



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.08.16**

**(21)** Номер заявки  
**201592213**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.05.20**

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

**(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ РЕЦЕПТОРА ТРАНСФЕРРИНА (TfR) И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

**(31)** **61/825,477**

**(32)** **2013.05.20**

**(33)** **US**

**(43)** **2016.04.29**

**(86)** **PCT/US2014/038847**

**(87)** **WO 2014/189973 2014.11.27**

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

**(72)** Изобретатель:  
**Чжан Инь, Зучеро Джой Ю, Этвол  
Джасвиндер, Коуч Джессика, Деннис  
Марк, Эрнст Джеймс, Уоттс Райан,  
Лазар Григори А. (US)**

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

**(56)** HOREJSI V. ET AL.: "MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN LEUKOCYTE ANTIGENS II. ANTIBODIES AGAINST CD45 T200 CD3 T3 CD43 CD10 CALLA TRANSFERRIN RECEPTOR T9 A NOVEL BROADLY EXPRESSED 18-KDA ANTIGEN MEM-43 AND A NOVEL ANTIGEN OF RESTRICTED EXPRESSION MEM-74", FOLIA BIOLOGICA (PRAGUE), vol. 34, no. 1, 1 January 1988 (1988-01-01), pages 23-34, XP009179511, ISSN: 0015-5500, the whole document

POLAKOVA K. ET AL.: "Characterization of a new monoclonal antibody (TR-19) against human transferrin receptor and its application in topographic study.", NEOPLASMA 1991, vol. 38, no. 1, 1991, pages 21-31, XP009179512, ISSN: 0028-2685, the whole document

Biocompare: "anti-Transferrin Receptor (p90, CD71) (TfRC) antibody (APC) ABIN238474 from antibodies-online", Biocompare.com, 1 August 2014 (2014-08-01), XP055133157, Retrieved from the Internet: URL:http://www.biocompare.com/9776-Antibodies/4144935-anti-Transferrin-Receptor-p90-CD71-TfRC-antibody-APC/ [retrieved on 2014-08-04], the whole document

LSbio: "CD71/Transferrin Receptor Mouse anti-Human Monoclonal (APC) (MEM-75) Antibody-LS-C46200-LSBio", 1 August 2014 (2014-08-01), XP055133366, Retrieved from the Internet: URL:http://www.lsbio.com/Documents/PDF/Antibodies/46016 [retrieved on 2014-08-05], the whole document

DANIELS T.R. ET AL.: "The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer", CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 121, no. 2, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 144-158, XP024941315, ISSN: 1521-6616, DOI:10.1016/J.CLIM.2006.06.010 [retrieved on 2006-11-01], the whole document, in particular, Table 1

TRACY R. DANIELS ET AL.: "The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - GENERAL SUBJECTS, vol. 1820, no. 3, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 291-317, XP055133141, ISSN: 0304-4165, DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.07.016. The whole document, in particular section 3.2.3

WHITE S. ET AL.: "COMBINATIONS OF ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR MONOCLONAL ANTIBODIES INHIBIT HUMAN TUMOR CELL GROWTH IN-VITRO AND IN-VIVO EVIDENCE FOR SYNERGISTIC ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 50, no. 19, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 6295-6301, XP008073808, ISSN: 0008-5472. The whole document, in particular, Table 1

TAETLE R. ET AL.: "MECHANISMS OF GROWTH INHIBITION BY ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR MONOCLONAL ANTIBODIES", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 46, no. 4, PART 01, 1 April 1986 (1986-04-01), pages 1758-1763, XP008061610, ISSN: 0008-5472 abstract

WO-A1-2012075037

PAUL STEVEN M.: "Therapeutic antibodies for brain disorders", SCIENCE/SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, WASHINGTON, DC: AAAS, US, vol. 3, no. 84, 25 May 2011 (2011-05-25), page 84ps20, XP009155720, ISSN: 1946-6242 the whole document

COUCH JESSICA A. ET AL.: "Addressing safety liabilities of TfR bispecific antibodies that cross the blood-brain barrier", SCIENCE/SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, WASHINGTON, DC: AAAS, US, vol. 5, no. 183, 1 May 2013 (2013-05-01), XP008163922, ISSN: 1946-6242, DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3005338. The whole document, in particular, p. 61, col. 1, li. 9-11

BIEN-LY NGA ET AL.: "Transferrin receptor (TfR) trafficking determines brain uptake of TfR antibody affinity variants", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 211, no. 2, 10 February 2014 (2014-02-10), pages 233-244, XP009179491, ISSN: 0022-1007, the whole document

WO-A2-2013177062

- 
- (57) Изобретение относится к антителам против рецептора трансферрина. Кроме того, изобретение относится к получению указанного антитела, а именно к нуклеиновой кислоте, кодирующей его, и клетке-хозяину, содержащей указанную нуклеиновую кислоту. Описана фармацевтическая композиция для лечения неврологического расстройства, содержащая указанное антитело, а также его применения для лечения неврологического расстройства, переноса связанного с ним соединения через гематоэнцефалический барьер, в способе увеличения экспонирования CNS субъекта для соединения, в способе увеличения удерживания соединения в CNS.

038367 B1

038367 B1

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к антителам антирецептор трансферрина и к способам их использования.

