

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091816 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.26

(22) Дата подачи заявки
2019.02.05

(51) Int. Cl. C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 21/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)
C12N 9/40 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(54) СПОСОБ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА В МЫШЦУ

(31) 2018-018652

(32) 2018.02.05

(33) JP

(86) PCT/JP2019/004123

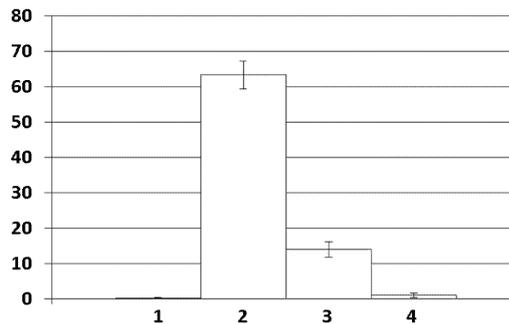
(87) WO 2019/151539 2019.08.08

(71) Заявитель:
Джей Си Ар ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
КО., ЛТД. (JP)

(72) Изобретатель:
Такахаси Кенити, Сонода Хироюки
(JP)

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

(57) Проблемы. Получение методики для эффективного введения агента, действующего в мышечной ткани, который недостаточно вводится в мышечную ткань при введении в тело, в мышечную ткань, в частности мышечную ткань, состоящую из скелетной мышцы или сердечной мышцы. Решение. Конъюгат трансферринового рецептора античеловеческого антитела и агента, где агентом является биологически активный агент, который должен действовать в мышечной ткани, например лизосомный фермент, такой как кислая α -глюкозидаза, α -галактозидаза А.



202091816
A1

202091816
A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563659EA/026

СПОСОБ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА В МЫШЦУ

Область техники

Данное изобретение относится к доставке фармацевтического агента в мышцу, этот агент должен проявлять свою физиологическую активность в мышцах, и более конкретно, к конъюгату, содержащему желаемый фармацевтический агент, связанный с анти-трансферриновым антителом, и способу введения конъюгата, который способствует проявлению желаемым агентом биоактивности в мышцах.

Уровень техники

В последнее время была установлена ферментозамещающая терапия для лизосомной болезни, вызванной функциональным дефицитом лизосомных ферментов, и был улучшен жизненный прогноз и качество жизни (КЖ) пациента. Лекарственные средства, содержащие лизосомные ферменты в качестве активных ингредиентов, применяемые в ферментозамещающей терапии, включают лекарственное средство для гликогеноза 2 типа (болезни Помпе), содержащее человеческую кислоту α -глюкозидазы (hGAA) в качестве основного агента, лекарственное средство для микополисахаридоза 2 типа (болезни Хантера), содержащее человеческую идуронат-2-сульфатазу (hI2S) в качестве основного агента, лекарственное средство для болезни Фабри, содержащее человеческую α -галактозидазу A (h α -GalA) в качестве основного агента, и лекарственное средство для болезни Гоше, содержащее человеческую глюкоцереброзидазу в качестве основного агента.

Лизосомные ферменты, вводимые пациентам при ферментозамещающей терапии, попадают в клетки и выполняют свои функции. Например, человеческая кислая α -глюкозидаза (hGAA), человеческая идуронат-2-сульфатаза (hI2S) и человеческая α -галактозидаза A (h α -GalA), модифицированная сахарной цепью N-типа, содержащей маннозо-6-фосфат (M6P), попадают в клетки через связывание M6P с рецептором M6P. Человеческая глюкоцереброзидаза, лекарственное средство для болезни Гоше, также модифицирована сахарной цепью N-типа, восстанавливающим концом которой является манноза, и она попадает в клетки ретикулоэндотелиальной системы, такие как макрофаги, через связывание маннозы с рецепторами маннозы. Что касается поглощения клетками через связывание M6P и M6P рецепторов, сахарная цепь бисфосфатного типа, содержащая два M6Ps, имеет сродство с рецептором M6P в 100 раз выше, чем сахарная цепь монофосфатного типа, содержащая один M6P. M6P, содержащийся в сахарной цепи, сильно влияет на эффективность клеточного поглощения лизосомных ферментов.

Человеческим лизосомным ферментом, применяемым в ферментозамещающей терапии, является рекомбинантный белок, получаемый экспрессированием гена, кодирующего человеческий лизосомный фермент, гена, введенного в клетку хозяина, такую как клетку CHO, с применением методики рекомбинации генов. Рекомбинантные человеческие лизосомные ферменты, полученные как рекомбинантные белки, должны

быть подходящим образом модифицированы сахарной цепью для того, чтобы оказывать свое фармацевтическое действие. Другими словами, важно, чтобы hGAA, h α -GalA и hI2S были модифицированы сахарной цепью, содержащей маннозо-6-фосфат, и чтобы человеческая глюкоцереброзидаза была подходящим образом модифицирована сахарной цепью, восстанавливающим концом которой является манноза, для оказания их фармацевтического действия.

В случае рекомбинантной человеческой кислоты α -глюкозидазы (rhGAA), основным целевым органом, на который следует оказать фармацевтическое действие, является мышца, в частности, скелетная мышца. Однако, количество М6Р, содержащихся в сахарных цепях, составляет 1 или менее в среднем на молекулу в rhGAA, применяемой для ферментозамещающей терапии, так что большая часть сахарных цепей имеют монофосфатный тип, и модификация сахарной цепи М6Р не является удовлетворительной (Не патентный документ 1). Поэтому, так как rhGAA не введена в целевой орган эффективно, доза для введения является слишком высокой, т.е. 20 мг/кг. В зависимости от симптомов пациента, доза может быть повышена до 40 мг/кг, но все равно вводимый фермент не считается полностью функциональным.

Способ с применением системы лиганд-рецептор, отличной от системы М6Р-М6Р рецептор, был разработан как способ для эффективного поглощения rhGAA в целевой орган. Например известно, что слитый белок, полученный сливанием RAP (рецептор-ассоциированного белка), который является лигандом семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности (рецептора ЛПНП), и hGAA, помещают в клетки в М6Р-независимой манере в экспериментах с применением культивированных клеток (Не патентный документ 2). Согласно этому способу, даже rhGAA, недостаточно модифицированный сахарной цепью, содержащей М6Р, может быть помещен в клетки через связывание RAP и его рецептора.

Список цитирования

Не патентная литература

[Не патентный документ 1] Zhu Y. et al., Biochem. J. 389, 619-28 (2005)

[Не патентный документ 2] Prince WS. et al., J Biol. Chem. 279, 35037-46 (2004)

Сущность изобретения

Проблемы, решаемые изобретением

Целью данного изобретения является получение способа эффективного введения фармацевтического агента, который должен функционировать в мышцах, в мышцу при введении фармацевтического агента *in vivo*, и связанные с ним методы.

Средства решения проблем

В исследовании, направленном на вышеуказанную цель, в результате интенсивного исследования авторы настоящего изобретения обнаружили, что рекомбинантная человеческая кислая α -глюкозидаза, которая должна оказывать свое фармацевтическое действие на мышцу, но не транспортируется в достаточной мере в мышцу как таковая, эффективно поглощается мышцами путем конъюгации с анти-человеческим

трансферриновым рецептором, что и завершило настоящее изобретение. Таким образом, настоящее изобретение включает в себя следующее.

1. Конъюгат антитела против рецептора трансферрина человека и фармацевтического агента, где агент обладает физиологическим действием, проявляющимся в мышцах.

2. Конъюгат по 1, где антителом против рецептора трансферрина человека является Fab антитело, $F(ab')_2$ антитело или $F(ab')$ антитело.

3. Конъюгат по 1, где антителом против рецептора трансферрина человека является одноцепочечное антитело, выбранное из группы, состоящей из scFab, scF(ab'), scF(ab')₂ и scFv.

4. Конъюгат по 3, где в одноцепочечном антителе легкая цепь и тяжелая цепь антитела против рецептора трансферрина человека связаны через линкерную последовательность.

5. Конъюгат по 4 выше, где легкая цепь и тяжелая цепь антитела против рецептора трансферрина человека связаны на С-концевой стороне легкой цепи через линкерную последовательность.

6. Конъюгат по 4 выше, где легкая цепь и тяжелая цепь антитела против рецептора трансферрина человека связаны на С-концевой стороне тяжелой цепи через линкерную последовательность.

7. Конъюгат по любому из 4-6 выше, где линкерная последовательность содержит 8-50 аминокислотных остатков.

8. Конъюгат по 7, где линкерная последовательность содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательности аминокислот (Gly Ser), последовательности аминокислот (Gly Gly Ser), последовательности аминокислот (Gly Gly Gly), последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 3 и последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 4.

9. Конъюгат по 8, где линкерная последовательность содержит 15 аминокислотных остатков, в котором последовательность аминокислот, описанная как SEQ ID NO: 4, последовательно повторяется три раза.

10. Конъюгат по любому из 1-9, где антитело против трансферринового рецептора человека содержит последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 22, в переменной области легкой цепи, и последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 23, в переменной области тяжелой цепи.

11. Конъюгат по 10, где последовательность аминокислот переменной области легкой цепи имеет идентичность не менее 80% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22, и последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи имеет идентичность не менее 80% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

12. Конъюгат по 10, где последовательность аминокислот переменной области легкой цепи имеет идентичность не менее 90% с последовательностью аминокислот,

описанной как SEQ ID NO: 22, и последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи имеет идентичность не менее 90% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

13. Конъюгат по 10, где 1-10 аминокислот, составляющих переменную область легкой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22.

14. Конъюгат по 10, где 1-3 аминокислоты, составляющих переменную область легкой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22.

15. Конъюгат по 10, где 1-10 аминокислот, составляющих переменную область тяжелой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

16. Конъюгат по 10, где 1-3 аминокислот, составляющих переменную область тяжелой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

17. Конъюгат по 10, где 1-10 аминокислот, составляющих переменную область легкой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22, и 1-10 аминокислот, составляющих переменную область тяжелой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

18. Конъюгат по 10, где 1-3 аминокислоты, составляющих переменную область легкой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22, и 1-3 аминокислоты, составляющих переменную область тяжелой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

19. Конъюгат по 10, где анти-человеческое антитело трансферринового рецептора содержит легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 25.

20. Конъюгат по 19, где последовательность аминокислот переменной области легкой цепи имеет идентичность не менее 80% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 24, и последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи имеет идентичность не менее 80% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 25.

21. Конъюгат по 19, где последовательность аминокислот переменной области легкой цепи имеет идентичность не менее 90% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 24, и последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи имеет идентичность не менее 90% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 25.

22. Конъюгат по любому из 1-21, где агентом является пептид или белок.

23. Конъюгат по 22, выбранный из группы, состоящей из (1)-(4) ниже:

(1) конъюгат, в котором белок связан с С-концевой стороной легкой цепи антитела против рецептора трансферрина человека пептидной связью,

(2) конъюгат, в котором белок связан с N- концевой стороной легкой цепи антитела против рецептора трансферрина человека пептидной связью,

(3) конъюгат, в котором белок связан с С- концевой стороной тяжелой цепи антитела против рецептора трансферрина человека пептидной связью, и

(4) конъюгат, в котором белок связан с N- концевой стороной легкой цепи антитела против рецептора трансферрина человека пептидной связью.

24. Конъюгат по 23, где белок связан с антителом против рецептора трансферрина человека через линкерную последовательность.

25. Конъюгат по 24, где линкерная последовательность состоит из 1-50 аминокислотных остатков.

26. Конъюгат по 25, где линкерная последовательность содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из отдельного глицина, отдельного серина, последовательности аминокислот (Gly Ser), последовательности аминокислот (Gly Gly Ser), последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO:3, последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO:4, и последовательности аминокислот, состоящей из 1-10 последовательностей аминокислот, который связаны последовательно.

27. Конъюгат по любому из 1-28, где антителом против рецептора трансферрина человека является гуманизованное антитело против трансферринового рецептора человека.

28. Конъюгат по любому из 22-27, где белком является лизосомный фермент.

29. Конъюгат по 28, где лизосомным ферментом является α -галактозидаза А человека.

30. Конъюгат по 29, где легкая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела содержит последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и где тяжелая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела связана его С-концевой стороной с человеческой α -галактозидазой А через линкерную последовательность (Gly Ser), и полная связанная тяжелая цепь имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 29.

31. Конъюгат по 28, где лизосомным ферментом является кислая α -глюкозидаза человека.

32. Конъюгат по 31, где легкая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела содержит последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и где тяжелая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела связана его С-концевой стороной с человеческой кислотой α -глюкозидазы через линкерную последовательность (Gly Ser), и полная связанная тяжелая цепь имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 27.

33. Фармацевтическая композиция для улучшения мышечной функции, содержащая конъюгат по любому из 1-32 выше.

34. Фармацевтическая композиция для облегчения мышечной дисфункции, связанной с лизосомной болезнью, содержащая конъюгат по 28 выше.

35. Фармацевтическая композиция для облегчения мышечной дисфункции, связанной с болезнью Фабри, содержащая конъюгат по 29 или 30 выше.

36. Фармацевтическая композиция для облегчения мышечной дисфункции, связанной с болезнью Помпе, содержащая конъюгат по 31 или 32 выше.

37. Фармацевтическая композиция по любому из 33-36, где мышцей является скелетная мышца, сердечная мышца или гладкая мышца.

38. Применение конъюгата по любому из 28-32 выше для производства фармацевтической композиции для облегчения мышечной дисфункции, связанной с лизосомной болезнью.

39. Применение конъюгата по 29 или 30 выше для производства фармацевтической композиции для облегчения мышечной дисфункции, связанной с болезнью Фабри.

40. Применение конъюгата по 31 или 32 выше для производства фармацевтической композиции для облегчения мышечной дисфункции, связанной с болезнью Помпе.

41. Применение конъюгата по любому из 1-32 выше в качестве фармацевтической композиции для улучшения мышечной функции.

42. Способ доставки фармацевтического агента в мышцу, включающий стадию получения агента в виде конъюгата, в котором агент связан с антителом против рецептора трансферрина человека, и стадию введения конъюгата индивидууму.

43. Способ по 42, где конъюгатом является конъюгат по любому из 1-32 выше.

44. Способ по 42 или 43, дополнительно включающий стадию улучшения мышечной функции индивидуума введением конъюгата.

45. Способ по любому из 42-44, где индивидуум имеет мышечную дисфункцию.

46. Способ по любому из 42-44, где индивидуум имеет мышечную дисфункцию, связанную с лизосомной болезнью.

47. Способ по 46, где лизосомной болезнью является болезнь Фабри или болезнь Помпе.

Эффекты изобретения

Согласно настоящему изобретению, фармацевтический агент, выполняющий свою функцию в мышце, в частности, пептид или белок, обладающий физиологической активностью, может быть эффективно доставлен в мышцу, когда агент вводят в организм, позволяя агенту конъюгироваться с анти-человеческим трансферриновым рецептором. Другими словами, конъюгируя агент с человеческим трансферриновым рецептором, можно получить более эффективный терапевтический агент для заболеваний, связанных с мышечной дисфункцией.

Краткое описание чертежей

[Фигура 1] На фигуре показаны количественные результаты гликогена,

содержащегося в сердце. Количественные результаты контрольной группы дикого типа, (1) показывают количественные результаты контрольной группы дикого типа, КО-контрольной группы, группы введения hGAA и группы введения hGAA-анти-hTfR антитела показаны на (1), (2), (3) и (4), соответственно. Вертикальные столбики показывают значения СО. Вертикальные оси представляют концентрацию гликогена (мг/г массы влажной ткани).

[Фигура 2] На фигуре показаны количественные результаты гликогена, содержащегося в диафрагме. То же самое показано на (1)-(4), вертикальными столбиками и вертикальными осями, как и на фиг. 1.

[Фигура 3] На фигуре показаны количественные результаты гликогена, содержащегося в камбаловидной мышце. То же самое показано на (1)-(4), вертикальными столбиками и вертикальными осями, как и на фиг. 1.

[Фигура 4] На фигуре показаны количественные результаты гликогена, содержащегося в передней большеберцовой мышце. То же самое показано на (1)-(4), вертикальными столбиками и вертикальными осями, как и на фиг. 1.

[Фигура 5] На фигуре показаны количественные результаты гликогена, содержащегося в четырехглавой мышце бедра. То же самое показано на (1)-(4), вертикальными столбиками и вертикальными осями, как и на фиг. 1.

Варианты осуществления изобретения

В данном изобретении термин «мышца» означает ткань, в основном состоящую из скелетных мышц, сердечной мышцы или гладких мышц, и, в частности, ткань, состоящую в основном из скелетных мышц, или ткань, состоящую в основном из сердечной мышцы. И термин «мышечная ткань» понимается как синоним мышцы.

В данном изобретении, фармацевтическим агентом, который должен оказывать физиологическое действие в мышце, является агент, который не может оказывать достаточное физиологическое действие в мышце из-за недостаточного транспорта в мышцу при введении агента отдельно в кровь. Такими агентами могут быть низкомолекулярные соединения, пептиды или белки. Здесь, пептидом является такой, который потенциально способен оказывать физиологическое действие в мышце (биоактивный пептид), но отдельно не транспортируется эффективно в мышцу при введении в организм. Такой пептид предпочтительно состоит из 2-100 аминокислотных остатков, например, 2-50, 5-100 аминокислотных остатков. Дополнительно, такой белок потенциально способен оказывать физиологическое действие в мышце (биоактивный белок), но отдельно не транспортируется эффективно в мышцу при введении в организм, и включает лизосомные ферменты, такие как кислая α -глюкозидаза (GAA) и α -галактозидаза A (α -GalA), и так далее. Такие пептиды и белки могут иметь искусственные последовательности аминокислот, или могут иметь последовательности аминокислот, кодированные животными генами. Здесь, виды животных, гены которых кодируют пептид или белок, особенно не ограничены, но предпочтительно включают млекопитающих, более предпочтительно, человека, обезьяну, мышь, домашних животных (лошадей,

свиней, овец и т.д.) или домашних питомцев (кошек, собак и т.д.), и более предпочтительно, человека.

В дополнение к GAA и α GalA, лизосомные ферменты, которые должны демонстрировать функции лекарственных средств для улучшения дисфункции мышц, связанной с лизосомными болезнями, включают α -L-идуронидазу (IDUA), идуронат-2-сульфатазу (IDS), глюкоцереброзидазу (GBA), β -галактозидазу, GM2 активирующий белок, β -гексозаминидазу А, β -гексозаминидазу В, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу, α -маннозидазу (LAMAN), β -маннозидазу, галактозилцерамидазу (GALC), Сапосин С, арилсульфатазу А (ARSA), α -L-фукозидазу (FUCA1), аспартилглюкозаминидазу, α -N-ацетилгалактозаминидазу, кислоту сфингомиелиназы (ASM), β -глюкуронидазу (GUSB), гепаран N-сульфатазу (SGSH), α -N-ацетилглюкозаминидазу (NAGLU), ацетил-CoA: α -глюкозаминид N-ацетилтрансферазы, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат сульфатазы, кислоту церамидазы (AC), амило-1,6-глюкозидазу, сиалидазу, аспартилглюкозаминидазу, пальмитоилпротеинтиозстеразу-1 (PPT-1), трипептидилпептидазу-1 (TPP-1), гиалуронидазу-1, CLN1, CLN2 и подобные. Эти ферменты могут быть более эффективно доставлены в мышцу при введении в организм в форме конъюгата с антителом против рецептора трансферрина человека. Таким образом, эти конъюгаты могут применяться в качестве лекарственного средства для облегчения мышечной дисфункции, связанной с лизосомной болезнью.

