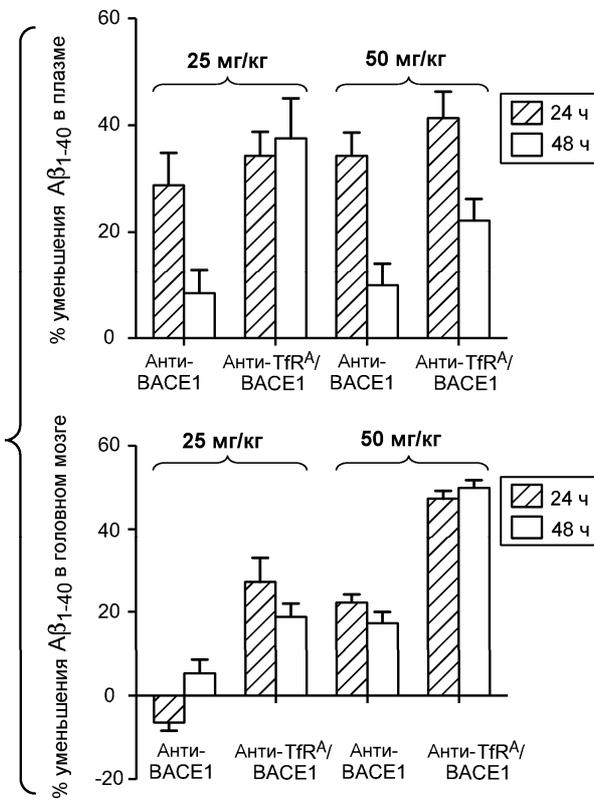
Фиг. 4B



Фиг. 4С



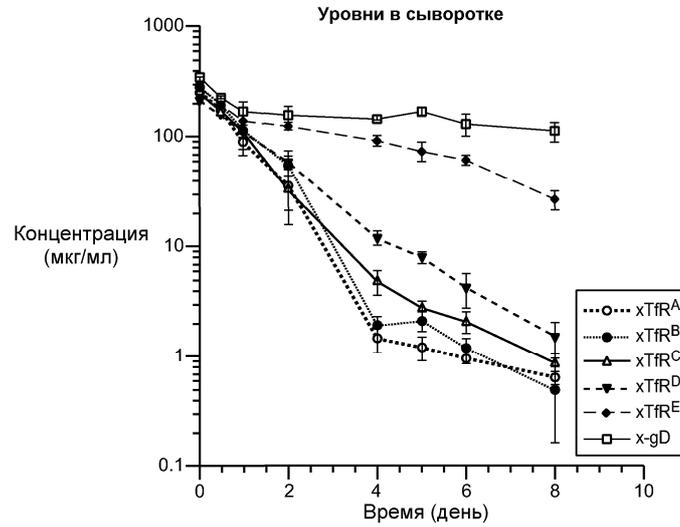
Фиг. 4D



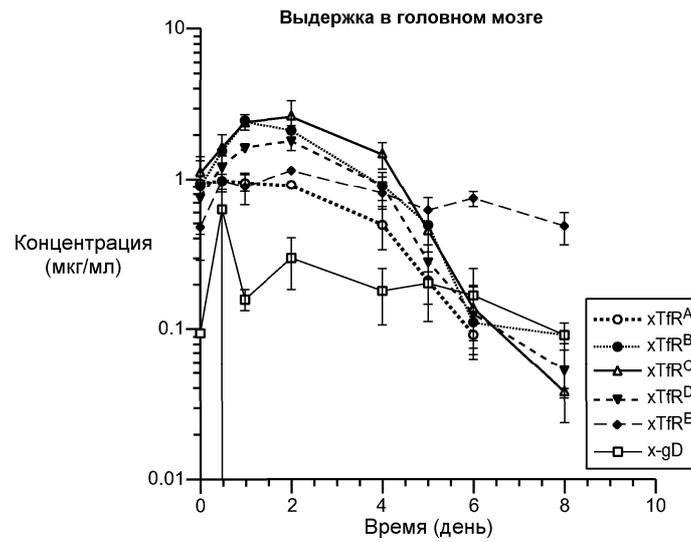
Фиг. 4E

1 DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV YSNGDTYLHW YLQKPGQSPQ
 51 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHVP
 101 WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
 151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
 201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 15)