### **Родственные заявки**

Настоящая заявка испрашивает приоритет временной заявки на патент США № 61/825477, поданной 20 мая 2013 г., которая включается в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

### **Список последовательностей**

Список последовательностей подается параллельно с описанием в качестве текстового файла в формате ASCII через EFS-Web, с именем файла "P5641R1-WO\_SL.txt", время создания 16 мая 2014 г. и размер 154599 байт. Список последовательностей, поданный через EFS-Web, представляет собой часть описания и тем самым включается в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

### **Уровень техники**

Проникновение в головной мозг больших молекул лекарственных средств сильно ограничено посредством в основном непроницаемого гематоэнцефалического барьера (BBB). Среди многих стратегий для преодоления этого препятствия необходимо использовать пути транцитоза эндогенных рецепторов, экспрессируемых в капиллярном эндотелии головного мозга. Конструируются рекомбинантные белки, такие как моноклональные антитела для этих рецепторов, чтобы сделать возможной опосредуемую рецепторами доставку больших молекул в головной мозг. Стратегии доведения до максимума потребления головного мозга, при этом сводя к минимуму обратный транцитоз обратно в кровь, а также доведения до максимума степени аккумуляции после дозирования терапевтического препарата, осуществляются с помощью таких данных, что антитела с низким сродством к рецепторам BBB предлагают потенциальную возможность существенного увеличения переноса через BBB и удерживания в CNS (центральной нервной системе) ассоциированных терапевтических остатков/молекул, по сравнению с типичными антителами с высоким сродством к таким рецепторам (Atwal et al., *Sci. Transl. Med.* 3, 84ra43 (2011); Yu et al., *Sci. Transl. Med.* 25 May 2011:Vol. 3, Issue 84, p. 84ra44). Однако эти антитела не связываются специфично с TfR человека и приматов.

### **Сущность изобретения**

Моноклональные антитела имеют огромный терапевтический потенциал для лечения неврологических заболеваний или заболеваний центральной нервной системы (CNS), но их прохождение в головной мозг ограничено гематоэнцефалическим барьером (BBB). В прошлом исследования показали, что очень малый процент (приблизительно 0,1%) IgG, циркулирующих в кровотоке, проходят через BBB в CNS (Felgenhauer, *Klin. Wschr.* 52:1158-1164 (1974)), при этом концентрация антител в CNS может быть недостаточной, чтобы сделать возможным устойчивое воздействие. Ранее было обнаружено, что процент антител, которые распределяются в CNS, мог бы быть улучшен с использованием рецепторов BBB (т.е. рецептора трансферрина, рецептор инсулина и т.п.) (см., например, WO 9502421). Например, антитело антирецептор BBB может быть сделано мультиспецифичным для нацеливания на один или несколько желаемых антигенов CNS, или одна или несколько гетерологичных молекул могут связываться с антителом антирецептор BBB, в любом случае, антитело антирецептор BBB может помочь в доставке терапевтической молекулы в CNS через BBB.

Однако нацеливание на рецептор BBB традиционного специфичного антитела с высоким сродством, как правило, дает в результате ограниченное увеличение переноса через BBB. Позже авторы обнаружили, что величина потребления антитела и распределение антител в CNS среди исследуемых антител антирецептор BBB обратно пропорциональна его сродству связывания с рецептором BBB. Например, антитело с низким сродством к рецептору трансферрина (TfR), дозируемое при терапевтических уровнях дозы, сильно улучшает перенос через BBB и удерживание в CNS антитела анти-TfR по отношению к антителу анти-TfR с более высоким сродством и делает возможным более легкое получение терапевтических концентраций в CNS (Atwal et al., *Sci. Transl. Med.* 3, 84ra43 (2011)). Доказательство такого переноса через BBB достигают с использованием биспецифичного антитела, которое связывает как TfR, так и фермент, расщепляющий белок-предшественник амилоида (APP),  $\beta$ -секретазу (BACE1). Одна системная доза биспецифичного антитела анти-TfR/BACE1, полученного с помощью генной инженерии с использованием методологии этого изобретения, не только дает в результате значительное потребление антитела в головном мозге, но также кардинально понижает уровни  $A\beta_{40}$  в головном мозге по сравнению с одним только моноспецифичным анти-BACE1, говоря о том, что проницаемость BBB зависит от сильной действия анти-BACE1 (Atwal et al., *Sci. Transl. Med.* 3, 84ra43 (2011); Yu et al., *Sci. Transl. Med.* 3, 84ra44 (2011)).

Эти данные и эксперименты освещают несколько возможных механизмов, стоящих за увеличением потребления антитела в CNS, с использованием подхода с антителами с более низким сродством. Во-первых, антитела антирецептор BBB (BBB-R) с высоким сродством (например, анти-TfR<sup>A</sup> из Atwal et al. and Yu et al., выше) ограничивают потребление в головном мозге из-за быстрого насыщения BBB-R в сосудистой системе головного мозга, уменьшая, таким образом, общее количество антитела, потребляемого в головном мозге, а также ограничивая его распределение в сосудистой системе. Строго говоря,

понижения сродства к BBB-R улучшает потребление и распределение в головном мозге, с устойчивым сдвигом, наблюдаемым при локализации от сосудистой системы к нейронам и ассоциированным нейропилям, распределенным в CNS. Во-вторых, более низкое сродство антител к BBB-R, как предполагается, ослабляет способность антитела к возвращению на сосудистую сторону BBB с помощью BBB-R со стороны CNS мембраны, поскольку общее сродство антитела к BBB-R является низким и локальная концентрация антитела на стороне CNS BBB является ненасыщающей из-за быстрого диспергирования антитела в отделе CNS. В-третьих, *in vivo*, и как наблюдается для системы TfR, антитела с более низким сродством к BBB-R не выводятся из системы так же эффективно, как и антитела с более высоким сродством к BBB-R, и таким образом, они остаются при более высоких циркулирующих концентрациях, чем их аналоги с более высоким сродством. Это является преимущественным, поскольку уровни циркулирующих антител поддерживаются при терапевтических уровнях в течение более продолжительного периода времени для антитела с более низким сродством, чем для антитела с более высоким сродством, что, как следствие, улучшает потребление антитела в головном мозге в течение более продолжительного периода времени. Кроме того, это улучшение экспонирования как для плазмы крови, так и для головного мозга, может уменьшить частоту дозирования в клинике, что имело бы потенциальное преимущество не только для восприимчивости и удобства пациента, но также и для облегчения любых возможных побочных воздействий или нецелевых воздействий антитела и/или терапевтического соединения, связанного с ним.