Идуронат-2-сульфатаза (IDS), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при синдроме Хантера, α -галактозидаза А, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Фабри, α -L-идуронидаза (IDUA), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Гурлера или болезни Гурлера-Шейе, глюкоцереброзидаза (GBA), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Гоше, β -галактозидаза, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при GM1-ганглиозидозе типов 1-3, GM2 активирующий белок, конденсированный с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при GM2-ганглиозидозе, варианте АВ, β -гексозаминидаза А, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Сандхоффа и болезни Тей-Сакса, β -гексозаминидаза В, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Сандхоффа, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансфераза, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни клеточных включений, α -маннозидаза (LAMAN), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве

терапевтического агента при мышечной дисфункции при α -маннозидозе, галактозилцерамидаза (GALC), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Краббе, сапозин С, конденсированный с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни типа болезни Гоше, и арилсульфатаза А, (ARSA) конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при метахроматической лейкодистрофии, α -L-фукозидаза (FUCA1), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при фукозидозе, аспартилглюкозаминидаза, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при аспартилглюкозамиурии, α -N-ацетилгалактозаминидаза, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Шиндлера и болезни Канзаки, кислая сфингомиелиназа (ASM) конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Ниманна-Пика, β -глюкуронидаза (GUSB), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при синдроме Слая, гепаран N-сульфатаза (SGSH), α -N-ацетилглюкозаминидаза (NAGLU), ацетил-СоА: α -глюкозаминид N-ацетилтрансфераза и N-ацетилглюкозамин-6-сульфат сульфатазы, конденсированные с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтических агентов при мышечной дисфункции при синдроме Санфилиппо, кислая церамидаза (AC), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Фарбера, амило-1,6-глюкозидаза, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Кори (болезни Форбса/Кори), сиалидаза, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при дефиците сиалидазы, пальмитоилпротеинтиоэстераза-1 (PPT-1), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при нейроцериоидном липофусцинозе или болезни Сантавуори-Халтия, трипептидилпептидаза-1 (TPP-1), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при нейроцериоидном липофусцинозе или болезни Янски-Бельшовски, гиалуронидаза-1, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при дефиците гиалуронидазы, кислая α -глюкозидаза (GAA), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Помпе, и CLN1 и CLN2, конденсированные с анти-hTfR антителом, могут применяться в качестве терапевтических агентов при мышечной

дисфункции при болезни Баттена. В частности, ожидается, что анти-hTfR антитело в соответствии с данным изобретением достигает церебральной паренхимы, гиппокампальных нервно-подобных клеток, мозжечковых клеток Паркинсье и т.д. после прохождения через гематоэнцефалический барьер, а также достигает нервно-подобных клеток мозгового полосатого тела и черной субстанции среднего мозга так, что фармацевтическая эффективность белка может быть улучшена сливанием с белком для реализации своей функции в этих тканях или клетках. Однако фармацевтическое применение не ограничено применением при этих болезнях.

В данном изобретении термин "лизосомный фермент" или термин, обозначающий индивидуальный лизосомный фермент, означает, в частности, что имеет природную последовательность аминокислот, но не ограничен ей, и поскольку он имеет лизосомный фермент, лизосомные ферменты, в которых мутации, такие как замещения, делеции, добавления и подобные, введены в последовательность аминокислот природного лизосомного фермента, также включены в лизосомный фермент. Если аминокислоты последовательности аминокислот лизосомного фермента замещены другими аминокислотами, количество замещенных аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно, от 1 до 5, даже более предпочтительно, от 1 до 3, и еще более предпочтительно, от 1 до 2. Если аминокислоты последовательности аминокислот лизосомного фермента удалены, количество удаленных аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно, от 1 до 5, даже более предпочтительно, от 1 до 3, и еще более предпочтительно, от 1 до 2. Мутация, объединяющая такое замещение и делецию аминокислот, также может быть введена в лизосомный фермент. Если аминокислоты добавляют к аминокислоте, предпочтительно, 1-10, более предпочтительно, 1-5, даже более предпочтительно, 1-3, и еще более предпочтительно, 1-2 аминокислоты добавляют к последовательности аминокислоты лизосомного фермента или к N-концевой или C-концевой стороне лизосомного фермента. Мутация, объединяющая такое добавление, замещение и делецию аминокислот, также может быть введена в лизосомный фермент. Последовательность аминокислот мутированного лизосомного фермента предпочтительно идентична на не менее 80%, более предпочтительно, 90%, и даже более предпочтительно, 95%, последовательности аминокислот исходного лизосомного фермента. То же самое применяется к белкам и пептидам, отличным от лизосомных ферментов.

Здесь, фраза "лизосомный фермент имеет активность лизосомного фермента" означает, что лизосомный фермент имеет активность не менее 3% от активности, присущей лизосомному ферменту дикого типа при конъюгации с анти-hTfR антителом. Однако активность предпочтительно составляет не менее 10%, более предпочтительно, не менее 20%, даже более предпочтительно, не менее 50%, и еще более предпочтительно, не менее 80% от активности, присущей лизосомному ферменту дикого типа. То же самое применяется, если лизосомные ферменты, конъюгированные с анти-hTfR антителом, мутированы. То же самое применяется к белкам и пептидам, отличным от лизосомных

ферментов.

Замещения аминокислот в последовательности аминокислот пептидов или белков (включая лизосомные ферменты и антитела) другими аминокислотами включают, например, замещения между аминокислотами в одной группе, такой как ароматические аминокислоты (Phe, Trp, Tyr), алифатические аминокислоты (Gly, Ala, Leu, Ile, Val), аминокислоты амидного типа (Gln, Asn), основные аминокислоты (Lys, Arg, His), кислые аминокислоты (Glu, Asp), аминокислоты с гидроксильными группами (Ser, Thr), разветвленные аминокислоты (Val, Leu, Ile), аминокислоты с небольшими боковыми цепями (Gly, Ala, Ser, Thr, Met) и аминокислоты с не полярными боковыми цепями (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met). Прогнозируют, что замещения такими подобными аминокислотами не приведут к изменениям в фенотипе белка (т.е. консервативные замещения аминокислот). Примеры консервативных замещений аминокислот хорошо известны в данной области техники и описаны в различных ссылках (см., например, Bowie et al., *Science*, 247:1306-1310 (1990)).

В данном изобретении, "гомология" или "идентичность" означает отношение (%) гомологичных аминокислотных остатков к общему количеству аминокислотных остатков в оптимальном размещении, когда две последовательности аминокислот сравнивают с применением алгоритма расчета гомологии. Сравнение двух последовательностей аминокислот на гомологичность (идентичность), показанную таким отношением, хорошо известно в данной области техники и может быть легко понято специалистом в данной области техники. В данном изобретении, в качестве алгоритма расчета гомологии между последовательностью аминокислот исходного белка (включая антитело) и последовательностью аминокислот мутированного белка, BLAST (Altschul SF. *J Mol. Biol.* 215. 403-10 (1990)), способ поиска сходства Пирсона и Липмана (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85. 2444 (1988)), алгоритм локальной гомологии Смита и Ватермана (*Adv. Appl. Math.* 2. 482-9 (1981)) и так далее хорошо известны. Дополнительно, blastp, одна из программ BLAST, представленная в интернете Национальным институтом здоровья, хорошо известна в качестве средства расчета гомологии двух последовательностей аминокислот.

Лизосомные ферменты описаны подробно, принимая в качестве примера кислую α -глюкозидазу и α -галактозидазу А, как подробно описано ниже.

Кислая α -глюкозидаза (GAA) является лизосомным ферментом, который обладает действием разложения гликогена. Болезнь Помпе (болезнь накопления гликогена II типа) является болезнью, при которой гликоген аккумулируется в больших количествах в лизосоме клеток вследствие генетического отсутствия большинства или всей активности кислой α -глюкозидазы, и дисфункция сердечной мышцы и скелетной мышцы является основным симптомом. Болезнь Помпе классифицируется на младенческую форму, детскую форму и взрослую форму. Младенческая форма развивается в основном в раннем младенческом возрасте и показывает сердечнососудистые симптомы из-за концентрической сердечной гипертрофии, мышечную слабость из-за инвазии скелетной

мышцы и гипотонию из-за аккумуляции гилкогена в миокарде, и характеризуется врожденными миопатическими симптомами. При детской форме, преобладают симптомы скелетной мышцы, и они показывают задержку двигательного развития и прогрессирующую мышечную слабость, начиная с позднего младенчества. Мышечная слабость является основным симптомом при взрослой форме.

α -Галактозидаза А (α -GalA) является лизосомным ферментом, который обладает действием гидролиза концевых α -галактозидных связей гликолипидов и гликопротеинов. Тригексозилцерамид является одним из субстратов для α -галактозидазы А и гидролизуется ферментом на концевой гексозной группе. Болезнь Фабри является болезнью, вызванной генетической потерей большинства или всей активности α -GalA. Клиническими признаками болезни Фабри является почечная недостаточность, ангиокератома и сердечнососудистые аномалии, такие как вентрикулярная гипертрофия и недостаточность митрального клапана. Атипичный тип болезни Фабри, в котором в первую очередь ухудшается сердце, может быть выделен, в частности, как сердечная болезнь Фабри.

В качестве терапии лизосомной болезни пациента, не имеющего лизосомный фермент, ферментозамещающую терапию, в которой лизосомный фермент, полученный с применением метода рекомбинации гена, вводят пациенту в виде лекарственного средства. Например, ферментозамещающую терапию с применением Myozyme (зарегистрированная торговая марка), рекомбинантной человеческой кислой α -глюкозидазы, полученной методом рекомбинации генов, проводят у пациентов с болезнью Помпе. Кроме того, ферментозамещающая терапия с применением Fabrazyme или Ripregal (зарегистрированные торговые марки), рекомбинантной человеческой α -галактозидазы А, полученной методом рекомбинации генов, проводят у пациентов с болезнью Фабри. Одна из тканей, в которых лизосомные ферменты, применяемые в качестве лекарственных средств в этих ферментозамещающих терапиях, должны оказывать действие в мышцах. Таким образом, при повышении подачи лизосомных ферментов в мышцу, может быть возможно дополнительно облегчать мышечную дисфункцию, связанную с лизосомной болезнью.

В данном изобретении термин "человеческая кислая α -глюкозидаза" или "hGAA" в частности означает hGAA, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 1, которая является такой же, как последовательность природной hGAA, но данное изобретение не ограничено ей, и до тех пор, пока она имеет активность hGAA, hGAA включает hGAA, в которой мутации, такие как замещения, делеции и добавления и подобные, введены в последовательность аминокислот природной hGAA. Если аминокислоты последовательности аминокислот hGAA замещены другими аминокислотами, количество замещенных аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно, от 1 до 5, даже более предпочтительно, от 1 до 3, и еще более предпочтительно, от 1 до 2. Если аминокислоты последовательности аминокислот hGAA, количество удаляемых аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 10, более

предпочтительно, от 1 до 5, даже более предпочтительно, от 1 до 3, и еще более предпочтительно, от 1 до 2. Мутация с объединением такого замещения и делеции аминокислот также может быть введена в hGAA. Если аминокислоты добавляют к hGAA, предпочтительно, 1-10, более предпочтительно, 1-5, даже более предпочтительно, 1-3, и еще более предпочтительно, 1-2 аминокислоты добавляют в последовательность аминокислот hGAA или на N-концевую или C-концевую сторону. Мутация, объединяющая такое добавление, замещение и делецию аминокислот, также может быть введена в hGAA. Последовательность аминокислот мутированной hGAA предпочтительно имеет 80% или большую идентичность, более предпочтительно, 90% или более идентичность и даже более предпочтительно, 95% или более идентичность к последовательности аминокислот исходной hGAA.

Здесь термин "hGAA имеет активность hGAA" означает, что она имеет активность не менее 3% относительно активности, присущей природному типу hGAA при конъюгировании с анти-hTfR антителом. Однако активность предпочтительно составляет не менее 10%, более предпочтительно, 20% или более, даже более предпочтительно, не менее 50%, и еще более предпочтительно, не менее 80% относительно активности, присущей природному типу hGAA. То же самое применяется, когда hGAA, конъюгированная анти-hTfR антителом, мутирована.

В данном изобретении термин "человеческая α -галактозидаза A" или "h α -GalA" означает, в частности, h α -GalA, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 2, которая является такой же, как последовательность природной h α -GalA, но не ограничена ей, и пока h α -GalA имеет активность h α -GalA, h α -GalA также включает мутации, такие как замещения, делеции, добавления и т.д. в последовательности аминокислот природной h α -GalA. Если аминокислоты последовательности аминокислот h α -GalA замещены другими аминокислотами, количество замещенных аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно, от 1 до 5, даже более предпочтительно, от 1 до 3, и еще более предпочтительно, от 1 до 2. Если аминокислоты в последовательности аминокислот h α -GalA удалены, количество удаленных аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно, от 1 до 5, даже более предпочтительно, от 1 до 3, и еще более предпочтительно, от 1 до 2. Мутация с объединением такого замещения и делеции аминокислот также может быть введена в h α -GalA. Когда аминокислоты добавляют к h α -GalA, предпочтительно, 1-10, более предпочтительно, 1-5, даже более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1-2 аминокислот добавляют в последовательность аминокислот h α -GalA или на N-концевой или C-концевой стороне. Мутация, объединяющая такое добавление, замещение и делецию аминокислот, также может быть введена в h α -GalA. Последовательность аминокислот мутированной h α -GalA предпочтительно имеет 80% или большую идентичность, более предпочтительно, 90% или более идентичность и даже более предпочтительно, 95% или более идентичность к последовательности аминокислот исходной h α -GalA.

Здесь термин "h α -GalA имеет активность h α -GalA" означает, что она имеет активность не менее 3% относительно активности, присущей природному типу h α -GalA при конъюгировании с анти-hTfR антителом. Однако активность предпочтительно составляет не менее 10%, более предпочтительно, 20% или более, даже более предпочтительно, не менее 50%, и еще более предпочтительно, не менее 80% относительно активности, присущей природному типу h α -GalA. То же самое применяется, когда h α -GalA, конъюгированная анти-hTfR антителом, мутирована.

В данном изобретении термин "антитело" относится преимущественно к человеческому антителу, мышинному антителу, гуманизированному антителу, химерному антителу или человеческому антителу и другим антителам млекопитающих, и химерному антителу мышинного антитела и антитела другого млекопитающего, но пока они обладают свойством специфического связывания с конкретным антигеном, они не ограничены, и не существует конкретных ограничений животных видов антител.

В данном изобретении термин "человеческое антитело" относится к антителу, целый белок которого кодирован геном, происходящим от человека. Термин "человеческое антитело", однако, также включает антитело, кодированное геном, полученным введением мутации в исходный человеческий ген с целью улучшения эффективности экспрессии гена, например, без модификации исходной последовательности аминокислот. Термин "человеческое антитело" также включает антитело, в котором определенная часть человеческого антитела замещена частью другого человеческого антитела через объединение двух или более генов, кодирующих человеческие антитела. Человеческое антитело включает три определяющие комплементарность области (ОКО: аббревиатура определяющей комплементарность области) в легкой цепи иммуноглобулина, и три определяющие комплементарность области (ОКО) в тяжелой цепи иммуноглобулина. Три ОКО в легкой цепи иммуноглобулина называют, с N-концевой стороны, ОКО1, ОКО2 и ОКО3, соответственно. Три ОКО в тяжелой цепи иммуноглобулина также называют, с N-концевой стороны, ОКО1, ОКО2 и ОКО3, соответственно. Термин "человеческое антитело" также включает человеческое антитело, полученное замещением ОКО человеческого антитела на ОКО другого человеческого антитела для модификации таких свойств, как специфичность в антигене и сродство с оригинальными человеческими антителами, и т.д.

В данном изобретении термин "человеческое антитело" также включает антитело, которое получают модификацией гена исходного человеческого антитела введением мутации, такой как замещение, делеция, добавление, в последовательность аминокислот исходного антитела. При замещении одной или более аминокислот последовательности аминокислот исходного антитела другими аминокислотами, количество замещенных аминокислот предпочтительно может составлять 1-20, более предпочтительно, 1-5, и еще более предпочтительно, 1-3. При удалении одной или более аминокислот последовательности аминокислот исходного антитела, количество удаляемых

аминокислот предпочтительно может составлять 1-20, более предпочтительно, 1-5, и еще более предпочтительно, 1-3. Антитело, полученное объединенной мутацией такого замещения и делеции аминокислот, также является "человеческим антителом". В некоторых случаях, одна или более аминокислот, предпочтительно, 1-20, более предпочтительно, 1-5, и еще более предпочтительно, 1-3 аминокислоты могут быть добавлены внутрь последовательности аминокислот исходного антитела на N- или C-концевой стороне. Антитело, полученное объединенной мутацией добавления, замещения и делеции аминокислот, также является "человеческим антителом". Последовательность аминокислот такого мутированного антитела имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, еще более предпочтительно, не менее 95%, и даже более предпочтительно, не менее 98%, последовательности аминокислот исходного антитела. Таким образом, в данном изобретении термин "ген, происходящий от человека" включает не только не мутированный ген, происходящий от человека, но также ген, полученный его модификацией.

Термин "мышинное антитело" относится к антителу, целый белок которого состоит из последовательности аминокислот, такой же, как для антитела, кодируемого геном, происходящим от мыши. Поэтому термин "мышинное антитело" также включает антитело, которое кодируется геном, полученным введением мутации в оригинальный мышинный ген не вызывая изменений в его последовательности аминокислот, но для, например, улучшения эффективности экспрессии гена. Дополнительно, термин "мышинное антитело" также включает антитело, полученное через объединение двух или более генов, кодирующих мышинные антитела через замену части мышинного антитела частью другого мышинного антитела. Мышинное антитело имеет три определяющих комплементарность области (ОКО) в легкой цепи иммуноглобулина и три определяющие комплементарность области (ОКО) в тяжелой цепи иммуноглобулина. Три ОКО в легкой цепи иммуноглобулина называют, с N-концевой стороны, ОКО1, ОКО2 и ОКО3, соответственно. Три ОКО в тяжелой цепи иммуноглобулина также называют, с N-концевой стороны, ОКО1, ОКО2 и ОКО3, соответственно. Например, термин "мышинное антитело" также включает антитело, полученное замещением ОКО мышинного антитела на ОКО другого мышинного антитела для модификации специфичности и сродства к оригинальным мышинным антителам.