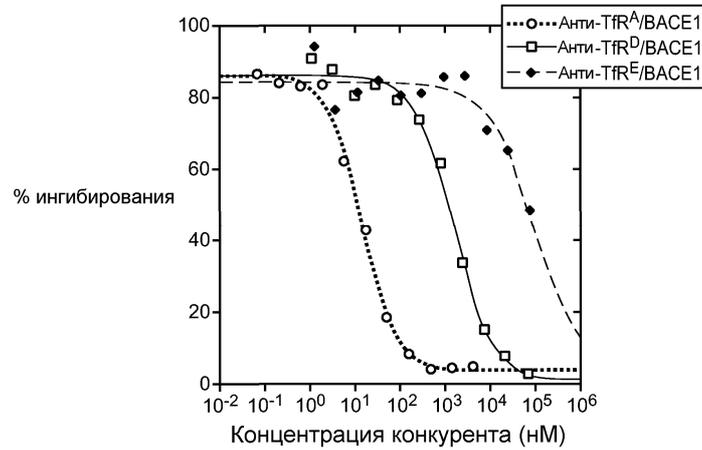
Фиг. 7B



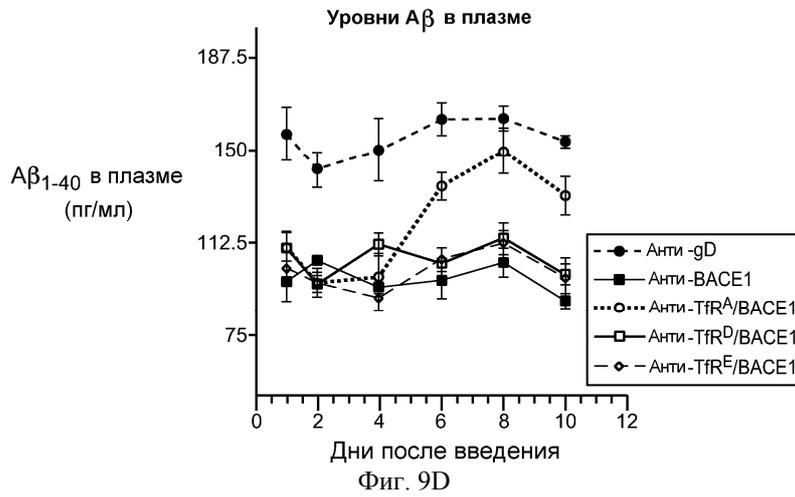
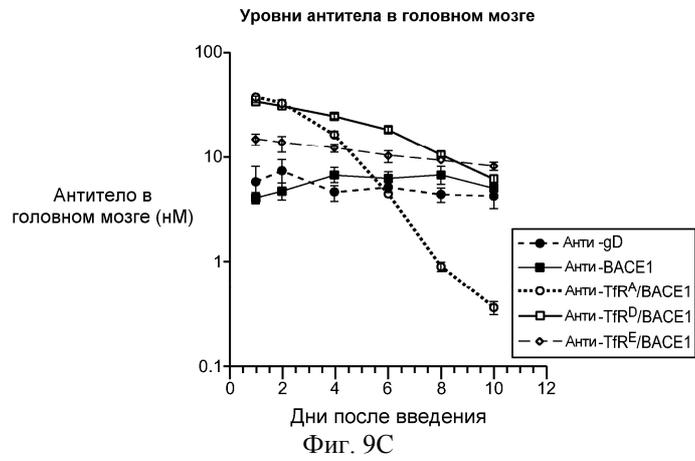
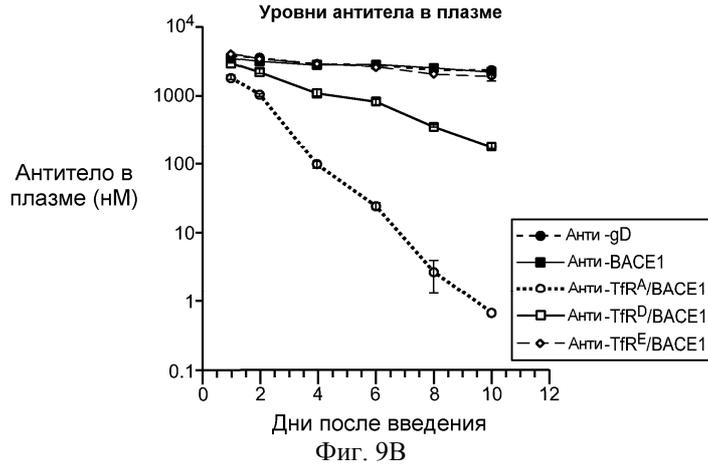
Фиг. 8А