Антитела BBB-R с низким сродством, описанные в упоминаемой выше работе, выбирают/получают с помощью генной инженерии, чтобы исключить отрицательное влияние на естественное связывание между трансферрином и TfR и, таким образом, устранить потенциальные побочные воздействия, связанные с переносом железа. Тем не менее, при введении определенных таких антител мышам наблюдаются некоторые заметные побочные воздействия. Мыши демонстрируют первичную реакцию устойчивого обеднения популяции ретикулоцитов, сопровождаемую быстрым наступлением острых клинических симптомов. Хотя мыши восстанавливаются как после острых клинических симптомов, так и после уменьшения уровней ретикулоцитов, по ходу дела, устранение или иное ослабление этого влияния на ретикулоциты является, очевидно, желательным для антитела анти-TfR, чтобы его можно было использовать безопасно в качестве терапевтической молекулы. Обнаружено, что первичная реакция на введение анти-TfR (устойчивое обеднение ретикулоцитов и острые клинические признаки) вызывается по большей части активностью антитело-зависимой опосредуемой клетками цитотоксичности (ADCC) антитела, при этом остаточное воздействие обеднения ретикулоцитов опосредуется с помощью пути комплемента.

Эти предыдущие исследования использовали антитела мыши, которые специфично связываются с TfR мыши, но которые не распознают специфично TfR приматов или человека.

Соответственно, настоящее изобретение предлагает антитела и их функциональные части, которые распознают специфично TfR как приматов, так и человека, чтобы упростить исследования безопасности и эффективности на приматах с помощью антител перед терапевтическим или диагностическим применением на людях. Исследования *in vitro* с использованием линии клеток эритробластов человека и первичных клеток костного мозга, обработанных антителами анти-TfR человека, по настоящему изобретению демонстрирует, что устойчивое обеднение TfR-положительных эритроидных клеток может так же наблюдаться в клеточных системах человека/приматов, как и на мышах (см., например, пример 4).

Соответственно, в настоящем документе предлагаются также модификации антител по настоящему изобретению для значительного понижения или устранения нежелательного уменьшения популяции Tf-экспрессирующих ретикулоцитов при введении антител анти-TfR, при этом по-прежнему делая возможным увеличение переноса через BBB, увеличение распределения в CNS и удерживания в CNS, обеспечиваемого антителами анти-TfR человека/приматов, введенных при терапевтических концентрациях. В настоящем документе предлагаются несколько общих подходов для ослабления наблюдаемого воздействия антител анти-TfR по настоящему изобретению как на первичное, так и на остаточное обеднение ретикулоцитов, и они могут использоваться по отдельности или в сочетании.

В одном из подходов эффекторная функция антитела анти-TfR человека/цино (обезьян циномогус) уменьшается или устраняется для уменьшения или устранения активности ADCC. В другом подходе сродство антитела анти-TfR человека/цино к TfR человека или приматов дополнительно уменьшается таким образом, что взаимодействия антитела с популяцией ретикулоцитов являются менее вредными для этой популяции. Третий подход направлен на уменьшение количества антитела анти-TfR человека/цино, которое присутствует в плазме крови, для уменьшения экспонирования популяции ретикулоцитов для потенциально вредных концентраций антитела. Четвертый подход пытается защитить, стабилизировать и/или восполнить популяции ретикулоцитов таким образом, что любое потенциальное обеднение популяции ретикулоцитов в циркуляции или в костном мозге посредством введения антитела анти-TfR человека/цино предотвращается, уменьшается или ослабляется.

Уменьшение или устранение эффекторной функции, как описано в настоящем документе, может осуществляться посредством: (i) уменьшения или устранения гликозилирования антитела млекопитающих дикого типа (например, посредством продуцирования антитела в окружающей среде, где такое гликозилирование не может осуществляться, посредством мутации в одной или нескольких точках присоединения углеводов таким образом, что антитело не может гликозилироваться, или посредством химиче-

ского или ферментативного удаления одного или нескольких углеводов из антитела после того, как оно гликозилируется); (ii) посредством уменьшения или устранения способности антитела анти-TfR человека/цино к связыванию с Fc рецептором (например, посредством мутации Fc области, посредством делеции в Fc области или устранения Fc области); или (iii) посредством использования изоформа антитела, о котором известно, что оно имеет минимальную эффекторную функцию или не имеет ее (т.е. включая, но не ограничиваясь этим, IgG4).

Уменьшение активирования комплемента антителом, как описано в настоящем документе, может осуществляться посредством уменьшения или устранения способности антитела анти-TfR человека/цино к связыванию C1q (например, посредством мутации, делеции в Fc области или устранения Fc области, или посредством модификации части антитела анти-TfR человека/цино иной, чем Fc часть), или посредством подавления иным образом активирования или активности системы комплемента (например, посредством совместного введения одного или нескольких ингибиторов активирования пути комплемента или активности пути комплемента).

При связывании антитела анти-TfR человека/цино с TfR человека или цино на ретикулоцитах или на других типах клеток, экспрессирующих высокие уровни TfR, запускается их обеднение, как для антител анти-TfR человека/цино, иллюстрируемых в настоящем документе, уменьшение связывания антител с TfR человека или цино на ретикулоцитах или на других типах клеток должно, в свою очередь, уменьшить величину обеднения ретикулоцитов или других типов клеток в циркуляции или в костном мозге, наблюдаемую при введении антитела. Сродство антитела анти-TfR человека/цино к TfR приматов или человека может модифицироваться с использованием любого из способов, описанных в настоящем документе, и как показано в примерах.