В данном изобретении термин "мышинное антитело" также включает антитело, которое получают модификацией гена исходного мышинного антитела введением мутации, такой как замещение, делеция, добавление, в последовательность аминокислот исходного антитела. При замене одной или более аминокислот последовательности аминокислот исходного антитела другими аминокислотами, количество замещенных аминокислот может составлять 1-20, более предпочтительно, 1-5, и еще более предпочтительно, 1-3. При удалении одной или более аминокислот последовательности аминокислот исходного антитела, количество удаленных аминокислот может, предпочтительно, составлять 1-20, более предпочтительно, 1-5, и еще более предпочтительно, 1-3. Антитело, полученное

объединенной мутацией этих замещений и делеций аминокислот, также включено в "мышинное антитело". При добавлении одной или более аминокислот, они могут быть добавлены внутрь последовательности аминокислот исходного антитела или его N- или C-концевой стороны, предпочтительно, 1-20, более предпочтительно, 1-5, и еще более предпочтительно, 1-3, по количеству. Антитело, полученное объединенной мутацией добавления, замещения и делеции аминокислот, также включено в "мышинное антитело". Последовательность аминокислот такого мутированного антитела имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, еще более предпочтительно, не менее 95%, и даже более предпочтительно, не менее 98%, с последовательностью аминокислот исходного антитела. Таким образом, в данном изобретении термин "нег, происходящий от мыши" включает не только не мутированный ген, происходящий от мыши, но также ген, полученный его модификацией.

В данном изобретении термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, в котором часть последовательности аминокислот его переменной области (например, особенно целой или части его ОКО) происходит от нечеловекоподобного животного, а оставшаяся часть происходит от человека. Примером гуманизированного антитела является антитело, полученное замещением трех определяющих комплементарность областей (ОКО) легкой цепи иммуноглобулина и трех определяющих комплементарность областей (ОКО) тяжелой цепи иммуноглобулина, составляющих человеческое антитело, на ОКО от нечеловекоподобного животного. Не существует особых ограничений в отношении биологических видов, из которых эти ОКО прививают в правильное положение человеческого антитела, если они происходят от нечеловекоподобного млекопитающего. Хотя виды включают, предпочтительно, мышь, крысу, кролика, лошадь или нечеловекоподобного примата, и более предпочтительно, мышь или крысу, например мышь.

В данном изобретении термин "химерное антитело" относится к антителу, полученному соединением фрагментов двух или более разных антител, происходящих от двух или более разных видов.

Химерным антителом, содержащим человеческое антитело и антитело нечеловекоподобного млекопитающего является антитело, полученное замещением части человеческого антитела частью антитела нечеловекоподобного млекопитающего. Антитело получают из Fc области, Fab области и шарнирной области. Конкретным примером таких химерных антител является химерное антитело, Fc область которого происходит от человеческого антитела, а Fab область которого происходит от антитела нечеловекоподобного млекопитающего. Шарнирная область происходит либо от человеческого антитела, либо от антитела нечеловекоподобного млекопитающего. Наоборот, термин химерное антитело также включает такое, где Fc область происходит от антитела нечеловекоподобного млекопитающего, а Fab область происходит от человеческого антитела. В этом случае также, шарнирная область происходит либо от человеческого антитела, либо от антитела нечеловекоподобного млекопитающего.

Антитело может рассматриваться как состоящее из переменной области и постоянной области. Дополнительные примеры химерных антител включают антитело, в котором тяжелая цепь постоянной области (C_H) и легкая цепь постоянной области (C_L) происходят от человеческого антитела, а тяжелая цепь переменной области (V_H) и легкая цепь переменной области (V_L) происходят от антитела нечеловекоподобного млекопитающего, и наоборот, антитело, в котором тяжелая цепь постоянной области (C_H) и легкая цепь постоянной области (C_L) происходят от антитела нечеловекоподобного млекопитающего, а тяжелая цепь переменной области (V_H) и легкая цепь переменной области (V_L) происходят от человеческого антитела. В них не существует особых ограничений в отношении биологических видов нечеловекоподобного млекопитающего, хотя виды включают, предпочтительно, мышь, крысу, кролика, лошадь или нечеловекоподобного примата, и более предпочтительно, мышь.

Химерным антителом мышиногo антитела и другого млекопитающего антитела является антитело, в котором часть мышиногo антитела замещена частью антитела млекопитающего, отличного от мыши. Пример такого химерного антитела включают химерное антитело, в котором Fc область получают из мышиногo антитела, а Fab область получают из антитела другого млекопитающего, и наоборот, химерное антитело, в котором Fc область получают от другого млекопитающего, а Fab область получают из мышиногo антитела. Здесь виды другого млекопитающего особенно не ограничены, пока они являются млекопитающими, отличными от мыши, но, предпочтительно, они включают крысу, кролика, лошадь или нечеловекоподобного примата.

Химерное антитело, содержащее человеческое антитело и мышиное антитело, обозначено, в частности, "человеческое/мышиное химерное антитело". Примеры человеческих/мышинных химерных антител включают химерное антитело, в котором Fc область происходит от человеческого антитела, а Fab область происходит от мышиногo антитела, и наоборот, химерное антитело, в котором Fc область происходит от мышиногo антитела, а Fab область происходит от человеческого антитела. Шарнирная область происходит либо от человеческого антитела, либо от мышиногo антитела. Дополнительные конкретные примеры человеческих/мышинных химерных антител включают такие, где тяжелая цепь постоянной области (C_H) и легкая цепь постоянной области (C_L) происходят от человеческого антитела, а его тяжелая цепь переменной области (V_H) и легкая цепь переменной области (V_L) происходят от мышиногo антитела, и наоборот, такие, где тяжелая цепь постоянной области (C_H) и легкая цепь постоянной области (C_L) происходят от мышиногo антитела, а тяжелая цепь переменной области (V_H) и легкая цепь переменной области (V_L) происходят от человеческого антитела.

Изначально, антитело имеет основную структуру, имеющую всего четыре полипептидные цепи, состоящие из двух иммуноглобулиновых легких цепей и двух иммуноглобулиновых тяжелых цепей. Однако в данном изобретении термин "антитело" относится, кроме антитела, имеющего такую основную структуру, также к:

- (1) антителу, состоящему из двух полипептидных цепей, содержащих одну

иммуноглобулиновую легкую цепь и одну иммуноглобулиновую тяжелую цепь, и, как объясняется ниже,

(2) одноцепочечному антителу, состоящему из иммуноглобулиновой легкой цепи, которая связана, на его С-концевой стороне, с линкерной последовательностью которая, в свою очередь, связана на ее С-концевой стороне, с иммуноглобулиновой тяжелой цепью,

(3) одноцепочечным антителам, состоящим из иммуноглобулиновой тяжелой цепи, которая связана, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью которая, в свою очередь, связана на ее С-концевой стороне, с иммуноглобулиновой легкой цепью, и

(4) антителом, состоящим из Fab области, т.е. структуры, оставленной после удаления Fc области из антитела, имеющего основную структуру в исходном понимании, и антителом, состоящим из Fab области и целой или части шарнирной области (включая Fab, F(ab') и F(ab')₂).

Здесь термин "Fab" относится к молекуле, состоящей из одной легкой цепи, содержащей переменную область и C_L область (легкую цепь постоянной области) и одной тяжелой цепи, содержащей переменную область и C_{H1} область (часть 1 тяжелой цепи постоянной области), которые объединены дисульфидной связью между их соответствующими цистеиновыми остатками. Хотя тяжелая цепь в Fab может включать часть шарнирной области в дополнение к переменной области и C_{H1} области (части 1 тяжелой цепи постоянной области), шарнирная область в таком случае не имеет цистеинового остатка, которые в другом случае присутствует в шарнирной области и служит для связывания двух тяжелых цепей антитела вместе. В Fab, легкая цепь и тяжелая цепь соединены дисульфидной связью, образованной между цистеиновым остатком, присутствующим в легкой цепи постоянной области (C_L области) и цистеиновым остатком, расположенным в тяжелой цепи постоянной области (C_{H1} области) или шарнирной области. Так как она не имеет цистеинового остатка в шарнирной области, который служит для связи двух тяжелых цепей антитела, Fab состоит из одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Легкая цепь Fab включает переменную область и C_L область. Тяжелая цепь с качестве компонента Fab может состоять либо из переменной области и C_{H1} области, либо также части шарнирной области в дополнение к переменной области и C_{H1} области. Однако, в таком случае, шарнирная область выбирается таким образом, чтобы она не включала цистеиновый остаток, который может связывать две тяжелые цепи, для того, чтобы избежать образования дисульфидной связи между двух тяжелых цепей в их шарнирных областях. В F(ab'), тяжелая цепь включает, в дополнение к переменной области и C_{H1} области, всю или часть шарнирной области, содержащую цистеиновый остаток, который может связывать две тяжелые цепи. F(ab')₂ является молекулой, состоящей из двух F(ab'), связанных вместе через дисульфидную связь, образованную между цистеиновыми остатками, присутствующими в соответствующих шарнирных областях. Дополнительно, полимер, такой как димер и тример, который состоит из двух или более антител, соединенных друг с другом, прямо или через линкер, также включен в термин "антитело". Более того, в дополнение к вышесказанному, любая

молекула, которая включает часть молекулы иммуноглобулина и имеет свойство специфического связывания с антигеном, также включена в термин "антитело" в соответствии с данным изобретением. Таким образом, в данном изобретении термин "иммуноглобулиновая легкая цепь" включает молекулу, которая получена из исходной иммуноглобулиновой легкой цепи и имеет последовательность аминокислот целой или части ее переменной области. Также, термин "иммуноглобулиновая тяжелая цепь" включает молекулу, которая получена из исходной иммуноглобулиновой тяжелой цепи и имеет последовательность аминокислот целой или части его переменной области. Поэтому независимо от наличия целой или части последовательности аминокислот переменной области, молекула включена в термин "иммуноглобулиновая тяжелая цепь", даже если она не содержит Fc область, например.

Также, как сказано выше, Fc или Fc область относится к области, включающей фрагменты, состоящие из C_H2 области (части 2 постоянной области тяжелой цепи) и C_H3 области (части 3 постоянной области тяжелой цепи) в молекуле антитела.

Более того, в данном изобретении термин "антитело" также включает:

(5) scFab, scF(ab') и scF(ab')₂, которые являются одноцепочечными антителами, полученными связыванием легкой цепи с тяжелой цепью, которые образуют, соответственно, Fab, F(ab') и F(ab')₂, указанные в (4) выше, через линкерную последовательность. Такие scFab, scF(ab') и scF(ab')₂ могут быть молекулой, в которой либо легкая цепь связана, на ее C-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана, на своей C-концевой стороне, с тяжелой цепью, либо тяжелая цепь связана, на ее C-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана, на ее C-концевой стороне, с легкой цепью. Более того, scFv, который является одноцепочечным антителом, полученным связыванием легкой цепи переменной области с тяжелой цепью переменной области, через линкерную последовательность между ними, также включено в термин "антитело" в соответствии с данным изобретением. Такие scFv могут быть молекулой, в котором либо легкая цепь переменной области связана, на ее C-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана, на своей C-концевой стороне, с тяжелой цепью переменной области, либо тяжелая цепь переменной области связана, на ее C-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана, на ее C-концевой стороне, с легкой цепью переменной области.

В данном изобретении термин "одноцепочечное антитело" относится к белку, в котором последовательность аминокислот, содержащая целую или часть иммуноглобулиновой легкой цепи переменной области, связана, на ее C-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана, на ее C-концевой стороне, с последовательностью аминокислот целой или части иммуноглобулиновой тяжелой цепи переменной области, и который обладает способностью специфически связываться с определенным антигеном. Например, такие, которые показаны в (2), (3) и (5) выше, включены в одноцепочечное антитело.

Дополнительно, белок, в котором последовательность аминокислот, содержащая целую или часть иммуноглобулиновой тяжелой цепи переменной области, связана, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, дополнительно связана, на ее С-концевой стороне, с последовательностью аминокислот целой или части иммуноглобулиновой легкой цепи переменной области, и который обладает способностью специфически связываться с определенным антигеном, также включен в термин "одноцепочечное антитело" в соответствии с данным изобретением. В одноцепочечном антителе, в котором иммуноглобулиновая тяжелая цепь связана, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность, с иммуноглобулиновой легкой цепью, иммуноглобулиновая тяжелая цепь обычно не имеет Fc область. Иммуноглобулиновая легкая цепь переменной области имеет три определяющие комплементарность области (ОКО), которые участвуют в определении антигенной специфичности антитела. Так же, иммуноглобулиновая тяжелая цепь переменной области также имеет три ОКО. Эти ОКО являются первичными областями, которые определяют антигенную специфичность антитела. Поэтому одноцепочечное антитело предпочтительно, содержит все три ОКО иммуноглобулиновой тяжелой цепи и все три ОКО иммуноглобулиновой легкой цепи. Однако также возможно получить одноцепочечное антитело, в котором одна или более ОКО удалены, поскольку антиген-специфическое сродство антитела сохраняется.

В одноцепочечном антителе, линкерная последовательность, расположенная между легкой цепью и тяжелой цепью иммуноглобулина, является пептидной цепью, состоящей из, предпочтительно, 2-50, более предпочтительно, 8-50, еще более предпочтительно, 10-30, даже более предпочтительно, 12-18, или 15-25, например, 15 или 25 аминокислотных остатков. Хотя не существует конкретного ограничения определенной последовательности аминокислот такой линкерной последовательности, пока анти-hTfR антитело, содержащее обе цепи, связанные между собой, сохраняет сродство к hTfR, предпочтительно, его получают только из глицина или из глицина и серина. Например, существует последовательность аминокислот Gly-Ser, последовательность аминокислот Gly-Gly-Ser, последовательность аминокислот Gly-Gly-Gly, последовательность аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:3), последовательность аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:4), последовательность аминокислот Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:21) или последовательность, которая включает последовательность, соответствующую 2-10 или 2-5 из любых этих последовательностей аминокислот, связанных последовательно. Например, при связывании последовательности аминокислот всей иммуноглобулиновой тяжелой цепи переменной области на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность, с иммуноглобулиновой легкой цепью переменной области, предпочтительной линкерной последовательностью, состоящей из всего 15 аминокислот, соответствующих трем из последовательностей аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:3), связанных последовательно.

В данном изобретении термин "человеческий трансферриновый рецептор" или

"hTfR" относится к мембранному белку, имеющему последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO:5. Анти-hTfR антителом в соответствии с данным изобретением является, в одном из вариантов, такое, которое связывается с областью цистеинового остатка в положении 89 от N-конца с фенилаланином на C-конце в последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO:5 (внеклеточная область hTfR), хотя и не ограничено этим вариантом. Далее в данном изобретении термин "обезьяний трансферриновый рецептор" или "обезьяний TfR" относится к, в частности, мембранному белку, имеющему последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 6, полученную от яванского макака (*Macaca fascicularis*). Анти-hTfR антитело одного варианта данного изобретения также связывается с областью от цистеинового остатка в положении 89 от N-конца с фенилаланином на C-конце в последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO:6 (внеклеточная область обезьяньего TfR).

В качестве способа получения антитела против hTfR обычно применяют создание рекомбинантного человеческого трансферринового рецептора (rhTfR) с применением клеток, трансдуцированных с векторами экспрессии, включающими hTfR гены и иммунизация животного, такого как мышь, этим rhTfR. Клетки гибридомы, способные образовывать антитело, могут быть получены сбором производящих антитело клеток против hTfR от животного после иммунизации и слияния клеток с клетками миеломы.

Кроме того, клетки, вырабатывающие антитело к hTfR, также могут быть получены сбором иммуноцитов от животного, такого как мышь, и иммунизацией их rhTfR через *in vitro* иммунизацию. При проведении иммунизации *in vitro* иммунизацией нет конкретных ограничений по видам животных, от которых получают иммуноциты, хотя предпочтительными являются мышь, крыса, кролик, морская свинка, собака, кошка, лошадь и приматы, включая человека, и более предпочтительными являются мышь, крыса и человек, и еще более предпочтительно, мышь и человек. В качестве мышинных иммуноцитов могут применяться клетки селезенки, полученные из мышинной селезенки, например. В качестве человеческих иммуноцитов могут применяться такие клетки, которые получают из человеческой периферической крови, костного мозга, селезенки и подобных. Иммунизацией человеческих иммуноцитов через *in vitro* иммунизацию может быть получено человеческое антитело к hTfR.

После иммунизации клеток иммунной системы через *in vitro* иммунизацию, клетки сливают с клетками миеломы с получением клеток гибридомы, способных образовывать антитела. Кроме того, также возможно экстрагировать мРНК из клеток после иммунизации для синтеза кДНК, амплифицируя фрагменты ДНК, содержащие гены, кодирующие легкую и тяжелую цепь иммуноглобулина, ПЦР реакцией с применением этой кДНК в качестве шаблона, и искусственно воссоздавать гены антитела с применением амплифицированных фрагментов ДНК.

Клетки гибридомы, полученные указанным выше способом, также включают клетки, вырабатывающие антитела, которые распознают белки, отличные от hTfR, как антигены. Также все клетки гибридомы, образующие анти-hTfR антитела, не обязательно

вырабатывают анти-hTfR антитела, которые демонстрируют желаемое сродство к hTfR.

Также искусственно восстановленные гены антитела включают такие гены, которые кодируют антитела, распознающие другие белки, отличные от hTfR, в качестве антигенов. Более того, не все гены, кодирующие анти-hTfR антитела, обязательно имеют желаемые свойства, такие как кодирование анти-hTfR антитела, демонстрирующего высокое сродство к hTfR.

Поэтому стадия выбора обязательна для выбора клеток гибридомы, вырабатывающих антитело, имеющее желаемые свойства (такие как высокое сродство к hTfR), из свежее полученных клеток гибридомы, как описано выше. Кроме того, в случае, когда гены антитела искусственно реконструированы, стадия выбора необходима для выбора из генов антитела, кодирующих антитело, имеющее желаемые свойства (такие как высокое сродство к hTfR).

Например, для выбора клеток гибридомы, которые вырабатывают высокоаффинные антитела к анти-hTfR антителу, применяется способ, в котором рекомбинантный hTfR добавляют в планшет и выдерживают в нем, затем добавляют надосадочную жидкость культуры клеток гибридомы, и после удаления антител, не связанных с рекомбинантным hTfR из планшета, измеряют количество антител, оставшееся в планшете. Согласно этого способа, чем выше сродство к hTfR антитела, содержащегося в надосадочной жидкости культуры клеток гибридомы, добавленной в планшет, тем выше становится количество антител, содержащихся в планшете. Поэтому измерение количества антител, содержащихся в планшете, позволяет выбрать такие клетки гибридомы, которые соответствуют планшетам, в которых антитела хранятся в большем количестве в виде колоний клеток, вырабатывающих анти-hTfR антитела, имеющие относительно высокое сродство к hTfR. Также возможно выделять ген, кодирующий антитело с высоким сродством, через экстрагирование мРНК из каждой колонии клеток, выбранных таким образом, синтезируя кДНК, и амплификацию фрагмента ДНК, содержащего ген, кодирующий анти-hTfR антитело через ПЦР с применением кДНК в качестве шаблона.