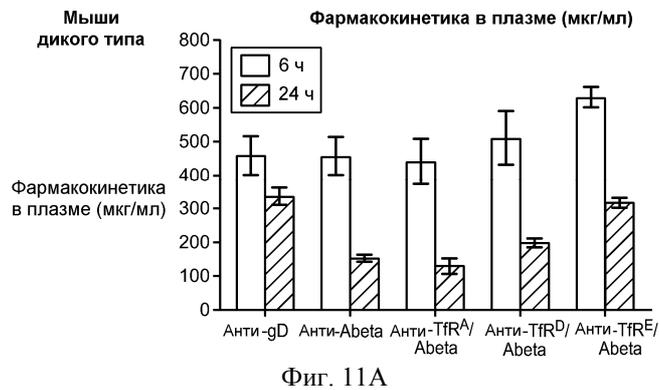
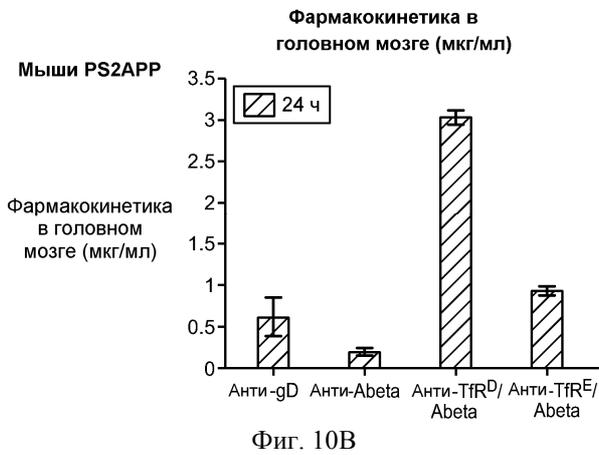
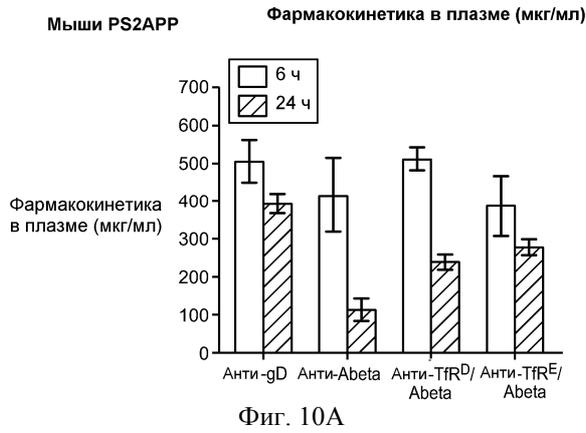
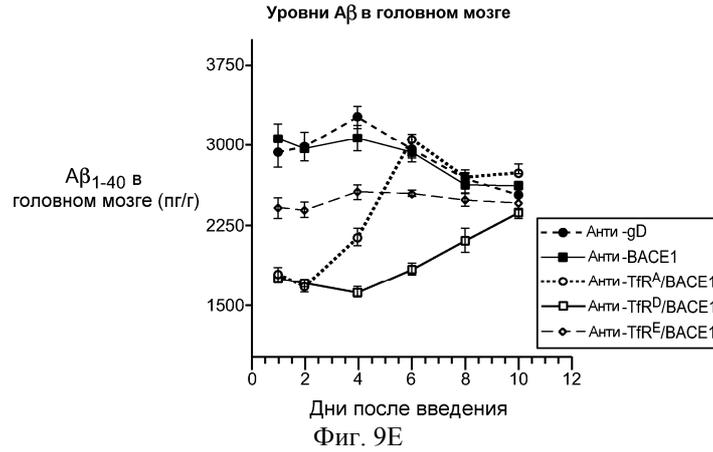


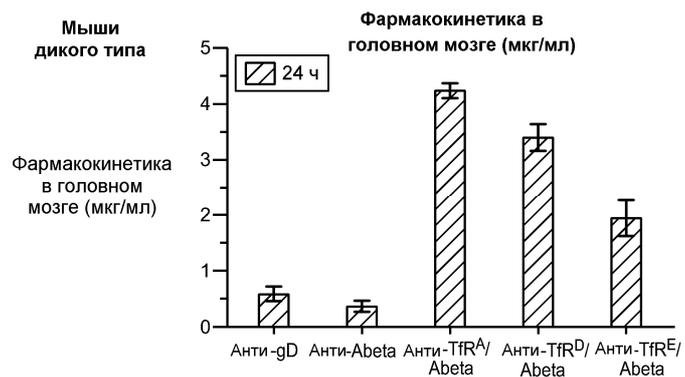
Фиг. 8B



Фиг. 9А







Фиг. 11В