Уменьшение количества антитела анти-TfR человека/цино, присутствующего в плазме крови, для уменьшения экспонирования популяции ретикулоцитов для потенциально вредных концентраций антитела, может осуществляться несколькими способами. Один из способов заключается просто в уменьшении количества антитела, которое дозируется, потенциально, в это же время увеличивая также частоту дозирования, так что максимальная концентрация в плазме понижается, но поддерживается уровень в сыворотке, достаточный для эффективности, в то же время по-прежнему находящийся ниже порога побочного воздействия обеднения клеток. Другой способ, который может объединяться с модификациями дозирования, заключается в выборе или получении с помощью генной инженерии антитела анти-TfR, которое имеет рН-чувствительное связывание с TfR, так что оно связывается с TfR на поверхности клеток в плазме крови при рН 7,4 при желательном низком сродстве, как описано в настоящем документе, но при интернализации в эндосомальном компартменте, такое связывание с TfR быстро и значительно уменьшается при относительно более низком рН этого компартмента (рН 5,5-6,0). Такая диссоциация может защитить антитело от выведения, опосредуемого антигеном, или повысить количество антитела, которое либо доставляется в CNS, либо рециклируется обратно через BBB - в любом случае, эффективная концентрация антитела увеличивается по сравнению с антителом анти-TfR, которое не имеет такой рН-чувствительности, без увеличения вводимой дозы антитела, и в свою очередь, потенциально позволяет понизить дозу антитела при одновременном снижении риска побочных воздействий.

Защита, стабилизация и/или восполнение популяции ретикулоцитов может осуществляться с использованием фармацевтических или физических способов. В дополнение к антителу анти-TfR человека/цино совместно с ним может вводиться по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент (одновременно или последовательно), который ослабляет отрицательные побочные воздействия антитела на популяции ретикулоцитов. Примеры таких терапевтических агентов включают, но не ограничиваясь этим, эритропоэтин (ЕРО), добавки, содержащие железо, витамин С, фолиевую кислоту и витамин В12. Физическая замена эритроцитов (т.е. ретикулоцитов) является также возможной, например, посредством трансфузии с помощью сходных клеток, которые могут происходить от другого индивидуума со сходным типом крови или могут предварительно извлекаться из субъекта, которому вводили антитело анти-TfR человека/цино.

Специалист в данной области увидит, что любое сочетание упомянутых выше способов можно использовать для получения с помощью генной инженерии антитела (и/или режима его дозирования) с оптимальным балансом между (i) желательным низким сродством к TfR приматов или человека, которое будет доводить до максимума перенос антитела и любых конъюгированных соединений в CNS; (ii) сродством конъюгированного соединения (включая в качестве неограничивающего примера, вторую или дополнительную специфичность связывания антигена у антитела анти-TfR человека/цино) к его антигену в CNS, поскольку это важно для того количества соединения, которое должно присутствовать в CNS для получения терапевтического воздействия; (iii) скоростью выведения антитела анти-TfR человека/цино; (iv) лабильностью анти-TfR/конъюгированного соединения при низких рН для облегчения высвобождения конъюгированного соединения на стороне CNS/головного мозга BBB и (v) влиянием на популяции ретикулоцитов.

Также будет ясно, что воздействие обеднения ретикулоцитов, наблюдаемое в настоящем документе, для введения антитела анти-TfR, может быть полезным при лечении любого заболевания или расстройства, где проблема заключается в сверхпролиферации ретикулоцитов. Например, при врожденной поли-

цитемии или при истинной неопластической полицитемии, повышенные количества эритроцитов из-за гиперпролиферации, например, ретикулоцитов, дают в результате загущение крови и сопутствующие физиологические симптомы. Введение антитела анти-TfR человека/цино по настоящему изобретению, где эффекторная функция антитела консервируется, по меньшей мере частично, сделало бы возможным селективное удаление популяции незрелых ретикулоцитов без влияния на нормальный перенос трансферрина в CNS. Дозирование такого антитела может модулироваться таким образом, что острые клинические симптомы могли бы сводиться к минимуму (например, посредством дозирования при очень низкой дозе или через большие временные интервалы), как хорошо понимают в данной области.

Антитела анти-TfR/BACE1 и анти-TfR/A $\beta$ , каждое, представляют собой обещающие и новые терапевтические кандидаты для лечения болезни Альцгеймера. Кроме того, технология биспецифичного нацеливания на основе переноса, опосредуемого рецепторами (RMT), открывает дверь для широкого диапазона потенциальных терапевтических препаратов против заболеваний CNS. Настоящее изобретение предлагает способы получения с помощью генной инженерии терапевтических препаратов, проникающих через BBB, которые значительно улучшают перенос через BBB и распределение в CNS терапевтических препаратов без обеднения ретикулоцитов.

Соответственно, в первом варианте осуществления настоящее изобретение предлагает изолированное антитело, которое связывается с рецептором трансферрина человека (TfR) и TfR приматов, где антитело не ингибирует связывания трансферрина с TfR. В одном из аспектов связывание представляет собой специфичное связывание. В другом аспекте антитело, кроме того, не ингибирует связывания белка гематоматога человека ("HFE") с TfR. В одном из аспектов связывание представляет собой специфичное связывание. В другом аспекте антитело представляет собой моноклональное антитело. В другом аспекте антитело представляет собой антитело человека. В другом аспекте антитело представляет собой гуманизованное антитело. В другом аспекте антитело представляет собой химерное антитело. В другом аспекте антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывает TfR человека и TfR приматов. В другом аспекте TfR приматов происходит от обезьян циномогус.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления антитело содержит HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, соответственно, содержащие последовательности аминокислот SEQ ID NO: 50, 51 и 52 и HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 соответственно, содержащие последовательности аминокислот SEQ ID NO: 53, 156 и 55. В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления антитело содержит (a) последовательность VH, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей аминокислот с SEQ ID NO: 153; (b) последовательность VL, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей аминокислот с SEQ ID NO: 105; или (c) последовательность VH как в (a) и последовательность VL как в (b). В другом таком аспекте антитело содержит последовательность VL, SEQ ID NO: 105 и последовательность VH, SEQ ID NO: 153. В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления антитело связано с терапевтическим соединением. В другом аспекте указанного выше варианта осуществления антитело связано с агентом для получения изображений или меткой. В одном из таких аспектов антитело представляет собой мультиспецифичное антитело, и терапевтическое соединение необязательно образует одну из частей мультиспецифичного антитела. В одном из таких аспектов мультиспецифичное антитело содержит первый сайт связывания антигена, который связывает TfR, и второй сайт связывания антигена, который связывает антиген головного мозга. В одном из таких аспектов, антиген головного мозга выбирается из группы, состоящей из  $\beta$ -секретазы 1 (BACE1), A $\beta$ , рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), тау, аполипотеина E (ApoE),  $\alpha$ -синуклина, CD20, хантингтина, прионного белка (PrP), обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2), паркина, презенилина 1, презенилина 2,  $\gamma$ -секретазы, рецептора гибели 6 (DR6), белка предшественника амилоида (APP), рецептора p75 нейротрофина (p75NTR) и каспазы 6. В другом таком аспекте мультиспецифичное антитело связывается как с TfR, так и с BACE1. В другом таком аспекте мультиспецифичное антитело связывается как с TfR, так и с A $\beta$ . В другом таком аспекте терапевтическое соединение представляет собой лекарственное средство против неврологического расстройства.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления настоящее изобретение предлагает изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую любое из упомянутых выше антител. В другом аспекте настоящее изобретение предлагает клетку хозяина, содержащую такую нуклеиновую кислоту. В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ продуцирования любого из упомянутых выше антител, включающий культивирование такой клетки хозяина, что продуцируется антитело, и необязательно дополнительно включающий извлечение антитела из клетки хозяина.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления настоящее изобретение предлагает фармацевтический препарат, содержащий любое из упомянутых выше антител и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления настоящее изобретение предлагает любое из упомянутых выше антител для применения в качестве лекарственного препарата. В другом аспекте указанного выше варианта осуществления настоящее изобретение предлагает применение любого