Для выбора гена, кодирующего высокоаффинное анти-hTfR антитело, из искусственно реконструированных выше генов антитела, искусственно реконструированные гены антитела один раз встраивают в вектор экспрессии, и вектор экспрессии затем встраивают в клетки хозяина. Хотя нет конкретных ограничений для клеток, применяемых в качестве клеток хозяина, даже если они являются прокариотами, эукариотами, поскольку они могут экспрессировать ген антитела после введения вектора экспрессии, имеющего встроенный искусственно реконструированный ген антитела, предпочтительными являются клетки, происходящие от млекопитающих, таких как человек, мышь, китайский хомяк и подобные, и особенно предпочтительными являются клетки СНО, происходящие из клеток яичника китайского хомяка, или клетки NS/O, происходящие из миеломы мыши. Кроме того, не существует конкретных ограничений вектора экспрессии, применяемого для встраивания гена, кодирующего антитело, и его

экспрессии, и может применяться любой вектор экспрессии, пока он может экспрессировать ген, будучи встроенным в клетки млекопитающего. Ген, встроенный в вектор экспрессии, расположен ниже последовательность ДНК, которая может регулировать частоту транскрипции гена в клетках млекопитающего (регуляторный участок экспрессии гена). Примеры регуляторных участков экспрессии гена, которые могут применяться в соответствии с данным изобретением, включают промотор, полученный из цитомегаловируса, ранний промотор SV40, промотор человеческого фактора элонгации-1 α (EF-1 α), промотор человеческого убиквитина С.

Клетки млекопитающих, имеющие такой встроенный вектор экспрессии, предназначены для экспрессии антител, кодируемых искусственно реконструированным геном выше, встроены в вектор экспрессии. Для выбора таких клеток, которые вырабатывают высокоаффинные антитела к анти-hTfR антителу из полученных выше клеток, экспрессирующего искусственно реконструированное антитело, применяют способ, в котором рекомбинантный hTfR добавляют в планшет и выдерживают в нем, затем рекомбинантный hTfR подвергают контакту с надосадочной жидкостью культуры клеток, и после удаления антител, не связанных с рекомбинантным hTfR из планшета, измеряют количество антител, оставшихся в планшете. Согласно этому способу, чем выше сродство к hTfR антител, содержащихся в надосадочной жидкости клеточной культуры, тем больше становится количество антител, оставшихся в планшете. Поэтому через измерение количества антител, оставшихся в планшете, можно выбрать такие клетки, которые соответствуют планшету, где антитело содержится в большем количестве, в качестве колонии клеток, вырабатывающих анти-hTfR антитело, имеющее относительно высокое сродство к анти-hTfR антителу, и в перспективе можно выбрать ген, кодирующий анти-hTfR антитело, имеющее высокое сродство анти-hTfR антитела к hTfR. При применении колонии клеток, выбранных таким образом, можно провести ПЦР для амплификации ДНК фрагмента, содержащего ген, кодирующий анти-hTfR антитело для выделения гена, кодирующего антитело с высоким сродством.

Выбор гена, кодирующего анти-hTfR антитело с высоким сродством из искусственно реконструированных выше генов антител, также может проводиться встраиванием искусственно реконструированных генов антител в вектор экспрессии, встраивая вектор экспрессии в клетки *E. coli*, культивируя клетки *E. coli* и выбирая клетки *E. coli*, имеющие желаемый ген, таким же образом, как при описанном выше выборе клеток гибридомы, с применением надосадочной жидкости культуры клеток *E. coli* или раствора, содержащего антитело, полученного лизированием клеток *E. coli*. Выбранные таким образом клетки *E. coli* экспрессируют ген, кодирующий анти-hTfR антитело, имеющее относительно высокое сродство к hTfR. Из этой колонии клеток может быть выделен ген, кодирующий анти-hTfR антитело, имеющее относительно высокое сродство анти-hTfR антитела к hTfR. Для того, чтобы позволить секрецию антитела в культуральную надосадочную жидкость *E. coli*, ген антитела может быть встроен в вектор экспрессии так, что последовательность сигнала секреции присоединена на N-концевой

стороне гена.

Другим способом выбора гена, кодирующего анти-hTfR антитело с высоким сродством, является способ, в котором антитело, кодированное искусственно воспроизведенным выше геном антитела, экспрессируется и остается в фаговых частицах. Для этого ген антитела воспроизводят в виде гена, кодирующего одноцепочечное антитело. Способ сохранения фаговых частиц для удержания антитела на их поверхности описан в международных публикациях WO1997/09436 и WO1995/11317 и подобных, и, следовательно, хорошо известен. Для выбора фагов, удерживающих антитело с высоким сродством к анти-hTfR антителу, из фагов, удерживающих антитело, кодированные искусственно воспроизведенными генами антитела, применяется способ, в котором рекомбинантный hTfR из планшета добавляют в планшет и выдерживают там, позволяя контактировать с фагами, и после удаления фагов, не связанных с рекомбинантным hTfR, измеряют количество фагов, оставшихся в планшете. Согласно этому способу, чем выше сродство с hTfR антитела, удержанного на фаговых частицах, тем больше становится количество фага, оставшегося в планшете. Поэтому через измерение количества фагов, оставшихся в планшете, можно выбрать фаговые частицы, соответствующие планшету, где фаги остались в большем количестве, в качестве фаговых частиц, вырабатывающих анти-hTfR антитело, имеющее анти-hTfR антитело с относительно высоким сродством к hTfR, и затем можно выбрать ген, кодирующий анти-hTfR антитело с высоким сродством к hTfR. Применяя выбранные таким образом фаговые частицы проводят ПЦР для амплификации ДНК фрагмента, содержащего ген, кодирующий анти-hTfR антитело, и выделяют ген, кодирующий антитело с высоким сродством.

Возможно получить кДНК или фаговую ДНК из полученных выше клеток, таких как клетки гибридомы, вырабатывающих антитело с высоким сродством к анти-hTfR, или из полученных выше фаговых частиц, удерживающих антитело с высоким сродством к анти-hTfR, и провести ПЦР или подобную реакцию с применением их в качестве шаблона для амплификации и выделения ДНК фрагмента, содержащего ген, кодирующий всю или часть легкой цепи анти-hTfR антитела, тяжелой цепи анти-hTfR антитела или одноцепочечного антитела в качестве анти-hTfR антитела. Таким же образом возможно провести ПЦР или подобную реакцию для амплификации и выделения ДНК фрагмента, содержащего ген, кодирующий всю или часть легкой цепи переменной области анти-hTfR антитела, или ДНК фрагмента, содержащего ген, кодирующий всю или часть тяжелой цепи переменной области анти-hTfR антитела.

Анти-hTfR антитело с высоким сродством может быть получено встраиванием целого или части гена, кодирующего легкую цепь и тяжелую цепь этого анти-hTfR антитела с высоким сродством в вектор экспрессии, трансформируя клетки хозяина, такие как клетки млекопитающего, таким вектором экспрессии, и культивированием полученных трансформированных клеток. Применяя нуклеотидную последовательность выделенного гена, кодирующего анти-hTfR антитело, также возможно транскрибировать последовательность аминокислот анти-hTfR антитела и искусственно синтезировать

фрагмент ДНК, кодирующий ту же последовательность аминокислот. При искусственном синтезе фрагмента ДНК, уровень экспрессии анти-hTfR антитела в клетках хозяина может быть улучшен правильным выбором кодонов.

Для встраивания мутации, такой как замещение, делеция, добавление и подобное, в последовательность аминокислот исходного анти-hTfR антитела, мутация может быть встроена желательным образом в ген, кодирующий анти-hTfR антитело, содержащееся в выделенном фрагменте ДНК. Хотя ген, кодирующий мутированное анти-hTfR антитело, имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, с исходным геном, не существует конкретного ограничения уровня гомологии, пока сродство к hTfR не потеряно. При встраивании мутации в последовательность аминокислот для модификации количества или типа сахарных цепей, связанных с анти-hTfR антителом, возможно улучшить стабильность анти-hTfR антитела в теле.

При введении мутации в ген, кодирующий всю или часть легкой цепи переменной области анти-hTfR антитела, мутированный таким образом ген имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, с исходным геном, хотя не существует конкретного ограничения уровня гомологии, пока сродство к hTfR не потеряно. При замещении одной или более аминокислот последовательности аминокислот легкой цепи переменной области другими аминокислотами, количество замещаемых аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно, 1-5, еще более предпочтительно, 1-3, и даже более предпочтительно, 1 или 2. При удалении одной или более аминокислот из последовательности аминокислот легкой цепи переменной области, количество удаляемых аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно, 1-5, еще более предпочтительно, 1-3, даже более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких замещений и делеций. При добавлении одной или более аминокислот к легкой цепи переменной области, они могут быть добавлены внутри или на N-концевой стороне или C-концевой стороне последовательности аминокислот легкой цепи переменной области, и количество добавленных аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно, 1-5, еще более предпочтительно, 1-3, и даже более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких добавлений, замещений и делеций. Мутированная таким образом последовательность аминокислот легкой цепи переменной области имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, еще более предпочтительно, не менее 95% с последовательностью аминокислот исходной легкой цепи переменной области. В частности, при замещении одной или более аминокислот последовательности аминокислот ОКО другими аминокислотами, количество замещаемых аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1 или 2. При удалении одной или более аминокислот последовательности аминокислот ОКО, количество удаляемых аминокислот предпочтительно составляет, 1-5, более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться

объединенная мутация таких замещений и делеций аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот, они могут быть добавлены внутри или на N-концевой стороне или C-концевой стороне последовательности аминокислот, и количество добавленных аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких добавлений, замещений и делеций аминокислот. Последовательность аминокислот соответствующего мутированного ОКО имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, еще более предпочтительно, не менее 95% с последовательностью аминокислот исходного ОКО.

При введении мутации в ген, кодирующий всю или часть тяжелой цепи переменной области анти-hTfR антитела, мутированный таким образом ген имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, с исходным геном, хотя не существует конкретного ограничения уровня гомологии, пока сродство к hTfR не потеряно. При замещении одной или более аминокислот последовательности аминокислот тяжелой цепи переменной области другими аминокислотами, количество замещаемых аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно, 1-5, еще более предпочтительно, 1-3, и даже более предпочтительно, 1 или 2. При удалении одной или более аминокислот из последовательности аминокислот тяжелой цепи переменной области, количество удаляемых аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно, 1-5, еще более предпочтительно, 1-3, даже более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких замещений и делеций. При добавлении одной или более аминокислот к тяжелой цепи переменной области, они могут быть добавлены внутри или на N-концевой стороне или C-концевой стороне последовательности аминокислот тяжелой цепи переменной области, и количество добавленных аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно, 1-5, еще более предпочтительно, 1-3, и даже более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких добавлений, замещений и делеций. Мутированная таким образом последовательность аминокислот тяжелой цепи переменной области имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, еще более предпочтительно, не менее 95% с последовательностью аминокислот исходной тяжелой цепи переменной области. В частности, при замещении одной или более аминокислот последовательности аминокислот ОКО другими аминокислотами, количество замещаемых аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1 или 2. При удалении одной или более аминокислот последовательности аминокислот ОКО, количество удаляемых аминокислот предпочтительно составляет, 1-5, более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких замещений и делеций аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот, они могут быть добавлены внутри или на N-концевой стороне или C-концевой стороне

последовательности аминокислот, и количество добавленных аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких добавлений, замещений и делеций аминокислот. Последовательность аминокислот соответствующего мутированного ОКО имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, еще более предпочтительно, не менее 95% с последовательностью аминокислот исходного ОКО.

Мутация может быть встроена в обе переменные области легкой цепи и тяжелой цепи анти-hTfR антитела объединение описанной выше мутации в легкой цепи переменной области анти-hTfR антитела и указанной выше мутации в тяжелой цепи переменной области анти-hTfR антитела.

Замещения аминокислот в последовательности аминокислот легкой и тяжелой цепей указанного выше анти-hTfR антитела другими аминокислотами включают замещение между аминокислотами, классифицированными в те же группы, как и ароматические аминокислоты (Phe, Trp, Tyr), алифатические аминокислоты (Gly, Ala, Leu, Ile, Val), аминокислоты амидного типа (Gln, Asn), основные аминокислоты (Lys, Arg, His), кислые аминокислоты (Glu, Asp), аминокислоты с гидроксильными группами (Ser, Thr), разветвленные аминокислоты (Val, Leu, Ile), аминокислоты с меньшими боковыми цепями (Gly, Ala, Ser, Thr, Met), аминокислоты с не полярными боковыми цепями (Ala, Val, Leu, Leu, Ile, Pro, Phe, Met). Ожидается, что замещение между такими аналогичными аминокислотами не вызывает никаких изменений в фенотипе белка (т.е. оно является консервативным замещением аминокислот). Примеры консервативных замещений аминокислот хорошо известны в данной области техники и описаны в разных ссылках (см., например, Bowie et al., Science, 247:1306-1310 (1990)).

При добавлении аминокислот к С-концевой или N-концевой стороне анти-hTfR антитела мутацией и связывание анти-hTfR антитела и лекарственного средства (включая физиологически активный белок), оказывающего свой действие в мышце, через аминокислоты, аминокислоты должны составлять часть анти-hTfR антитела в конъюгате.

Анти-hTfR антитело, полученное культивированием клеток, выбранных описанными выше способами и подобными, вырабатывающих анти-hTfR антитело, которое имеет относительно высокое сродство анти-hTfR антитела к hTfR, и анти-hTfR антитело, полученное экспрессией гена, кодирующего анти-hTfR антитело с высоким сродством, может быть модифицировано встраиванием мутации в их последовательности аминокислот, такой как замещение, делеция, добавление, для придания им желаемых свойств. Встраивание мутации в последовательность аминокислот анти-hTfR антитела может проводиться встраиванием мутации в ген, соответствующий последовательности аминокислот.

Сродство анти-hTfR антитела к hTfR может быть скорректировано по желанию встраиванием мутации, такой как замещение, делеция и добавление, в последовательность аминокислот переменной области антитела. Например, если антитело имеет такое высокое

сродство со своим антигеном, которое приводит к слишком низкой константе диссоциации в воде, существует вероятность, что антитело может, после введения в тело, не диссоциировать от антигена, тем самым приводя к функциональному недостатку. В этом случае наиболее предпочтительное антитело, подходящее для данной цели, может быть получено встраиванием мутации в переменную область антитела так, чтобы скорректировать постепенно константу диссоциации в 2-5 раз, 5-10 раз, 10-100 раз и так далее, от исходного антитела. Наоборот, константа диссоциации может быть скорректирована в 1/2-1/5 раза, 1/5-1/10 раза, 1/10-1/100 раза и так далее от исходного антитела встраиванием мутации.

Встраивание мутации, такой как замещение, делеция и добавление, в последовательность аминокислот анти-hTfR антитела может проводиться встраиванием мутации в определенные положения нуклеотидной последовательности гена либо, например, ПЦР или подобной реакцией с применением гена, кодирующего анти-hTfR антитело, в качестве шаблона, либо рандомным встраиванием мутации.

Встраивание мутации в последовательность аминокислот анти-hTfR антитела для корректировки сродства антитела к hTfR может проводиться, например, встраиванием гена, кодирующего анти-hTfR антитело, в виде одноцепочечного антитела в фагмид, получением с этим фагмидом фага с экспрессированным одноцепочечным антителом на поверхности его капсида, разрешением фагу размножиться при встраивании мутации в ген, кодирующий одноцепочечное антитело с применением мутагена или подобного, и выбором из размножившегося фага того фага, который экспрессирует одноцепочечное антитело, имеющее желаемую константу диссоциации либо способом, описанным выше, либо очисткой с применением антигенной колонки в определенных условиях.

Если антитело, имеющее относительно высокое сродство к hTfR и полученное описанным выше способом, в котором выбраны клетки, вырабатывающие антитело с высоким сродством, является антителом нечеловекоподобного животного, оно может быть превращено в гуманизованное антитело. Гуманизованным антителом является антитело, полученное с применением последовательности аминокислот части переменной области (например, целой или части ОКО) антитела нечеловекоподобного животного, и замещением подходящей области человеческого антитела последовательностью (имплантацией) при сохранении специфичности к антигену. Примеры гуманизованных антител включают антитело, полученное замещением трех определяющих комплементарность областей (ОКО) в легкой цепи иммуноглобулина и трех определяющих комплементарность областей (ОКО) в тяжелой цепи иммуноглобулина, составляющих человеческое антитело, на ОКО нечеловекоподобного животного. Хотя не существует конкретных ограничений для биологических видов, от которых получают ОКО, вводимые в человеческое антитело, пока они являются нечеловекоподобным животным, предпочтительно, они включают мышь, крысу, кролика, лошадь и нечеловекоподобного примата, более предпочтительно, мышь и крысу, и еще более предпочтительно, мышь. Хорошо известно, что может быть необходимо воспроизвести

исходную активность донорного антитела замещением соответствующей части человеческого антитела в качестве акцептора на последовательность аминокислот области вне ОКО, которая вовлечена в сохранение структуры ОКО или связывание с антигеном, а также ОКО антитела нечеловекоподобного животного. Область вне ОКО также называют каркасной областью (КО). Таким образом, получение гуманизированного антитела включает трансплантацию ОКО (и, необязательно, окружающих КО) антитела нечеловекоподобного животного вместо ОКО (и, необязательно, окружающих КО) переменных областей человеческого антитела.

Как указано выше, в гуманизированном антителе области антитела нечеловекоподобного животного, имплантированные в переменные области исходного человеческого антитела, обычно включают сами ОКО или ОКО и их соседнюю часть КО. Однако такие КО, имплантированные вместе с ОКО, также играют роль либо в сохранении структуры ОКО, либо в связывании с антигеном, и тем самым обладают существенной функцией в определении комплементарности антитела, и термин "ОКО" в соответствии с данным изобретением относится к таким областям, которые взяты или могут быть взяты из от антитела нечеловекоподобного животного и имплантированы в гуманизированное антитело, при получении гуманизированного антитела. Таким образом, область, в общем считающаяся находящейся в КО области, включена в ОКО в соответствии с данным изобретением, так как она играет роль либо в сохранении структуры ОКО, либо в связывании с антигеном, и тем самым обладает существенной функцией в определении комплементарности антитела.

Далее представлено подробное объяснение варианта, в котором анти-hTfR антителом является гуманизированное антитело или человеческое антитело. В легкой цепи человеческого антитела имеются цепи λ и κ . Легкой цепью, составляющей человеческое антитело, может быть любая из λ и κ цепей. И в человеческой тяжелой цепи имеются цепи γ , μ , α , σ и ϵ , которые соответствуют IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. Хотя тяжелой цепью, составляющей анти-hTfR антитело, может быть любая из γ , μ , α , σ и ϵ цепей, предпочтительной является γ цепь. Кроме того, в γ цепи человеческой тяжелой цепи имеются γ_1 , γ_2 , γ_3 и γ_4 цепи, которые соответствуют IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, соответственно. Если тяжелой цепью, составляющей анти-hTfR антитело, является γ цепь, хотя γ цепью может быть любая из γ_1 , γ_2 , γ_3 и γ_4 цепей, предпочтительной является γ_1 или γ_4 цепь. В случае, когда анти-hTfR антителом является гуманизированное антитело или человеческое антитело и IgG, легкой цепью человеческого антитела может быть либо λ цепь, либо κ цепь, и хотя тяжелой цепью человеческого антитела может быть любая из γ_1 , γ_2 , γ_3 и γ_4 цепей, предпочтительной является γ_1 или γ_4 цепь. Например, предпочтительный вариант анти-hTfR антитела включает такой, в котором легкой цепью является λ цепь и тяжелой цепью является γ_4 цепь, и такой, в котором легкой цепью является λ цепь и тяжелой цепью является γ_1 .

В соответствии с данным изобретением, фармацевтическим агентом, конъюгированным с анти-hTfR антителом, включая биологически активный белок,

является агент, оказывающий свое действие в мышце. Способы конъюгирования анти-hTfR антитела с таким агентом включают конъюгирование через не пептидный линкер или пептидный линкер. В качестве не пептидного линкера может применяться полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированный многоатомный спирт, поливиниловый спирт, полисахарид, декстран, поливиниловый эфир, биоразлагаемый полимер, липидный полимер, хитин и гиалуроновая кислота, их производное или их сочетание. Пептидным линкером является пептидная цепь, состоящая из пептид-связанных 1-50 аминокислот, или ее производное, где N-концевая и C-концевая стороны пептидного линкера образуют ковалентные связи с анти-hTfR антителом или агентом, соответственно, тем самым связывая анти-hTfR антитело и агент.

Конъюгат анти-hTfR антитела в соответствии с данным изобретением и фармацевтического агента с применением ПЭГ в качестве не пептидного линкера особенно предпочтителен в качестве анти-hTfR антитело-ПЭГ-агента. Анти-hTfR антитело-ПЭГ-агент может быть получен конъюгированием анти-hTfR антитела и ПЭГ с получением анти-hTfR антитело-ПЭГ с последующим конъюгированием анти-hTfR антитело-ПЭГ с агентом. Альтернативно, анти-hTfR антитело-ПЭГ-агент может быть получен конъюгированием фармацевтического агента с ПЭГ с получением агента-ПЭГ, и затем конъюгированием агента-ПЭГ с анти-hTfR антителом. ПЭГ, модифицированный функциональной группой, такой как карбонат, карбонилимидазол, активный сложный эфир карбоновой кислоты, азлактон, циклический имидотион, изоцианат, изотиоцианурат, имидат или альдегид, применяют для конъюгации ПЭГ с анти-hTfR антителом и агентом. Функциональная группа, введенная в ПЭГ, взаимодействует в основном с анти-hTfR антителом и аминогруппой молекулы агента, с получением ковалентной связи ПЭГ и hTfR антитела и агента. Не имеется конкретных ограничений по молекулярной массе и форме ПЭГ, применяемого здесь, но его средняя молекулярная масса (ММ) предпочтительно составляет от ММ=500 до 60000, более предпочтительно, от ММ=500 до 20000. Например, ПЭГ, имеющий среднюю молекулярную массу около 300, около 500, около 1000, около 2000, около 4000, около 10000, около 20000 или подобную, может подходящим образом применяться в качестве не пептидного линкера.

Например, "анти-hTfR антитело-ПЭГ" может быть получено смешиванием анти-hTfR антитела с полиэтиленгликолем, имеющим альдегидные группы в качестве функциональных групп (АЛД-ПЭГ-АЛД) так, что молярное отношение АЛД-ПЭГ-АЛД к антителу составляет 11, 12,5, 15, 110, 120 и подобное, и последующим добавлением к смеси восстанавливающего агента, такого как NaCNBH_3 , для проведения реакции. Затем анти-hTfR антитело-ПЭГ подвергают взаимодействию с фармацевтическим агентом с присутствием восстанавливающего агента, такого как NaCNBH_3 , с получением анти-hTfR антитело-ПЭГ-агента. Наоборот, анти-hTfR антитело-ПЭГ-агент также может быть получен сначала конъюгированием агента с АЛД-ПЭГ-АЛД с получением агента-ПЭГ, и затем конъюгированием агента-ПЭГ с анти-hTfR антителом.

Если фармацевтическим агентом является биологически активный белок (целевой белок), анти-hTfR антитело и целевой белок могут быть конъюгированы с С-концевой стороной или N-концевой стороной тяжелой или легкой цепи анти-hTfR антитела через линкерную последовательность или непосредственно, соответственно, с N-концевой стороной или С-концевой стороной целевого белка через пептидную связь. Слитый белок, полученный конъюгированием анти-hTfR антитела и целевого белка таким образом, может быть получен встраиванием фрагмента ДНК, в котором кДНК, кодирующая целевой белок, размещена в каркасе в векторе экспрессии для клетки млекопитающего последовательно или размещением последовательности ДНК, кодирующей линкерную последовательность, на 3'-концевой стороне или 5'-концевой стороне кДНК, кодирующей тяжелую или легкую цепь анти-hTfR антитела, и культивированием клетки млекопитающего, в которую встроены векторы экспрессии. В таких клетках млекопитающих если фрагмент ДНК, кодирующий целевой белок, связан с тяжелой цепью, вектор экспрессии для клетки млекопитающего, встраивающий фрагмент кДНК, кодирующий легкую цепь анти-hTfR антитела, также вводят в ту же клетку хозяина, и если фрагмент ДНК, кодирующий целевой белок, связан с легкой цепью, вектор экспрессии для клетки млекопитающего, встраивающий фрагмент кДНК, кодирующий тяжелую цепь анти-hTfR антитела, также вводят в ту же клетку хозяина. Если анти-hTfR антителом является одноцепочечное антитело, слитый белок, в котором конъюгированы анти-hTfR антитело и целевой белок, может быть получен встраиванием фрагмента ДНК, в котором кДНК, кодирующая одноцепочечное анти-hTfR антитело, связана на 5'-концевой стороне или 3'-концевой стороне кДНК, кодирующей целевой белок, непосредственно или с ДНК последовательностью, кодирующей линкерную последовательность, расположенную между ними, в вектор экспрессии (для эукариотной клетки, такой как клетка млекопитающего, дрожжи, или прокариотной клетки, такой как *E. coli*), и экспрессированием слитого белка в клетке, в которую встроены векторы экспрессии. Слитый белок должен пониматься как одна форма конъюгата.

В слитом белке такого типа, в котором фармацевтический агент связан с легкой цепью анти-hTfR антитела на ее С-концевой стороне, трансферриновый рецептор анти-человеческого антитела содержит последовательность аминокислот, включающую всю или часть легкой цепи переменной области и последовательность аминокислот, включающую всю или часть тяжелой цепи переменной области, и агент связан с легкой цепью этого трансферринового рецептора анти-человеческого антитела на ее С-концевой стороне. Здесь легкая цепь анти-hTfR антитела и агент могут быть связаны вместе, прямо или через линкер.

В слитом белке такого типа, в котором фармацевтический агент связан с тяжелой цепью анти-hTfR антитела на ее С-концевой стороне, трансферриновый рецептор анти-человеческого антитела содержит последовательность аминокислот, включающую целую или часть легкой цепи переменной области и последовательность аминокислот, включающую целую или часть тяжелой цепи переменной области, и агент связан с

тяжелой цепью этого трансферринового рецептора анти-человеческого антитела на ее С-концевой стороне. Здесь тяжелая цепь анти-hTfR антитела и агент могут быть связаны вместе, прямо или через линкер.

В слитом белке того типа, в котором фармацевтический агент связан с легкой цепью анти-hTfR антитела на ее N-концевой стороне, трансферриновый рецептор анти-человеческого антитела содержит последовательность аминокислот, включающую всю или часть легкой цепи переменной области и последовательность аминокислот, включающую всю или часть тяжелой цепи переменной области, и агент связан с легкой цепью этого трансферринового рецептора анти-человеческого антитела на ее N-концевой стороне. Здесь легкая цепь анти-hTfR антитела и агент могут быть связаны вместе, прямо или через линкер.

В слитом белке такого типа, в котором фармацевтический агент связан с тяжелой цепью анти-hTfR антитела на ее N-концевой стороне, трансферриновый рецептор анти-человеческого антитела содержит последовательность аминокислот, включающую целую или часть легкой цепи переменной области и последовательность аминокислот, включающую целую или часть тяжелой цепи переменной области, и агент связан с тяжелой цепью этого трансферринового рецептора анти-человеческого антитела на ее N-концевой стороне. Здесь тяжелая цепь анти-hTfR антитела и агент могут быть связаны вместе, прямо или через линкер.

В описанных выше вариантах, линкерная последовательность, расположенная между анти-hTfR антителом и агентом, может быть пептидной цепью, включающей, предпочтительно, 1-50, более предпочтительно, 1-17, еще более предпочтительно, 1-10, даже более предпочтительно, 1-5 аминокислот, с в соответствии с агентом, связываемым с анти-hTfR антителом, количество аминокислот линкерной последовательности может быть скорректировано до 1, 2, 3, 1-17, 1-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29, и т.д., при желании. Хотя нет конкретного ограничения по последовательности аминокислот линкерной последовательности, пока связанное ей анти-hTfR антитело сохраняет сродство к hTfR и агент, связанный линкерной последовательностью также демонстрирует собственную физиологическую активность белка в физиологических условиях, линкер, предпочтительно, может быть составлен из глицина и серина. Такие линкерные последовательности предпочтительно, но не ограничиваясь ими, включают такие, которые состоят из глицина и серина, например, последовательность аминокислот Gly-Ser, последовательность аминокислот Gly-Gly-Ser, последовательность аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), последовательность аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4) или последовательность, составленную из 1-50 аминокислот, в которой эти последовательности аминокислот повторяются от 1 до 10 или от 2 до 5 раз, или последовательность, в которой эти последовательности аминокислот повторяются от 2 до 17, от 2 до 10, от 10 до 40, от 20 до 34, от 23 до 31 или от 25 до 29 раз, и т.д., пока связанное анти-hTfR антитело сохраняет сродство к hTfR, и целевой белок, связанный линкерными последовательностями, может оказывать физиологическое действие белка в

физиологических условиях. Например, линкер, имеющий последовательность аминокислот Gly-Ser, может подходящим образом применяться в качестве линкерной последовательности.

В случае, когда анти-hTfR антителом является гуманизированное антитело или человеческое антитело, анти-hTfR антитело и целевой белок может быть связан вместе через связывание анти-hTfR антитела на N-конце (или С-конце) тяжелой цепи или легкой цепи, через линкерную последовательность или непосредственно, с С-концом (или N-концом), соответственно, целевого белка, пептидными связями. При связывании целевого белка с тяжелой цепью анти-hTfR антитела на его N-концевой стороне (или на С-концевой стороне), С-конец (или N-конец), соответственно, целевого белка связан с N-концом (или С-концом) γ , μ , α , σ или ϵ цепи анти-hTfR антитела, через линкерную последовательность или прямо, пептидными связями. При связывании целевого белка с легкой цепью анти-hTfR антитела на его N-концевой стороне (или С-концевой стороне), С-конец (или N-конец), соответственно, целевого белка связан с N-концом (или С-концом) λ цепи и к цепи анти-hTfR антитела, через линкерную последовательность или прямо, пептидными связями. Однако в случае, когда анти-hTfR антитело состоит из Fab области или Fab области и целой или части шарнирной области (Fab, $F(ab')_2$ и $F(ab')$), целевой белок может быть связан на его С-конце (или N-конце) и через линкерную последовательность или прямо, с N-концом (или С-концом), соответственно, тяжелой цепи или легкой цепи, которая составляет Fab, $F(ab')_2$ и $F(ab')$, пептидными связями.

В слитом белке анти-hTfR антитела и целевого белка, где анти-hTfR антителом является одноцепочечное антитело, последовательность аминокислот, включая целую или часть переменной области иммуноглобулиновой легкой цепи и последовательность аминокислот, включающую всю или часть переменной области иммуноглобулиновой тяжелой цепи связаны, в основном через линкерную последовательность. Поскольку сродство анти-hTfR антитела с hTfR сохраняется, последовательность аминокислот, полученная из легкой цепи, может быть связана, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью которая, в свою очередь, связана, на ее С-концевой стороне, с последовательностью аминокислот, полученной из тяжелой цепи или, наоборот, последовательность аминокислот, полученная из тяжелой цепи, может быть связана, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью которая, в свою очередь, связана, на ее С-концевой стороне, с последовательностью аминокислот, полученной из легкой цепи. То же самое может быть установлено, когда одноцепочечным антителом является scFv.

В одноцепочечном антителе, линкерная последовательность, расположенная между легкой цепью и тяжелой цепью иммуноглобулина, предпочтительно составляет пептидную цепь, состоящую из, предпочтительно, 2-50, более предпочтительно, 8-50, еще более предпочтительно, 10-30, даже более предпочтительно, 12-18 или 15-25, например 15 или 25 аминокислотных остатков. Такая линкерная последовательность предпочтительно состоит, но не ограничена ей, из такой, которая состоит только из глицина или из глицина

и серина, например, последовательности аминокислот Gly-Ser, последовательности аминокислот Gly-Gly-Ser, последовательности аминокислот Gly-Gly-Gly, последовательности аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), последовательности аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4) или последовательности, в которой эти последовательности аминокислот повторяются от 2 до 10 или от 2 до 5 раз, пока анти-hTfR антитело, к которому привязаны обе цепи, сохраняет сродство к hTfR, и целевой белок, связанный с антителом, оказывает свое физиологическое действие в физиологических условиях. В качестве предпочтительного варианта линкерной последовательности представлена последовательность, состоящая из 15 аминокислот, в которой последовательность аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3) повторяется три раза.

Если анти-hTfR антителом является одноцепочечное антитело, такой слитый белок может быть получен, например, трансформацией клеток хозяина, таких как клетки млекопитающего, вектором экспрессии, имеющим встроенный фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, и последующим культивированием клеток хозяина.

Кроме того, в данном изобретении, если пептидная цепь включает множество линкерных последовательностей, каждая из этих линкерных последовательностей обозначена, с N-концевой стороны, как первая линкерная последовательность, вторая линкерная последовательность и так далее, для удобства.

Целевой белок для конденсации с анти-hTfR антителом особенно не ограничен, поскольку белок должен функционировать в мышце. Предпочтительные целевые белки включают, например, лизосомный фермент, кодируемый геном, отвечающим за лизосомные заболевания, которые вызывают мышечную дисфункцию. Такой лизосомный фермент включает человеческую кислую α -глюкозидазу (hGAA) и человеческую α -галактозидазу А, но не ограничен ими, также включает α -L-идуронидазу (IDUA), идуронат-2-сульфатазу (IDS), глюкоцереброзидазу (GBA), β -галактозидазу, GM2 активирующий белок, β -гексозаминидазу А, β -гексозаминидазу В, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу, α -маннозидазу (LAMAN), β -маннозидазу, галактозилцерамидазу (GALC), сапосин С, арилсульфатазу А (ARSA), α -L-фукозидазу (FUCA1), аспартилглюкозаминидазу, α -N-ацетилгалактозаминидазу, кислую сфингомиелиназу (ASM), β -глюкуронидазу (GUSB), гепаран N-сульфатазу (SGSH), α -N-ацетилглюкозаминидазу (NAGLU), ацетил-CoA: α -глюкозаминид N-ацетилтрансферазу, N-ацетилглюкозамин-6-сульфатсульфатазу, кислую церамидазу (AC), амило-1,6-глюкозидазу, сиалидазу, аспартилглюкозаминидазу, пальмитоилпротеинтиоэстеразу-1 (PPT-1), трипептидилпептидазу-1 (TPP-1), гиалуронидазу-1, CLN1, CLN2, и подобные.

Здесь слитый белок анти-hTfR антитела и лизосомного фермента будет описан более подробно, принимая кислую α -глюкозидазу и α -галактозидазу А в качестве примеров.

При введении пациенту с болезнью Помпе, слитый белок анти-hTfR антитела и

человеческой кислой α -глюкозидазы (hGAA) вводят в мышечные клетки пациента и транспортируют в лизосомы. Таким образом, он разлагает гликоген, аккумулированный в лизосомах мышечных клеток пациента с болезнью Помпе. В случае болезни Помпе, целью являются мышцы, состоящие в основном из клеток скелетной мышцы, и мышцы, состоящие в основном из клеток сердечной мышцы. При болезни Помпе, функциональное ухудшение сердечной и скелетной мышц является основным симптомом, но при введении этого слитого белка, гликоген, аккумулированный в клетках скелетной мышцы и клетках сердечной мышцы, разлагается, что приводит к улучшению симптомов, таких как принудительное расширение, мышечная слабость на основе инвазии скелетной мышцы, и слабость напряжения мышц. Таким образом, слитый белок анти-hTfR антитела и человеческой кислой α -глюкозидазы может применяться в качестве терапевтического агента для дисфункции скелетных мышц и/или сердечных расстройств при болезни Помпе.

Подходящие примеры слитых белков анти-hTfR антитела и человеческой кислой α -глюкозидазы включают слитый белок человеческой кислой α -глюкозидазы и анти-hTfR антитела, где легкая цепь гуманизированного анти-hTfR антитела имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и где тяжелая цепь гуманизированного анти-hTfR антитела связана с человеческой кислой α -глюкозидазой на ее С-концевой стороне через линкерную последовательность Gly-Ser, и полностью имеет аминокислоты, описанные как SEQ ID NO: 27.

Другим примером является слитый белок человеческой кислой α -глюкозидазы и анти-hTfR антитела, где слитый белок содержит легкую цепь анти-hTfR антитела, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь анти-hTfR антитела, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 25, и связан на своей С-концевой стороне с человеческой кислой α -глюкозидазой, описанной как SEQ ID NO: 1, через линкерную последовательность (Gly Ser).

При введении пациенту с болезнью Фабри, слитый белок анти-hTfR антитела и человеческой α -галактозидазы А (h α -GalA) вводят в мышечные клетки пациента и транспортируют в лизосомы. Таким образом, он разлагает тригексозилцерамид, аккумулированный в лизосомах мышечных клеток пациента с болезнью Фабри. В случае болезни Фабри, целью являются мышцы, состоящие в основном из клеток сердечной мышцы. При болезни Фабри обнаружены сердечнососудистые аномалии, но при введении этого слитого белка тригексозилцерамид, аккумулированный в клетках сердечной мышцы, разлагается, что может улучшить различные симптомы сердечнососудистых аномалий, таких как расширение желудочков. Этот слитый белок особенно эффективен при сердечной болезни Фабри, атипическом типе болезни Фабри, при котором преимущественно поражается сердце. Таким образом, слитый белок анти-hTfR антитела и человеческой α -галактозидазы А может применяться в качестве терапевтического агента для сердечных расстройств при болезни Фабри, в частности, сердечной болезни Фабри.

Подходящие примеры слитых белков анти-hTfR антитела и человеческой α -галактозидаз А включают слитый белок человеческой α -галактозидазы А и анти-hTfR антитела, где легкая цепь гуманизированного анти-hTfR антитела имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и где тяжелая цепь гуманизированного анти-hTfR антитела связана с человеческой α -галактозидазой А на ее С-концевой стороне через линкерную последовательность Gly-Ser, и полностью имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 29.

Другим примером является слитый белок человеческой кислой α -глюкозидазы и анти-hTfR антитела, где слитый белок содержит легкую цепь анти-hTfR антитела, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь анти-hTfR антитела, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 25, и связан на ее С-концевой стороне с человеческой α -галактозидазой А, описанной как SEQ ID NO: 2, через линкерную последовательность (Gly Ser).

Конъюгат анти-hTfR антитела и фармацевтического агента может применяться в виде фармацевтической композиции, вводимой в кровь для оказания терапевтического действия в мышце. Такое лекарственное средство в общем вводят пациенту внутривенной инъекцией, такой как внутривенная капельная инъекция, подкожной инъекцией, внутримышечной инъекцией или подобными, но способ введения особенно не ограничен.