из упомянутых выше антител при производстве лекарственного препарата для лечения неврологического расстройства. В одном из таких аспектов неврологическое расстройство выбирается из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства глазного заболевания, эпилептического расстройства, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления CNS.

В другом аспекте рассмотренного выше варианта осуществления настоящее изобретение предлагает любое из упомянутых выше антител для применения при лечении неврологического расстройства. В одном из таких аспектов неврологическое расстройство выбирается из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства глазного заболевания, эпилептического расстройства, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления CNS.

В другом аспекте рассмотренного выше варианта осуществления настоящее изобретение предлагает любое из упомянутых выше антител для применения при переносе одного или нескольких соединений через BBB. В другом аспекте указанного выше варианта осуществления предлагается применение любого из упомянутых выше антител при производстве лекарственного препарата для переноса одного или нескольких соединений через BBB.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления предлагается способ переноса соединения через BBB субъекта, включающий экспонирование любого из упомянутых выше антител для BBB таким образом, что антитело переносит соединение, связанное с ним, через BBB. В другом таком аспекте BBB принадлежит субъекту человеку. В другом таком аспекте величина дозы и/или частота введения модулируется для уменьшения концентрации антител, для которой экспонируются эритроциты. В другом таком аспекте, способ дополнительно включает стадию мониторинга субъекта относительно обеднения эритроцитов. В другом таком аспекте антитело, связанное с соединением, вводится в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов, терапевтическая доза является TfR-насыщающей. В другом таком аспекте введение антитела осуществляется в дозе и/или частоте дозирования, калибруемой для сведения к минимуму острых клинических симптомов от введения антитела.

В другом аспекте рассмотренного выше варианта осуществления предлагается способ увеличения экспонирования CNS субъекта для соединения, включающий экспонирование любого из упомянутых выше антител для BBB таким образом, что антитело переносит соединение, связанное с ним, через BBB. В другом таком аспекте BBB принадлежит субъекту человеку. В другом таком аспекте, величина дозы и/или частота введения модулируется для уменьшения концентрации антитела, для которого экспонируются эритроциты. В другом таком аспекте способ дополнительно включает стадию мониторинга субъекта относительно обеднения эритроцитов. В другом таком аспекте антитело, связанное с соединением, вводится в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтическая доза является TfR-насыщающей. В другом таком аспекте введение антитела осуществляется в дозе и/или частоте дозы, калибруемой для сведения к минимуму острых клинических симптомов от введения антитела.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления предлагается способ повышения удержания в CNS соединения, вводимого субъекту, включающий экспонирование любого из упомянутых выше антител для BBB таким образом, что удерживание соединения в CNS увеличивается. В другом таком аспекте BBB принадлежит субъекту человеку. В другом таком аспекте величина дозы и/или частота введения модулируется для уменьшения концентрации антитела, для которого экспонируются эритроциты. В другом таком аспекте способ дополнительно включает стадию мониторинга субъекта относительно обеднения эритроцитов. В другом таком аспекте антитело, связанное с соединением, вводится в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтическая доза является TfR-насыщающей. В другом таком аспекте введение антитела осуществляется в дозе и/или частоте дозы, калибруемой для сведения к минимуму острых клинических симптомов от введения антитела.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления предлагается способ лечения неврологического расстройства у млекопитающего, включающий лечение млекопитающего с помощью любого из упомянутых выше антител. В одном из таких аспектов неврологическое расстройство выбирается из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства глазного заболевания, эпилептического расстройства, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления CNS. В другом таком аспекте неврологическое расстройство относится к субъекту человеку. В другом таком аспекте величина дозы и/или частота введения модулируется для уменьшения концентрация антитела, для которого экспонируются эритроциты. В другом таком аспекте, способ дополнительно включает стадию мониторинга субъекта относительно обеднения эритроцитов. В другом таком аспекте антитело, связанное с соединением, вводится в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтическая доза является TfR-насыщающей. В другом таком аспекте введение антитела осуществляется в дозе и/или частоте дозы, калибруемой для сведения к минимуму острых клинических симптомов от введения антитела.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает изолированное антитело, которое связывается с TfR человека и TfR приматов, где антитело не ингибирует связывания трансферрина с TfR и где одно или несколько свойств антитела модифицируются для уменьшения или устранения вли-