Конъюгат анти-hTfR антитела и агента в соответствии с данным изобретением может быть предоставлен в медицинское учреждение в виде фармацевтической композиции в форме лиофилизированного продукта, водного раствора или подобного. В случае водного раствора, фармацевтическая композиция может быть предоставлена в виде состава, герметично закрытого во флаконе или шприце, предварительно растворенного в растворе, содержащем стабилизатор, буфер, изотонический агент. Состав, герметично закрытый в шприце, обычно называют составом с предварительно наполненным шприце. Состав в предварительно наполненном шприце может упростить введение лекарственного средства самим пациентом.

Если представлен водный препарат, концентрация конъюгата в водном препарате составляет, например, 1-4 мг/мл, хотя он может быть скорректирован при желании в соответствии с дозой. Если нет конкретных ограничений по стабилизаторам, содержащимся в водном препарате, пока они являются фармацевтически доступными, предпочтительно могут применяться неионные поверхностно-активные вещества. Примеры таких неионных поверхностно-активных веществ включают полисорбат и полуксамер, любой из которых может применяться отдельно или в сочетании. Из полисорбатов предпочтительно применяют полисорбат 20 и полисорбат 80. В качестве полуксамера особенно предпочтительным является полуксамер 188 (полиоксиэтилен (160) полиоксипропилен (30) гликоль). Кроме того, концентрация неионного поверхностно-активного вещества, содержащегося в водном препарате, предпочтительно составляет 0,01-1 мг/мл, более предпочтительно, 0,01-0,5 мг/мл, и еще более предпочтительно, 0,1-0,5 мг/мл. В качестве стабилизаторов также могут применяться аминокислоты, такие как

гистидин, аргинин, метионин и глицин. При применении в качестве стабилизатора, концентрация аминокислоты в водном препарате предпочтительно составляет 0,1-40 мг/мл, более предпочтительно, 0,2-5 мг/мл, и еще более предпочтительно, 0,5-4 мг/мл. Хотя не конкретных ограничений по буферу, содержащемуся в водном препарате, пока он является фармацевтически доступным, предпочтительным является фосфатный буфер, и более предпочтительным является буфер на основе фосфата натрия. При применении в качестве буфера, концентрация фосфата натрия предпочтительно составляет, 0,01-0,04 М. рН водного препарата, скорректированный буфером, предпочтительно составляет, 5,5-7,2. Хотя не конкретных ограничений по изотонирующему агенту, содержащемуся в водном препарате, пока он является фармацевтически доступным, предпочтительно применяют хлорид натрия или маннит, отдельно или в сочетании в качестве изотонического агента.

Примеры

Хотя данное изобретение описано более подробно ниже со ссылкой на примеры, не предполагается, что настоящее изобретение ограничено этими примерами.

[Пример 1] Конструирование вектора экспрессии hTfR

Применяя кДНК человеческой селезенки Quick Clone (Clontech Inc.) в качестве шаблона и применяя праймер hTfR5' (SEQ ID NO:7) и праймер hTfR3' (SEQ ID NO:8), проводят ПЦР для усиления фрагмента гена, кодирующего человеческий трансферриновый рецептор (hTfR). Усиленный фрагмент, кодирующий hTfR, расщепляют MluI и NotI, и затем вставляют между сайтами MluI и NotI вектора pCI-neo (Promega Inc.). Полученный таким образом вектор обозначают как pCI-neo(hTfR). Затем этот вектор расщепляют с MluI и NotI для того, чтобы отрезать фрагмент гена, кодирующий hTfR, и этот фрагмент вставляют между сайтами MluI и NotI pE-mIRES-GS-puro, вектора экспрессии, описанного в международной публикации WO 2012/063799 для конструирования hTfR вектора экспрессии, pE-mIRES-GS-puro(hTfR).

[Пример 2] Получение рекомбинантного hTfR

В клетки CHO-K1 вводят pE-mIRES-GS-puro(hTfR) электропорацией, и клетки затем подвергают селективному культивированию в среде CD OptiCHO™ (Invitrogen Inc.), содержащей сульфоксимин метионина (MSX) и пирамицин для получения клеток, экспрессирующих рекомбинантный hTfR. Культивируют клетки, экспрессирующие рекомбинантный hTfR, и получают рекомбинантный hTfR.

[Пример 3] Иммунизация мыши рекомбинантным hTfR

Мышей иммунизируют рекомбинантным hTfR, полученным в примере 2, в качестве антигена. Иммунизацию проводят внутривенной или внутривентральной инъекцией антигена мыши.

[Пример 4] Получение гибридом

Примерно через одну неделю после последней инъекции селезенки мышей усекают и гомогенизируют для выделения клеток селезенки. Полученные таким образом клетки селезенки конденсируют с клетками колонии клеток мышинной миеломы (P3.X63.Ag8.653) пропиленгликолем способом. После слияния клеток, клетки суспендируют в среде

RPМI 1640, содержащей добавку (1X) НАТ (Life Technologies Inc.) и фетальную телячью сыворотку 10% Ultra low IgG (Life Technologies Inc.), и суспензию клеток распределяют в 20 лунок 96-луночных планшетов, 200 мкл/лунку. После культивирования клеток в течение 10 дней в инкубаторе с газообразной двуокисью углерода (37°C, 5% CO₂), каждую лунку исследуют под микроскопом, и выбирают лунки, которые содержат одну колонию. Когда клетки в каждой лунке почти достигают конfluence, надосадочную жидкость клеточной культуры собирают как надосадочную жидкость клеточной культуры гибридомы, и подвергают следующему процессу скрининга.

[Пример 5] Скрининг колоний клеток, вырабатывающих высокоаффинные антитела

Раствор рекомбинантного hTfR (Sino Biologics Inc.) разводят 50 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 9,5-9,6) до 5 мкг/мл с получением твердофазного раствора. После добавления 50 мкл твердофазного раствора в каждую лунку плоскодонного 96-луночного планшета Nunc MaxiSorp™ (субстрат: полистирол производства Nunc Inc.), планшет выдерживают в течение одного часа при комнатной температуре для того, чтобы рекомбинантный hTfR прилип к планшету и стал неподвижным. Твердофазный раствор удаляют, каждую лунку промывают три раза 250 мкл промывочного раствора (ФРФБ, содержащий ФРФБ-Т: 0,05% Tween20), затем в каждую лунку добавляют 200 мкл блокирующего раствора (ФРФБ, содержащий 1% АБС), и планшет выдерживают в течение одного часа при комнатной температуре.

Блокирующий раствор удаляют, и каждую лунку промывают три раза 250 мкл ФРФБ-Т. В каждую лунку добавляют 50 мкл надосадочной жидкости культуры клеток гибридомы, и планшет выдерживают в течение одного часа при комнатной температуре для того, чтобы позволить мышинным анти-hTfR антителам, содержащимся в надосадочной жидкости клеточной культуры, связаться с рекомбинантным hTfR. В то же время в некоторые лунки добавляют 50 мкл надосадочной жидкости клеточной культуры, которая не вырабатывает мышинные анти-hTfR антитела, в качестве контроля. Кроме того, 50 мкл среды для культивирования гибридомы добавляют в лунки, в качестве пробных лунок, кроме тех лунок, в которые добавлена надосадочная жидкость клеточной культуры. Измерение проводят методом n=2. Затем раствор удаляют, и каждую лунку промывают три раза 250 мкл ФРФБ-Т.

В каждую из указанных выше лунок добавляют 100 мкл раствора HRP-меченых анти-мышинных иммуноглобулиновых антител (Promega Inc.), и планшет выдерживают в течение одной минуты при комнатной температуре. Затем раствор удаляют и каждую лунку промывают три раза 250 мкл ФРФБ-Т. В каждую лунку добавляют 50 мкл раствора хромогенного субстрата, ТМВ стабилизированного субстрата для пероксидазы хрена (Promega Inc.), и лунки выдерживают в течение 10-20 минут при комнатной температуре. Затем после добавления 100 мкл останавливающего раствора (2N серной кислоты), абсорбцию в каждой лунке измеряют на планшетном ридере при 450 нм. Из двух лунок для каждой из надосадочной жидкости клеточной культуры и контроля, получают средние

значения, соответственно, и из каждого из средних значений вычитают соответствующее среднее значение для двух пробных лунок, размещенных соответственно к каждой лунке с надосадочной жидкостью клеточной культуры и контролем, с получением значения.

Четырнадцать типов клеток гибридомы, соответствующих надосадочным жидкостям клеточных культур, добавленным в лунки, которые демонстрируют наивысшие значения, выбирают в качестве колоний клеток (колоний клеток, вырабатывающих высокоаффинные антитела), которые вырабатывают антитела, демонстрирующие высокое сродство к hTfR (высокоаффинные анти-hTfR антитела). Эти четырнадцать типов колоний клеток обозначают как Колония клона 1 - Колония клона 14. Анти-hTfR антитела, выработанные клональными колониями клеток 1-14, обозначают как анти-hTfR антитело № 1 - анти-hTfR антитело № 14, соответственно.

[Пример 6] Анализ последовательности аминокислот варибельной области высокоаффинных анти-hTfR антител

Дополнительную колонию клона 3 выбирают из колонии клона 1 - колонии клона 14, выбранных в примере 5. кДНК колонии клона 3 получают, и ген, кодирующий легкую цепь и тяжелую цепь антитела усиливают с применением этой кДНК в качестве шаблона. Последовательность нуклеиновых кислот усиленного гена транслируют для определения последовательности аминокислот переменной области легкой цепи и тяжелой цепи анти-hTfR антитела № 3, выработанного этой колонией клона.

Было обнаружено, что анти-hTfR антитело № 3 включает последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO:9, в качестве легкой цепи переменной области, и последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO:10, в качестве тяжелой цепи переменной области. Было обнаружено, что легкая цепь переменной области включает последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO:11 или 12 в качестве ОКО1; SEQ ID NO:13 или 14 в качестве ОКО2, и SEQ ID NO:15 в качестве ОКО3; и тяжелая цепь переменной области включает последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO:16 или 17 в качестве ОКО1, SEQ ID NO:18 или 19 в качестве ОКО2, и SEQ ID NO:20 или 21 в качестве ОКО3. Однако также считается, что ОКО не ограничены теми, которые составляют эти последовательности аминокислот, но они также могут быть областями либо последовательностей аминокислот, которые включают любую из указанных выше последовательностей, либо последовательностей аминокислот, состоящих из не менее трех последовательных аминокислот, составляющих часть указанных выше последовательностей.

[Пример 7] Измерение сродства анти-hTfR антитела с человеческим и обезьяньим TfR

Сродство анти-hTfR антитела к человеческому и обезьяньему TfR измеряют на Octet RED96 (ForteBio Inc., подразделение Pall Corporation), системе для анализа взаимодействий между биомолекулами с применением биослойной интерферометрии (БСИ). Основные принципы биослойной интерферометрии коротко описаны ниже. Когда слой биомолекул, иммобилизованных на поверхности наконечника датчика, облучают

светом с определенной длиной волны, свет отражается от двух из поверхностей, поверхности биомолекулы и поверхности внутреннего референсного слоя, с образованием интерферирующих световых волн. Молекула в измеряемом образце связывается с биомолекулой на поверхности конца датчика и тем самым увеличивает толщину слоев на конце датчика, что дает сдвиг между интерферирующими слоями. Измерение изменений этого сдвига между интерферирующими волнами, определение количества молекул, связанных со слоем биомолекул, иммобилизованных на поверхности конца датчика, и их кинетический анализ проводят в режиме реального времени. Измерение обычно проводят согласно руководству пользователя, прилагаемого к Octet RED96. В качестве человеческого TfR применяют рекомбинантный человеческий TfR (р. человеческий TfR: Sino Biological Inc.), который имеет последовательность аминокислот внеклеточной области hTfR, т.е. от цистеинового остатка в положении 89 от N-концевой стороны до фенилаланина на C-конце последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO:1, с гистидиновым тагом, присоединенным к N-концу. В качестве обезьяньего TfR применяют рекомбинантный обезьяний TfR (р. обезьяний TfR: Sino Biological Inc.), который имеет последовательность аминокислот внеклеточной области TfR *Macaca fascicularis*, т.е. от цистеинового остатка в положении 89 от N-концевой стороны до фенилаланина на C-конце последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO:2, с гистидиновым тагом, присоединенным к N-концу.

Колонию клона 3, выбранную в примере 6, разводят средой RPMI 1640, содержащей добавку (1X) HAT Supplement (Life Technologies Inc.) и 10% фетальную телячью сыворотку Ultra low IgG (Life Technologies Inc.) так, чтобы скорректировать плотность клеток до приблизительно 2×10^5 клеток/мл. В 1 л коническую колбу добавляют 200 мл каждой суспензии клеток, и культивирование проводят в течение 6-7 дней во влажной среде при 37°C, 5% CO₂ и 95% воздухе при перемешивании со скоростью около 70 об./мин. Надосадочную жидкость культуры клеток центрифугируют и затем фильтруют через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) для сбора надосадочной жидкости культуры клеток. Собранную надосадочную жидкость культуры клеток загружают в колонку Protein G (объем колонки: 1 мл, GE Healthcare Inc.), которая уравновешена заранее тремя объемами колонки 20 mM буфером Tris (pH 8,0), содержащим 150 mM NaCl. После промывания колонки 5 объемами колонки тем же буфером, адсорбированные антитела элюируют 4 объемами колонки 50 mM глициновым буфером (pH 2,8), содержащим 150 mM NaCl, и элюированные фракции собирают. Элюированные фракции доводят до pH 7,0 добавлением 1 M буфера Tris (pH 8,0). Их применяют в качестве очищенных продуктов анти-hTfR антител № 3 в описанных ниже экспериментах.

Очищенные анти-hTfR антитела № 3 разводят в две стадии HBS-P+ (10 mM HEPES, содержащим 150 mM NaCl, 50 мкМ ЭДТК и 0,05% Surfactant P20), соответственно, с получением растворов антител с 7 разными концентрациями, 0,78125-50 нМ (0,117-7,5 мкг/мл). Эти растворы антител применяют в качестве растворов образцов. Р. человеческий и р. обезьяний TfR, соответственно, разводят HBS-P+ с получением 25 мкг/мл растворов,

которые применяют в качестве раствора р. человеческого TfR-ECD (Histag) и раствора р. обезьяньего TfR-ECD (Histag), соответственно.

Каждый из растворов образцов, полученных выше 2-кратным разведением, добавляют 200 мкл/лунку, в 96-луночный планшет, черный (Greiner Bio-One Inc.). Каждый из растворов р. человеческого TfR-ECD (Histag) и р. обезьяньего TfR-ECD (Histag), полученных выше, добавляют, 200 мкл/лунку, в определенные лунки. В соответствующие лунки исходного уровня, диссоциации и промывания добавляют HBS-P+, 200 мкл/лунку. В лунки для регенерации добавляют 10 mM Glycine-HCl (pH 1,7), 200 мкл/лунку. В лунки для активации добавляют 0,5 mM раствор NiCl₂, 200 мкл/лунку. Планшет и биодатчик (Biosensor/Ni-NTA: ForteBio Inc., подразделение Pall Corporation) устанавливают в предписанные положения Octet RED96.

Octet RED96 запускают в условиях, показанных в таблице 1 ниже, для сбора данных, на основании которых затем, с применением анализирующей программы, прилагаемой к Octet RED96, и подгонкой кривой реакции связывания с 1:1 моделью связывания или 2:1 моделью связывания, измеряют константу скорости ассоциации (k_{on}) константу скорости диссоциации (k_{off}) анти-hTfR антитела к р. человеческому TfR и р. обезьяньему TfR, и рассчитывают константу диссоциации (K_D). Измерение проводят при 25-30°C.

[Таблица 1] Рабочие условия OctetRED96

	Стадия	Время контакта датчика (сек)	Скорость (об./мин.)	Порог
1	Базовая линия 1	60	1000	-
2	Загрузка	600	1000	1,5-2,0
3	Базовая линия 2	60	1000	-
4	Ассоциация	180	1000	-
5	Диссоциация	540	1000	-
6	Регенерация	5	1000	-
7	Промывание	5	1000	-
Стадии 6-7 выше повторяют от 6 до 7 раз				
8	Активация	60	1000	-
Стадии 1-8 повторяют до измерения всех образцов				

Константа диссоциации (K_D) с человеческим TfR анти-hTfR № 3 составляет не более 1×10^{-12} М, и константа диссоциации (K_D) с обезьяньим TfR составляет не более 1×10^{-12} М. Эти результаты показывают, что анти-hTfR антитело № 3 является антителом с высоким сродством не только к человеческому TfR, но также к обезьяньему TfR.

[Пример 8] Получение гуманизированных анти-hTfR антител

Гуманизацию пробуют на последовательности аминокислот, включенной в легкую цепь и тяжелую цепь переменных областей анти-hTfR антитела № 3. Таким образом,

получают переменную область гуманизированной легкой цепи, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 22, и переменную область гуманизированной тяжелой цепи, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 23. Кроме того получают легкую цепь, где легкая цепь имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 22, в переменной области. Что касается тяжелой цепи, получают тяжелую цепь, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 25, и имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 23, в переменной области. Тяжелая цепь последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 25, имеет тип IgG4. Полученную таким образом константу диссоциации (K_D) гуманизированного анти-hTfR антитела с человеческим TfR измеряют способом, описанным в примере 7. Результаты показывают, что константа диссоциации (K_D) гуманизированного анти-hTfR антитела с человеческим TfR составляет не более 1×10^{-12} М, и константа диссоциации (K_D) с обезьяньим TfR составляет около 1×10^{-9} М. Эти результаты показывают, что полученное гуманизированное антитело анти-hTfR антитела № 3 имеет высокое сродство не только с человеческим TfR, но также с обезьяньим TfR.

[Пример 9] Конструирование гена, кодирующего слитый белок анти-TfR антитела и hGAA

Синтезируют фрагмент ДНК, кодирующий легкую цепь последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 24 (SEQ ID NO: 26). Фрагмент имеет, на 5' стороне, в порядке от 5' конца, последовательность MluI и последовательно, кодирующую сигнальный пептид, который действует как секреторный сигнал, и последовательность NotI на 3' стороне.

Кроме того, фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 28), кодирующий белок последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 27, в целом синтезированной в этом белке человеческой кислой α -глюкозидазы последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 1, связывают на С-концевой стороне тяжелой цепи последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 25, через линкерную последовательность, состоящую из Gly-Ser. Фрагмент ДНК имеет, на 5' стороне, в порядке от 5' конца, последовательность MluI и последовательность, кодирующую сигнальный пептид, который действует как секреторный сигнал, и последовательность NotI на 3' стороне.