яния антитела на ретикулоциты и/или для уменьшения тяжести или присутствия острых клинических симптомов у субъекта или млекопитающего, которого лечат с помощью антитела. В одном из аспектов связывание представляет собой специфичное связывание. В другом аспекте антитело, кроме того, не ингибирует связывания HFE с TfR. В одном из аспектов антитело представляет собой моноклональное антитело. В другом аспекте антитело представляет собой антитело человека. В другом аспекте антитело представляет собой гуманизированное антитело. В другом аспекте антитело представляет собой химерное антитело. В другом аспекте антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывает TfR человека и TfR примата. В другом аспекте TfR примата происходит от обезьяны циномогус.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления антитело модифицируется в одном или нескольких положениях аминокислот в VH или VL до аминокислоты, показанной для этого положения на фиг. 4E-1 и 4E-2. В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления одно или несколько свойств антитела выбирают из эффекторной функции Fc области антитела, функции активирования комплемента антитела и сродства антитела к TfR. В одном из таких аспектов свойство представляет собой эффекторную функцию в Fc области антитела. В другом таком аспекте свойство представляет собой функцию активирования комплемента антитела. В другом аспекте свойство представляет собой сродство антитела к TfR. В одном из таких аспектов эффекторная функция или функция активирования комплемента уменьшается или устраняется по отношению к антителу дикого типа такого же изотипа. В одном из аспектов эффекторная функция уменьшается или устраняется с помощью способа, выбранного из понижения гликозилирования антитела, модификации изотипа антитела до изотипа, который имеет естественным образом уменьшенную или устраненную эффекторную функцию, и модификации Fc области.

В одном из таких аспектов эффекторная функция уменьшается или устраняется посредством понижения гликозилирования антитела. В одном из таких аспектов гликозилирование антитела уменьшается с помощью способа, выбранного из продуцирования антитела в окружающей среде, которая не дает возможности для гликозилирования дикого типа; удаления углеводных групп, уже присутствующих на антителе; и модификации антитела таким образом, что гликозилирование дикого типа не осуществляется. В одном из таких аспектов гликозилирование антитела уменьшается посредством продуцирования антитела в окружающей среде, которая не дает возможности для гликозилирования дикого типа, такого как продуцирование в системе продуцирования клеток типа, отличного от млекопитающих, или когда антитело продуцируется синтетически. В одном из таких аспектов антитело продуцируется в системе продуцирования клеток, отличной от млекопитающих. В другом таком аспекте антитело продуцируется синтетически. В другом таком аспекте гликозилирование антитела уменьшается посредством модификации антитела таким образом, что гликозилирование дикого типа не осуществляется, например, где Fc область антитела содержит мутацию в положении 297, так что аспарагиновый остаток дикого типа в этом положении заменен другой аминокислотой, которая отрицательно влияет на гликозилирование в этом положении.

В другом таком аспекте эффекторная функция уменьшается или устраняется посредством по меньшей мере одной модификации Fc области. В одном из таких аспектов, эффекторная функция или функция активирования комплемента уменьшается или устраняется посредством делеции всей Fc области или ее части, или посредством получения с помощью генной инженерии такого антитела, что оно не содержит Fc области или отличной от Fc области, конкурирующей за эффекторную функцию или за функцию активирования комплемента. В другом таком аспекте по меньшей мере одна модификация Fc области выбирается из точечной мутации Fc области для ослабления связывания с одним или несколькими Fc рецепторами, выбранной из следующих положений: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 и 439; точечной мутации Fc области для ослабления связывания с C1q, выбранной из следующих положений: 270, 322, 329 и 321; устранения некоторой части или всей Fc области и точечной мутации в положении 132 домена CN1. В одном из таких аспектов модификация представляет собой точечную мутацию Fc области для ослабления связывания с C1q, выбранной из следующих положений: 270, 322, 329 и 321. В другом таком аспекте модификация представляет собой устранение некоторой части или всей Fc области. В другом таком аспекте функция активирования комплемента уменьшается или устраняется посредством делеции всей Fc области или ее части или посредством получения с помощью генной инженерии такого антитела, что оно не включает Fc области, которая вовлечена в путь комплемента. В одном из таких аспектов антитело выбирается из Fab или одноцепочечного антитела. В другом таком аспекте отличная от Fc область антитела модифицируется для уменьшения или устранения активирования пути комплемента с помощью антитела. В одном из таких аспектов модификация представляет собой точечную мутацию области CN1 для ослабления связывания с C3. В одном из таких аспектов точечная мутация находится в положении 132 (см., например, Vidarte et al., (2001) *J. Biol. Chem.* 276(41):38217-38223).

В одном из аспектов время полужизни антитела повышается посредством модификации в области связывания FcRn. В одном из аспектов модификация представляет собой замещение аминокислоты, выбранное из следующих положений: 251 256, 285, 290, 308, 314, 385, 389, 428, 434, 436, 238, 265, 272, 286,

303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434. В одном из аспектов модификация представляет собой замещение, выбранное из следующих: M252Y, S254T, T256E, N434A и Y436I.

В одном из аспектов антитело объединяют с дополнительным соединением, которое ослабляет или вносит вклад в уменьшение влияния на уровни ретикулоцитов или на острые клинические симптомы. В одном из таких аспектов дополнительное соединение защищает ретикулоциты от связанного с антителом обеднения или поддерживает рост, развитие или восполнение ретикулоцитов. В другом таком аспекте дополнительное соединение выбирается из эритропоэтина (ЕРО), добавки, содержащей железо, витамина С, фолиевой кислоты и витамина В12 или эритроцитов или ретикулоцитов.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления сродство антитела к TfR уменьшается, как измерено по отношению к антителу дикого типа того же изотипа, не имеющему пониженного сродства к TfR. В одном из таких аспектов антитело имеет KD или IC<sub>50</sub> по отношению к TfR примерно от 1 пМ примерно до 100 мкМ. В другом аспекте величина дозы и/или частота введения антитела модулируется для уменьшения концентрации антитела, для которого экспонируются эритроциты.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления антитело связывается с терапевтическим соединением. В другом аспекте указанного выше варианта осуществления антитело связывается с агентом для получения изображений или с меткой. В одном из таких аспектов антитело представляет собой мультиспецифичное антитело, и терапевтическое соединение необязательно образует одну из частей мультиспецифичного антитела. В одном из таких аспектов мультиспецифичное антитело содержит первый сайт связывания антигена, который связывает TfR, и второй сайт связывания антигена, который связывает антиген головного мозга. В одном из таких аспектов антиген головного мозга выбирают из группы, состоящей из β-секретазы 1 (BACE1), Aβ, эпидермального фактора роста рецептора (EGFR), рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), тау, аполипопротеина E (ApoE), α-синуклеина, CD20, хантингтина, прионного белка (PrP), обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2), паркина, презенилина 1, презенилина 2, γ-секретазы, рецептора гибели 6 (DR6), белка предшественника амилоида (APP), рецептора нейротропина p75 (p75NTR) и каспазы 6. В другом таком аспекте мультиспецифичное антитело связывается как с TfR, так и с BACE1. В другом таком аспекте мультиспецифичное антитело связывается как с TfR, так и с Aβ. В другом таком аспекте терапевтическое соединение представляет собой лекарственное средство против неврологического расстройства.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления настоящее изобретение предлагает изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую любое из упомянутых выше антител. В другом аспекте настоящее изобретение предлагает клетку хозяина, содержащую такую нуклеиновую кислоту. В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ продуцирования любого из упомянутых выше антител, включающий культивирование такой клетки-хозяина таким образом, что продуцируется антитело, и необязательно дополнительно включающий извлечение антитела из клетки-хозяина.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления настоящее изобретение предлагает фармацевтический препарат, содержащий любое из упомянутых выше антител и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления настоящее изобретение предлагает любое из упомянутых выше антител для применения в качестве лекарственного препарата. В другом аспекте указанного выше варианта осуществления настоящее изобретение предлагает применение любого из упомянутых выше антител при производстве лекарственного препарата для лечения неврологического расстройства. В одном из таких аспектов неврологическое расстройство выбирается из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства глазного заболевания, эпилептического расстройства, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления CNS.

В другом аспекте рассмотренного выше варианта осуществления настоящее изобретение предлагает любое из упомянутых выше антител для применения при лечении неврологического расстройства. В одном из таких аспектов неврологическое расстройство выбирается из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства глазного заболевания, эпилептического расстройства, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления CNS.

В другом аспекте рассмотренного выше варианта осуществления настоящее изобретение предлагает любое из упомянутых выше антител для применения с целью переноса одного или нескольких соединений через BBB. В другом аспекте указанного выше варианта осуществления предлагается применение любого из упомянутых выше антител при производстве лекарственного препарата для переноса одного или нескольких соединений через BBB.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления предлагается способ переноса соединения через BBB у субъекта, включающий экспонирование любого из упомянутых выше антител для BBB таким образом, что антитело переносит соединение, связанное с ним, через BBB. В другом таком аспекте BBB принадлежит субъекту-человеку. В другом таком аспекте величина дозы и/или частота ве-

дения модулируется для уменьшения концентрации антитела, для которого экспонируются эритроциты. В другом таком аспекте способ дополнительно включает стадию мониторинга субъекта относительно обеднения эритроцитов. В другом таком аспекте антитело, связанное с соединением, вводится в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтическая доза является TfR-насыщающей. В другом таком аспекте введение антитела осуществляется в дозе и/или частоте дозы, калибруемой для сведения к минимуму острых клинических симптомов от введения антитела.

В другом аспекте рассмотренного выше варианта осуществления предлагается способ увеличения экспонирования CNS субъекта для соединения, включающий экспонирование любого из упомянутых выше антител для BBB таким образом, что антитело переносит соединение, связанное с ним, через BBB. В другом таком аспекте BBB принадлежит субъекту-человеку. В другом таком аспекте величина дозы и/или частота введения модулируется для уменьшения концентрации антитела, для которого экспонируются эритроциты. В другом таком аспекте способ дополнительно включает стадию мониторинга субъекта относительно обеднения эритроцитов. В другом таком аспекте антитело, связанное с соединением, вводится в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтическая доза является TfR-насыщающей. В другом таком аспекте введение антитела осуществляется в дозе и/или частоте дозы, калибруемой для сведения к минимуму острых клинических симптомов от введения антитела.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления предлагается способ увеличения удержания в CNS соединения, вводимого субъекту, включающий экспонирование любого из упомянутых выше антител для BBB таким образом, что удерживание в CNS соединения увеличивается. В другом таком аспекте BBB принадлежит субъекту-человеку. В другом таком аспекте величина дозы и/или частота введения модулируется для уменьшения концентрации антитела, для которого экспонируются эритроциты. В другом таком аспекте способ дополнительно включает стадию мониторинга субъекта относительно обеднения эритроцитов. В другом таком аспекте антитело, связанное с соединением, вводится в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтическая доза является TfR-насыщающей. В другом таком аспекте введение антитела осуществляется в дозе и/или частоте дозы, калибруемой для сведения к минимуму острых клинических симптомов от введения антитела.

В одном из аспектов указанного выше варианта осуществления предлагается способ лечения неврологического расстройства у млекопитающего, включающий лечение млекопитающего с помощью любого из упомянутых выше антител. В одном из таких аспектов неврологическое расстройство выбирается из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства глазного заболевания, эпилептического расстройства, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления CNS. В другом таком аспекте неврологическое расстройство относится к субъекту-человеку. В другом таком аспекте величина дозы и/или частота введения модулируется для уменьшения концентрации антитела, для которого экспонируются эритроциты. В другом таком аспекте способ дополнительно включает стадию мониторинга субъекта относительно обеднения эритроцитов. В другом таком аспекте антитело, связанное с соединением, вводится в терапевтической дозе. В одном из таких аспектов терапевтическая доза является TfR-насыщающей. В другом таком аспекте введение антитела осуществляется в дозе и/или частоте дозы, калибруемой для сведения к минимуму острых клинических симптомов от введения антитела.

Будет понятно, что любой из упомянутых выше способов и композиций по настоящему изобретению может быть объединен с другими и/или с дополнительными аспектами настоящего изобретения, описанными в настоящем описании.