[Пример 10] Конструирование вектора экспрессии для слитого белка анти-TfR антитела и hGAA

pEF/мус/нус вектор (Invitrogen Inc.) расщепляют с KpnI и NcoI, область, содержащую EF-1 α промотор и его первый интрон вырезают и «затупляют» концы с T4 ДНК полимеразой. pCI-neo вектор (Invitrogen Inc.) расщепляют с BglII и EcoRI для вырезания области, содержащей CMV энхансер/промотор и интрон, затем «затупляют» концы с T4 DNA полимеразой. Туда вставляют область, содержащую EF-1 α промотор и

его первый интрон, описанный выше, для конструирования рЕ-нео вектора. рЕ-нео вектор расщепляют с SfiI и BstXI, и вырезают приблизительно 1 т.п.н. области, содержащей ген устойчивости к неомицину. Применяя pCDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen Inc.) в качестве шаблона, ген резистентности к гигромицину усиливают ПЦР реакцией с применением праймера Hyg-Sfi5' (SEQ. NO. 30) и праймера Hyg-BstX3' (SEQ. NO. 31). Усиленный ген резистентности к гигромицину расщепляют с SfiI и BstXI, и ген резистентности к неомицину вставляют в вырезанный рЕ-нео вектор для конструирования рЕ-hygr вектора.

рЕ-hygr вектор и рЕ-нео вектор расщепляют с MluI и NotI, соответственно. ДНК фрагмент, кодирующий легкую цепь анти-hTfR антитела, синтезированного в примере 9 (SEQ ID NO: 26), и ДНК фрагмент, кодирующий белок, в котором связаны тяжелая цепь анти-hTfR антитела и человеческая кислая α -глюкозидаза (SEQ ID NO: 28), расщепляют с MluI и NotI и вставляют между MluI-NotI рЕ-hygr вектора и рЕ-нео вектора, соответственно. Полученные векторы применяют в качестве рЕ-hygr (LC), вектора для экспрессии легкой цепи гуманизированного анти-hTfR антитела, и рЕ-нео(НС-hGAA), вектора для экспрессии белка, в котором связаны тяжелая цепь анти-hTfR антитела и человеческая кислая α -глюкозидаза, соответственно.

[Пример 11] Получение клеток для экспрессирования слитого белка hGAA-гуманизированного анти-hTfR антитела

Клетки CHO (CHO-K1: полученные из American Type Culture Collection) трансформируют с рЕ-hygr (LC) и рЕ-нео(НС-hGAA), сконструированными в примере 10, с применением GenePulser(Bio-Rad, Inc.) согласно описанному ниже способу. Трансформацию клетки обычно проводят следующим образом. 5×10^6 клеток CHO-K1 засевают в 3,5 см чашку для культивирования и добавляют среду CD OptiCHO™ (Life Technologies Inc.), и выращивают в течение ночи в условиях 37°C и 5% CO₂. Среду меняют на среду Opti-MEM™ I (Life Technologies Inc.) и клетки суспендируют с плотностью 5×10^6 клеток/мл. Собирают 100 мкл клеточной суспензии и 5 мкл каждого из раствора рЕ-hygr(LC1) плазмидной ДНК и раствора рЕ-нео(НС1) плазмидной ДНК, оба которых разведены до 100 мкг/мл в среде Opti-MEM medium™ I, добавляют в суспензию клеток. Проводят электропорацию с применением GenePulser (Bio-Rad Inc.), и плазмиды вводят в клетки. Затем клетки культивируют в течение ночи в условиях 37°C, 5% CO₂, и подвергают селективному культивированию в среде CD OptiCHO™ с добавлением 0,5 мг/мл гигромицина и 0,8 мг/мл G418.

Затем клетки, выбранные выше селективным культивированием, засевают в 96-луночные планшеты так, что не более одной клетки засевают в лунку при предельном разведении. Затем клетки культивируют в течение около 10 дней так, что образуются моноклональные колонии. Собирают соответствующие надосадочные жидкости клеточных культур из лунок, в которых образовались моноклональные колонии, количество гуманизированных антител, содержащихся в надосадочных жидкостях клеточных культур определяют ELISA, и выбирают колонии клеток с высокой экспрессией hGAA-гуманизированного анти-hTfR антитела-слитого белка.

Указанный выше ELISA проводят обычно следующим образом. В каждую лунку 96-луночного титровального микропланшета (Nunc Inc.) добавляют 100 мкл раствора козьего анти-человеческого IgG поликлонального антитела, разведенного 0,05 М натрий-бикарбонатный буфер (рН 9,6) до 4 мкг/мл, и планшет выдерживают в течение, по крайней мере, одного часа при комнатной температуре так, чтобы антитела могли быть адсорбированы планшетами. Затем, после тройного промывания лунки ФРФБ-Т, 200 мкл блокирующего буфера Starting Block (ФРФБ) (Thermo Fisher Scientific Inc.) добавляют в каждую лунку, и планшеты выдерживают в течение 30 минут при комнатной температуре. После тройного промывания каждой лунки ФРФБ-Т, надосадочную жидкость клеточной культуры или стандартный продукт человеческого IgG, который разведен ФРФБ-ВТ (ФРФБ с добавлением 0,5% АБС и 0,05% Tween20) до подходящих концентраций, добавляют в каждую лунку в количестве 100 мкл, и планшеты выдерживают в течение, по крайней мере, одного часа при комнатной температуре. После тройного промывания планшетов ФРФБ-Т, 100 мкл раствора НRP-меченого анти-человеческого IgG поликлонального антитела, который разведен ФРФБ-ВТ, добавляют в каждую лунку, и планшеты выдерживают в течение, по крайней мере, одного часа при комнатной температуре. После тройного промывания лунок ФРФБ-Т, 0,4 мг/мл о-фенилендиамин в цитрате-фосфатного буфера (рН 5,0) добавляют в каждую лунку в количестве 100 мкл, и лунки выдерживают в течение 8-20 минут при комнатной температуре. Затем 1 моль/л серной кислоты добавляют в каждую лунку в количестве 100 мкл для окончания реакции, и абсорбцию для каждой лунки измеряют при 490 нм с применением ридера 96-луночного планшета. Клетки, соответствующие лункам, которые демонстрируют наивысшие значения, считаются колониями клеток с высокой экспрессией hGAA-гуманизированного анти-hTfR антитела-слитого белка. hGAA-гуманизированное анти-hTfR антитело-слитый белок, вырабатываемый этой колонией клеток, обозначают как hGAA-анти-hTfR антитело.

[Пример 12] Получение hGAA-Анти-hTfR Антитела

hGAA-анти-hTfR антитело получают следующим образом. Колонию клеток с высокой экспрессией hGAA-анти-hTfR антитела, полученную в примере 11, разводят в среде CD OptiCHO™ до концентрации клеток около 2×10^5 клеток/мл, 200 мл клеточной суспензии добавляют в 1 л колбу Эрлейнмейера и инкубируют при 37°C во влажной среде, состоящей из 5% CO₂ и 95% воздуха со скоростью перемешивания около 70 об./мин в течение 6-7 дней. Надосадочную жидкость клеточной культуры собирают центрифугированием и фильтруют через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) с получением надосадочной жидкости клеточной культуры. К собранной надосадочной жидкости клеточной культуры добавляют 5 объемов колонки 20 мМ буфера Tris (рН 8,0) содержащего 150 мМ NaCl и загружают в колонку Protein A (объем колонки: 1 мл, Bio-Rad Inc.), которую заранее уравнивают 3 объемами колонки 20 мМ буфера Tris (рН 8,0), содержащего 150 мМ NaCl. Затем колонку промывают 5 объемами колонки того же буфера, и адсорбированные hGAA-анти-hTfR антитела элюируют 4 объемами колонки 50 мМ глицинового буфера (рН 2,8), содержащего 150 мМ NaCl. рН этого элюата,

содержащего hGAA-анти-hTfR антитело, доводят до pH 7,0 добавлением 1 М буфера Tris (pH 8,0), и затем буфер меняют на ФРФБ с применением 30 кДа мембраны Amicon Ultra (Millipore Co.). Полученное применяют в качестве очищенного продукта hGAA-анти-hTfR антитела.

[Пример 13] Измерение введения hGAA в клетки с применением человеческой скелетной мышцы

Человеческие скелетные миоциты (PromoCell Inc.) разводят в $8,0 \times 10^4$ клеток/мл среде для выращивания клеток скелетной мышцы (готовой к применению) (PromoCell Inc.) и засевают в лунки 96-луночного планшета, покрытого Cellnest™ (Fujifilm Inc.) в количестве 250 мкл/лунку. После культивирования при 37°C в 5% CO₂ в течение 3 дней, среду заменяют на среду для индукции дифференциации скелетных миоцитов, Skeletal Muscle Cell Differentiation Medium (готовую к применению) (PromoCell Inc.). Затем каждые 2 дня среду меняют на среду для индукции дифференциации, и дифференциацию вызывают в течение 6 дней. После удаления среды 100 мкл каждого из серийно разведенных растворов hGAA-анти-hTfR антитела и hGAA (0,005-20,0 мкг/мл), разведенных средой для индукции дифференциации, добавляют в лунку в качестве тестируемого вещества, и клетки далее инкубируют при 37°C и 5% CO₂ в течение еще 20 часов.

После инкубации среду удаляют, и каждую лунку промывают три раза 300 мкл ФРФБ. 100 мкл M-PER™ (с 0,5% смеси ингибиторов протеаз, Thermo Fisher Scientific Inc.) добавляют в каждую лунку, и планшет встряхивают на планшетном шейкере при комнатной температуре в течение 25 минут с получением клеточного экстракта. 20 мкл экстракта из каждой лунки собирают, и белок, содержащийся в экстракте, определяют с применением набора анализа белка BCA (Pierce Inc.). Кроме того, 80 мкл ФРФБ-ВТ добавляют в лунки после сбора 20 мкл экстракта, и планшет встряхивают в течение 10 минут при комнатной температуре на планшетном шейкере с получением клеточного экстракта, который подвергают анализу ELISA.

Таким же образом получают клеточный экстракт из клеток в лунках, в которые тестируемое вещество не добавляли, и этот экстракт применяют в качестве экстракта пула. hGAA-анти-hTfR антитело и коммерчески доступный hGAA серийно разводят объединенными экстрактами для получения образцов калибровочной кривой. Тестируемое вещество может быть количественно оценено следующим способом ELISA.

Кроличье анти-hGAA поликлональное антитело, полученное иммунизацией кролика hGAA, разводят до 5 мкг/мл 20 ммоль/л натрий-карбонатным буфером (pH 9,0), добавляют в каждую лунку 96-луночного планшета (Maxisorp™) в количестве 100 мкл/лунку, и встряхивают в течение 1 часа при комнатной температуре на планшетном шейкере. Раствор антитела удаляют и 300 мкл блокирующего буфера (ФРФБ с 1% АБС) добавляют в каждую лунку и выдерживают в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем лунки промывают три раза 300 мкл ФРФБ-Т. И 100 мкл каждого из образцов стандартной кривой и клеточного экстракта добавляют в лунку, и планшет встряхивают в

течение 1 часа при комнатной температуре на планшетном шейкере. Каждую лунку промывают три раза 300 мкл промывочного раствора, 100 мкл меченого биотином кроличьего анти-hGAA антитела (полученного на месте) в ФРФБ-ВТ добавляют в каждую лунку и планшет встряхивают на планшетном шейкере при комнатной температуре в течение 1 часа. После тройного промывания каждой лунки 300 мкл промывочного раствора, 100 мкл конъюгата NeutrAvidin-HRP (Pierce Inc.), разбавленного 0,5% АБС/ФРФБ (с 0,05% Tween20), добавляют в каждую лунку, планшет встряхивают в течение 15 минут при комнатной температуре на планшетном шейкере, и затем каждую лунку промывают три раза 300 мкл промывочного раствора. Смешанный раствор Субстратного раствора ТМВ пероксидазы В из ТМВ Microwell Peroxidase Substrate (2-компонентной системы, KPL Inc.) и Субстрата ТМВ пероксидазы в равных количествах добавляют в каждую лунку в количестве 100 мкл/лунку, и цветная реакция развивается при комнатной температуре. После получения правильного развития цвета, 100 мкл 1 моль/л фосфата добавляют в каждую лунку, и реакцию останавливают. Абсорбцию при 450 нанометрах измеряют микропланшетным ридером, калибрационную кривую получают с применением SoftMax Pro (Molecular Device Inc.), и концентрации каждого тестируемого вещества рассчитывают интерполированием измеренных значений каждого тестируемого вещества на калибровочную кривую. Концентрацию тестируемого вещества в каждом клеточном экстракте делят на концентрацию белка с получением количества тестируемого вещества, поглощенного клеткой (нг/мг белка).

[Пример 14] Получение CD71-KI/GAA-КО мыши

CD71-KI/GAA-КО мышей с выключенным геном кислой α -глюкозидазы (GAA геном) и нокинированным геном человеческого трансферринового рецептора (CD71 геном), создают обычными методами генной инженерии. Способ получения обычно следующий. Направленный вектор (GAA выключающий вектор), способный выключать мышиный ген GAA, конструируют вставкой стоп-кодона и гена резистентности к неомицину в сайт BamHI, присутствующий в экзоне 6 мышинного гена GAA. Направленный вектор содержит последовательность нуклеиновых кислот, описанную как SEQ ID NO: 32. После линейаризации направленного вектора, вектор вводят в клетки ES клеточной линии C57BL/6 электропорацией. После введения проводят селективное культивирование с применением резистентности к неомициновому лекарственному средству в качестве показателя, и получают резистентные к лекарственному средству ES клоны. Полученные резистентные к лекарственному средству ES клоны подвергают скринингу с применением геномной ПЦР и саузерн-блоттинга, и выбирают клоны, в которых достигается специфическая гомологичная рекомбинация (гомологичная рекомбинация ES клонов). Применяя ES клоны с гомологичной рекомбинацией и эмбрионы линии клеток ICR на стадии 8-клеток получают химерные эмбрионы способом агрегации. Мыши реципиенту имплантируют химерные эмбрионы для рождения химерных мышей.

Химерных мышей естественно спаривают для получения GAA-КО гетеро мышей,

и GAA-КО гомо мышей получают через повторное спаривание. CD71-KI гетеро мышей и GAA-КО гомо мышей спаривают, и полученных мышей подвергают скринингу с получением CD71-KI/GAA-КО мышей. CD71-KI гетеро мышей получают согласно способу, описанному в Sonoda H., et al. *Molecular Therapy* 26. 1366-74 (2018).

[Пример 15] Измерение введения hGAA в клетки у мышей

Очищенный продукт hGAA-анти-hTfR антитела, полученный в примере 12, и коммерчески доступный hGAA для медицинского применения готовят в виде 4 мг/мл растворов с применением физиологического раствора. Используя эти растворы, CD71-KI/GAA-КО мышам вводят hGAA-анти-hTfR антитело или hGAA через хвостовые вены, соответственно. Оба hGAA-анти-hTfR антитело и hGAA вводят в дозе 20 мг/дозу в общем количестве 4 дозы каждую последующую неделю. Через две недели после последней дозы мышей обескровливают до смерти и сердце, диафрагму, камбаловидную мышцу, переднюю большеберцовую мышцу и квадрицепс собирают. Собранный ткань промывают солевым раствором. Концентрации гликогенов в этих мышечных тканях, массы мышц в мг/г измеряют, как описано в примере 16. Группу, которая получает hGAA-анти-hTfR антитело, обозначают как группу введения hGAA-анти-hTfR антитела, и группу, которая получает коммерчески доступный медицинский hGAA, обозначают как группу введения hGAA. CD71-KI/GAA-КО мышей, которым вводят равный объем солевого раствора, применяют в качестве КО-контрольной группы. Кроме того, мышей дикого типа, которые получают равный объем солевого раствора, используют в качестве контрольной группы дикого типа. Каждая группа состоит из 5 мышей.

Результаты измерения количества гликогена, содержащегося в каждой мышечной ткани, показаны на фигурах 1-5. Фигуры 1, 2, 3, 4 и 5 показывают результат измерения в сердце, диафрагме, камбаловидной мышце, передней большеберцовой мышце и квадрицепсе. Если количество гликогена, содержащееся в каждой ткани у группы введения hGAA принимать за 100%, количество гликогена, содержащееся в каждой ткани в группе введения hGAA-анти-hTfR антитела снижается до приблизительно 7,5% в сердце, 6,5% в диафрагме, 13,5% в камбаловидной мышце, 13,5% в передней большеберцовой мышце и 6% в квадрицепсе. Эти результаты демонстрируют, что hGAA-анти-hTfR антитело может эффективно снижать гликоген, аккумулированный в мышечной ткани, по сравнению с коммерчески доступным медицинским hGAA. Болезнь Помпе (гликогеноз II типа) является болезнью, при которой гликоген аккумулируется в больших количествах в лизосомах в клетках при генетическом отсутствии большинства или всей активности кислой α -глюкозидазы, и основным симптомом является дисфункция сердечной и скелетной мускулатуры. То есть, hGAA-анти-hTfR антитело является многообещающим в качестве терапевтического агента в ферментозамещающей терапии пациентов с болезнью Помпе, так как оно может эффективно снижать гликогены, аккумулированные в сердечной и скелетной мускулатуры у пациентов с болезнью Помпе по сравнению с hGAA.

[Пример 16] Способ определения количества гликогена, содержащегося в ткани

Ткани, полученные в примере 15, и 15 штук диаметром 0,5 мм шариков SUS помещают в держатель в шаровую мельницу (BEADS CRUSHER μ T-12, Titec Inc.), и дополнительно в держатель добавляют воду для инъекций. Шаровая мельница измельчает ткань. Полученную измельченную ткань центрифугируют при 15000 об./мин. в течение 10 минут при 4°C, и надосадочную жидкость собирают в качестве раствора образца и хранят замороженной до измерения.

Концентрацию гликогена измеряют с применением набора Glycogen Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (Biovision Inc.) в следующих стадиях в целом. Образец калибровочной кривой (Glycogen Standard) постадийно разводят чистой водой, и 50 мкл разведенных растворов добавляют в лунки планшета F96 Black (Nunc Inc.). Также, 50 мкл раствора образца добавляют в каждую лунку. В это время, каждый из разведенных растворов образца калибровочной кривой и растворов образца добавляют в две лунки, соответственно. 1 мкл смеси Hydrolysis Enzyme Mix добавляют в две лунки, в которые добавлен образец калибровочной кривой и в одну лунку, в которую добавлен образец, смешивают и подвергают взаимодействию при комнатной температуре в течение 30 минут для разложения гликогена на глюкозу. Затем 50 мкл реакционной смеси, содержащей флуоресцентный реагент, добавляют во все лунки и подвергают взаимодействию в течение 30 минут при комнатной температуре защищенным от света. Интенсивность флуоресценции измеряют ($E_x/E_m=535/587$ нм) с применением флуоресцентного планшетного ридера (SPECTRA max GEMINI XPS, Molecular Devices Inc.), и концентрацию глюкозы в растворе образца, к которому добавлена смесь Hydrolysis Enzyme Mix, и раствора образца, к которому не добавлена смесь Hydrolysis Enzyme Mix, рассчитывают из калибровочной кривой, полученной из кривой линейным приближением из теоретической концентрации (X) и среднего сигнала (Y) образцов калибровочной кривой. Измерение концентрации глюкозы раствора образца, к которому не добавлена смесь Hydrolysis Enzyme Mix, затем вычитают из измерения концентрации глюкозы раствора образца, к которому добавлена смесь Hydrolysis Enzyme Mix, и это значение берут как концентрацию гликогена в растворе образца. Концентрации гликогена (мг/г массы влажной ткани) тканей определяют из массы тканей, применяемых для получения растворов образцов и определенных концентраций гликогена.

Промышленная применимость

В соответствии с данным изобретением, фармацевтический агент, работающий в мышцах, который недостаточно поглощается мышцами как таковой, может эффективно поглощаться мышцей при превращении его в конъюгат, сопряженный с анти-трансферриновым рецептором антитела. Поэтому он может применяться для разработки нового терапевтического лекарственного средства для мышечных заболеваний.

Свободный список последовательностей

SEQ ID NO:3: Последовательность аминокислот примерного линкера 1

SEQ ID NO:4: Последовательность аминокислот примерного линкера 2

SEQ ID NO:7: Праймер hTfR5', синтетическая последовательность

SEQ ID NO:8: Праймер hTfR3', синтетическая последовательность

SEQ ID NO:9: Последовательность аминокислот переменной области легкой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:10: Последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:11: Последовательность аминокислот 1 ОКО1 в легкой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:12: Последовательность аминокислот 2 ОКО1 в легкой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:13: Последовательность аминокислот 1 ОКО2 в легкой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:14: Последовательность аминокислот 2 ОКО2 в легкой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:15: Последовательность аминокислот ОКО3 в легкой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:16: Последовательность аминокислот 1 ОКО1 в тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:17: Последовательность аминокислот 2 ОКО1 в тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:18: Последовательность аминокислот 1 ОКО2 в тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:19: Последовательность аминокислот 2 ОКО2 в тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:20: Последовательность аминокислот 1 ОКО3 в тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:21: Последовательность аминокислот 2 ОКО3 в тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:22: Последовательность аминокислот переменной области легкой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:23: Последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:24: Последовательность аминокислот легкой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:25: Последовательность аминокислот тяжелой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3

SEQ ID NO:26: Последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая последовательность аминокислот легкой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3, синтетическая последовательность

SEQ ID NO:27: Последовательность аминокислот слитого белка тяжелой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3 и hGAA

SEQ ID NO:28: Последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая последовательность аминокислот слитого белка тяжелой цепи гуманизированного анти-hTfR антитела № 3 и hGAA, синтетическая последовательность

SEQ ID NO:29: Последовательность аминокислот слитого белка тяжелой цепи гуманизированного анти-hTfR антитела № 3 и ч. альфа-galA

SEQ ID NO:30: Праймер H_{yg}-Sfi5', синтетическая последовательность

SEQ ID NO:31: Праймер H_{yg}-BstX3', синтетическая последовательность

SEQ ID NO:32: Последовательность аминокислот GAA выключенного вектора, синтетическая последовательность

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитела против рецептора трансферрина человека и фармацевтического агента, где агент обладает физиологическим действием, проявляющимся в мышцах.

2. Конъюгат по п. 1, где антителом против рецептора трансферрина человека является Fab антитело, $F(ab')_2$ антитело или $F(ab')$ антитело.

3. Конъюгат по п. 1, где антителом против рецептора трансферрина человека является одноцепочечное антитело, выбранное из группы, состоящей из scFab, scF(ab'), scF(ab')₂ и scFv.

4. Конъюгат по п. 3, где в одноцепочечном антителе легкая цепь и тяжелая цепь антитела против рецептора трансферрина человека связаны через линкерную последовательность.

5. Конъюгат по п. 4, где легкая цепь и тяжелая цепь антитела против рецептора трансферрина человека связаны на С-концевой стороне легкой цепи через линкерную последовательность.

6. Конъюгат по п. 4, где легкая цепь и тяжелая цепь антитела против рецептора трансферрина человека связаны на С-концевой стороне тяжелой цепи через линкерную последовательность.

7. Конъюгат по любому из пп. 4-6, где линкерная последовательность содержит 8-50 аминокислотных остатков.

8. Конъюгат по п. 7, где линкерная последовательность содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательности аминокислот (Gly Ser), последовательности аминокислот (Gly Gly Ser), последовательности аминокислот (Gly Gly Gly), последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 3 и последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 4.

9. Конъюгат по п. 8, где линкерная последовательность содержит 15 аминокислотных остатков, в котором последовательность аминокислот, описанная как SEQ ID NO: 4, последовательно повторяется три раза.

10. Конъюгат по любому из пп. 1-9, где анти-человеческое антитело трансферринового рецептора содержит последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 22, в переменной области легкой цепи, и последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 23, в переменной области тяжелой цепи.

11. Конъюгат по п. 10, где последовательность аминокислот переменной области легкой цепи имеет идентичность не менее 80% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22, и последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи имеет идентичность не менее 80% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

12. Конъюгат по п. 10, где последовательность аминокислот переменной области легкой цепи имеет идентичность не менее 90% с последовательностью аминокислот,

описанной как SEQ ID NO: 22, и последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи имеет идентичность не менее 90% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

13. Конъюгат по п. 10, где 1-10 аминокислот, составляющих переменную область легкой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22.

14. Конъюгат по п. 10, где 1-3 аминокислоты, составляющих переменную область легкой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22.

15. Конъюгат по п. 10, где 1-10 аминокислот, составляющих переменную область тяжелой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

16. Конъюгат по п. 10, где 1-3 аминокислот, составляющих переменную область тяжелой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

17. Конъюгат по п. 10, где 1-10 аминокислот, составляющих переменную область легкой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22, и 1-10 аминокислот, составляющих переменную область тяжелой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

18. Конъюгат по п. 10, где 1-3 аминокислоты, составляющих переменную область легкой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22, и 1-3 аминокислоты, составляющих переменную область тяжелой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

19. Конъюгат по п. 10, где анти-человеческое антитело трансферринового рецептора содержит легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 25.

20. Конъюгат по п. 19, где последовательность аминокислот переменной области легкой цепи имеет идентичность не менее 80% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 24, и последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи имеет идентичность не менее 80% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 25.

21. Конъюгат по п. 19, где последовательность аминокислот переменной области легкой цепи имеет идентичность не менее 90% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 24, и последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи имеет идентичность не менее 90% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 25.

22. Конъюгат по любому из пп. 1-21, где агентом является пептид или белок.

23. Конъюгат по п. 22, выбранный из группы, состоящей из (1)-(4) ниже:

(1) конъюгат, в котором белок связан с С-концевой стороной легкой цепи антитела против рецептора трансферрина человека пептидной связью,

(2) конъюгат, в котором белок связан с N- концевой стороной легкой цепи антитела против рецептора трансферрина человека пептидной связью,

(3) конъюгат, в котором белок связан с С- концевой стороной тяжелой цепи антитела против рецептора трансферрина человека пептидной связью, и

(4) конъюгат, в котором белок связан с N- концевой стороной легкой цепи антитела против рецептора трансферрина человека пептидной связью.

24. Конъюгат по п. 23, где белок связан с антителом против рецептора трансферрина человека через линкерную последовательность.

25. Конъюгат по п. 24, где линкерная последовательность состоит из 1-50 аминокислотных остатков.

26. Конъюгат по п. 25, где линкерная последовательность содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из отдельного глицина, отдельного серина, последовательности аминокислот (Gly Ser), последовательности аминокислот (Gly Gly Ser), последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO:3, последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO:4, и последовательности аминокислот, состоящей из 1-10 последовательностей аминокислот, который связаны последовательно.

27. Конъюгат по любому из пп. 1-28, где антителом против рецептора трансферрина человека является гуманизованное анти-человеческое антитело трансферринового рецептора.

28. Конъюгат по любому из пп. 22-27, где белком является лизосомный фермент.

29. Конъюгат по п. 28, где лизосомным ферментом является человеческая α -галактозидаза А.

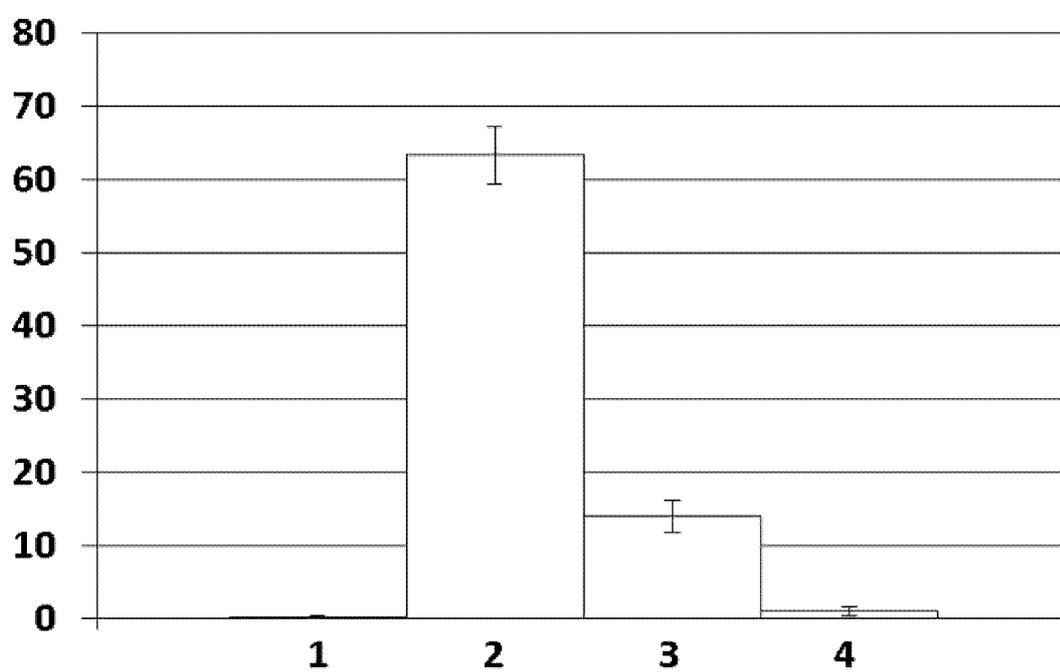
30. Конъюгат по п. 29, где легкая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела содержит последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и где тяжелая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела связана его С-концевой стороной с человеческой α -галактозидазой А через линкерную последовательность (Gly Ser), и полная связанная тяжелая цепь имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 29.

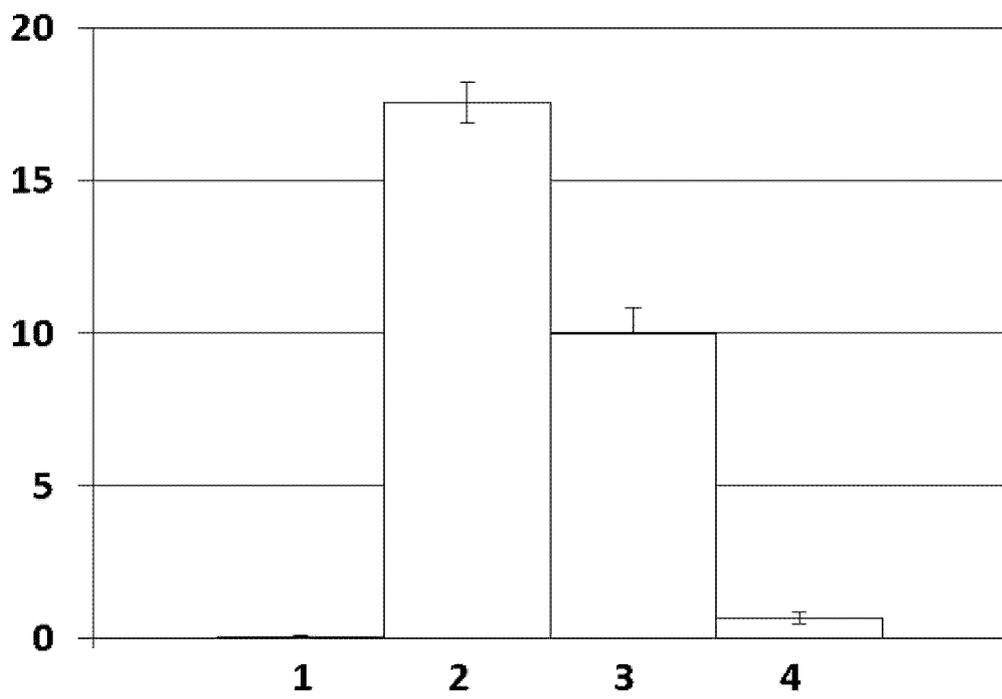
31. Конъюгат по п. 28, где лизосомным ферментом является человеческая кислая α -глюкозидаза.

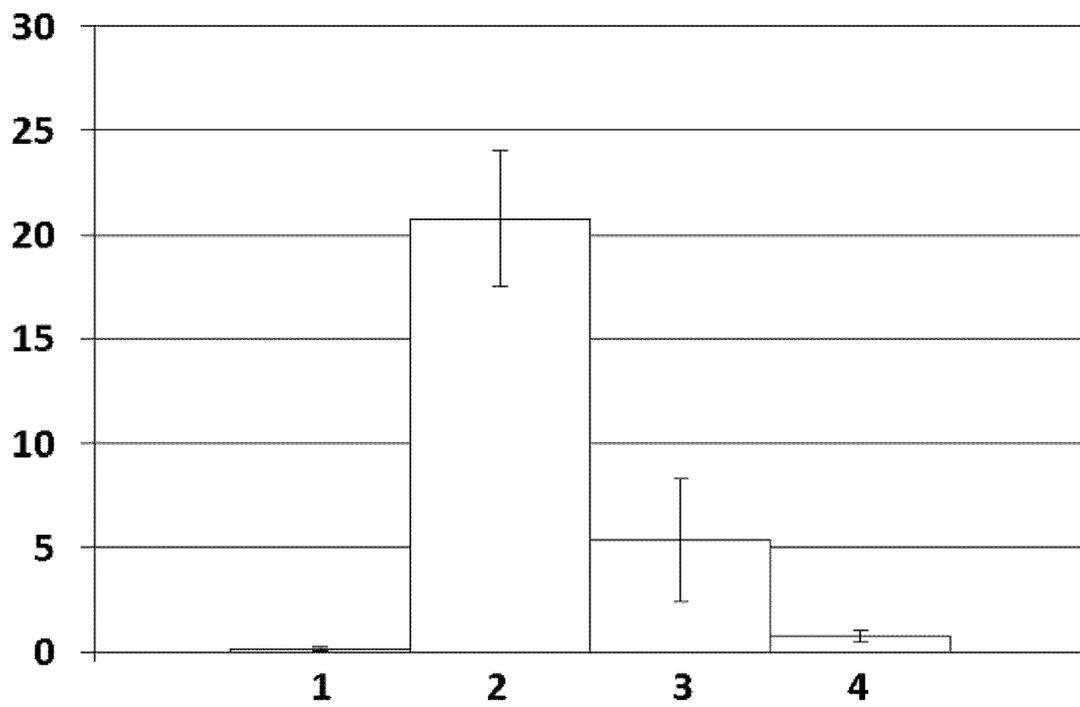
32. Конъюгат по п. 31, где легкая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела содержит последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и где тяжелая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела связана его С-концевой стороной с человеческой кислотой α -глюкозидазы через линкерную последовательность (Gly Ser), и полная связанная тяжелая цепь имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 27.

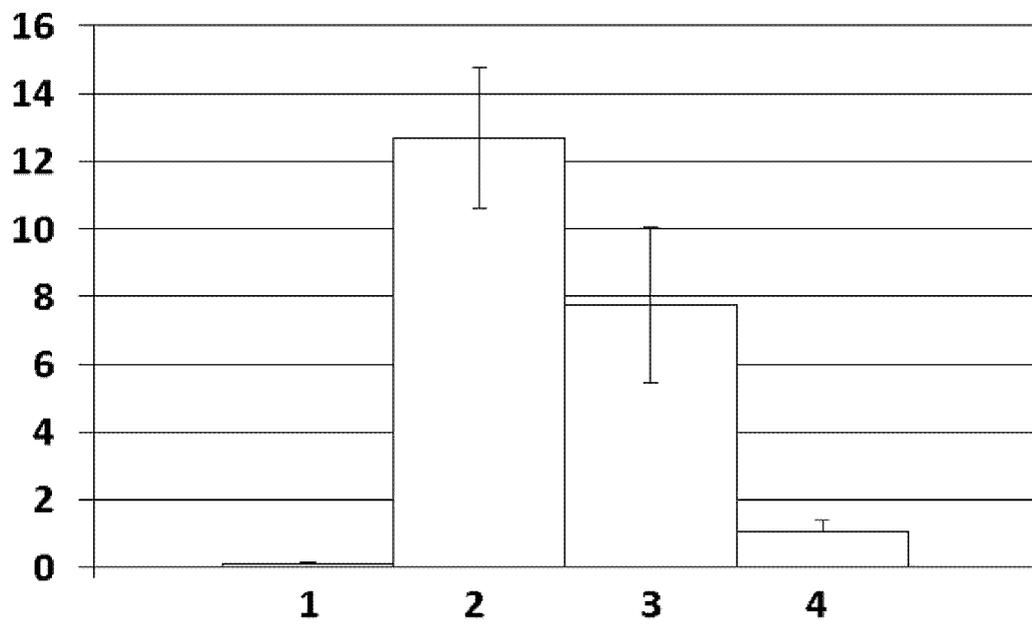
33. Фармацевтическая композиция для улучшения мышечной функции, содержащая конъюгат по любому из пп. 1-32.
34. Фармацевтическая композиция для облегчения мышечной дисфункции, связанной с лизосомной болезнью, содержащая конъюгат по п. 28.
35. Фармацевтическая композиция для облегчения мышечной дисфункции, связанной с болезнью Фабри, содержащая конъюгат по п. 29 или 30.
36. Фармацевтическая композиция для облегчения мышечной дисфункции, связанной с болезнью Помпе, содержащая конъюгат по п. 31 или 32.
37. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 33-36, где мышцей является скелетная мышца, сердечная мышца или гладкая мышца.
38. Применение конъюгата по любому из пп. 28-32 для производства фармацевтической композиции для облегчения мышечной дисфункции, связанной с лизосомной болезнью.
39. Применение конъюгата по п. 29 или 30 для производства фармацевтической композиции для облегчения мышечной дисфункции, связанной с болезнью Фабри.
40. Применение конъюгата по п. 31 или 32 для производства фармацевтической композиции для облегчения мышечной дисфункции, связанной с болезнью Помпе.
41. Применение конъюгата по любому из пп. 1-32 в качестве фармацевтической композиции для улучшения мышечной функции.
42. Способ доставки фармацевтического агента в мышцу, включающий стадию получения агента в виде конъюгата, в котором агент связан с антителом против рецептора трансферрина человека, и стадию введения конъюгата индивидууму.
43. Способ по п. 41, где конъюгатом является конъюгат по любому из пп. 1-32 выше.
44. Способ по п. 42 или 43, дополнительно включающий стадию улучшения мышечной функции индивидуума введением конъюгата.
45. Способ по любому из пп. 42-44, где индивидуум имеет мышечную дисфункцию.
46. Способ по любому из пп. 42-44, где индивидуум имеет мышечную дисфункцию, связанную с лизосомной болезнью.
47. Способ по п. 46, где лизосомной болезнью является болезнь Фабри или болезнь Помпе.

По доверенности

ФИГ.1

ФИГ.2

ФИГ.3

ФИГ.4

ФИГ.5