#### **Краткое описание фигур**

Фиг. 1 изображает трехмерную кристаллическую структуру димера TfR в комплексе с Tf на основе файла pdb 3SM9. Отмечена апикальная область TfR, не связывающаяся с Tf.

Фиг. 2A-2B изображают анализ FACS связывания супернатантов родительских клонов гибридомы мышей с TfR человека и циномоглус, транзиторно экспрессируемыми в клетки 293 в присутствии 1 мкМ голо-Tf человека. Если не указано иного, линия, ограничивающая серое поле, на каждом графике представляет собой фон от детектирования антител, серая линия средней толщины представляет собой связывание с 293 клетками, которые эндогенно экспрессируют базальные уровни TfR человека, толстая черная линия представляет связывание с транзиторно экспрессируемым TfR человека и тонкая серая линия представляет связывание с транзиторно экспрессируемым TfR цино.

Фиг. 2C изображает результаты перекрестно-реактивных конкурентных анализов антитела человека/циномоглус, как описано в примере 1. Девять из четырнадцати клонов, как обнаружено, блокируют связывание антитела с апикальным связыванием согласно фаговому дисплею.

Фиг. 3A-1, 3A-2, 3B-1, 3B-2, 3C-1, 3C-2, 3D-1 и 3D-2 изображают последовательности переменных областей тяжелых и легких цепей клонов гибридомы, которые связываются с апикальными и неапикальными областями TfR. Последовательности могут дополнительно подразделяться по эпитопу и сходству последовательностей на класс I-III (апикальное связывание) и класс IV (неапикальное связывание). HVR согласно Kabat указаны посредством подчеркивания.

Фиг. 4A-1, 4A-2, 4B-1, 4B-2, 4C-1, 4C-2, 4D-1 и 4D-2 изображают выравнивания гуманизованных последовательностей для (A) 15G11, (B) 7A4/8A2, (C) 7G7 и (D) 16F6. Каждая последовательность легко-

го или тяжелого вариабельного домена мыши (вторая строчка) выравнивается по ближайшей зародышевой линии человека или по консенсусному вариабельному домену (первая строчка). Гуманизованная версия для каждого антитела показана внизу (третья строчка). Отличия от зародышевой линии человека или от консенсусной последовательности затенены. Последовательности HVR, которые прививаются в каркас человека, обведены прямоугольником. Показаны определения CDR согласно Kabat.

Фиг. 4E-1 и 4E-2 показывают, что группы антител класса I-III, варианты формы антител с модификациями на одном или нескольких остатках FR сохраняют сродство и специфичность связывания.

Фиг. 5 изображает связывание hu7A4.v15, hu15G11.v5 и hu7G7.v1 с huTfR в присутствии 6,3 мкМ голо-Tf. Связывание антитела на иммобилизованных huTfR показано в присутствии (пустые символы и прерывистые линии) или в отсутствие (закрашенные символы и сплошные линии) 6,3 мкМ голо-Tf.

Фиг. 6A-B изображают результаты анализов связывания HFE-HuTfR и блокирования HFE, описанных в примере 1. Фиг. 6A показывает связывание антитела при увеличивающихся концентрациях huTfR, захваченных с помощью иммобилизованных HFE. Фиг. 6B показывает связывание huTfR на иммобилизованных HFE в присутствии увеличенной концентрации антитела.

Фиг. 7A-B изображают анализы связывания 15G11.v5 и 7A4.v5 IgG и вариантов Fab Ala с TfR цино и человека, демонстрирующие воздействия на сродство мутаций Ala в CDR-L3 и CDR-H3 каждого антитела, оцениваемых как IgG, с помощью связывания ELISA, и IgG или Fab - с помощью анализа SPR иммобилизованных TfR человека или цино, как описано в примере 2.

Фиг. 8A-B и 9A-B изображают результаты экспериментов, оценивающих воздействия статуса эффекторной функции на активность ADCC антител анти-TfR человека ("анти-hTFR") в первичных мононуклеарных клетках костного мозга человека или в линии клеток эритробластов человека, как описано в примере 4.

Фиг. 10 изображает схему дозирования и отбора образцов для исследований на приматах, описанных в примере 5.

Фиг. 11A-11B изображают фармакокинетические результаты экспериментов, описанных в примере 5, конкретно, индивидуальные и средние по группам концентрации в сыворотке анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1, анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1 и анти-gD, как функцию времени после однократного внутривенного введения болюса при 30 мг/кг на обезьянах циномогус в сыворотке (фиг. 11A) и CSF (фиг. 11B).

Фиг. 12A-12E изображают фармакодинамические результаты экспериментов, описанных в примере 5, конкретно, индивидуальные и средние по группам концентрации анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1, анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1 и анти-gD в плазме (A) или в CSF (B-E) как функцию времени после однократного внутривенного введения болюса при 30 мг/кг обезьянам циномогус. Верхние панели показывают уровни A $\beta$ <sub>1-40</sub> в плазме (фиг. 12A) и CSF (фиг. 12B), в то время как нижние панели показывают уровни растворимого APP (фиг. 12C), уровни растворимого APP $\beta$  (фиг. 12D) и отношение sAPP $\beta$ /sAPP $\alpha$  (фиг. 12E) как функцию времени.

Фиг. 13A-13D изображают результаты отбора гематологических образцов, осуществляемого в течение исследований, описанных в примере 5. В каждой из указанных временных точек общее количество ретикулоцитов (фиг. 13A), эритроцитов (фиг. 13B), гемоглобина (фиг. 13D) и процент незрелых ретикулоцитов в общем пуле ретикулоцитов (фиг. 13C) измеряют с использованием стандартных методик.

Фиг. 14 изображает схему дозирования и отбора образцов для исследования на приматах, описанного в примере 6.

Фиг. 15A-15B изображают фармакодинамические результаты (A) и концентрации антитела в головном мозге (B) для экспериментов, описанных в примере 6. Конкретно, фиг. 15A показывает индивидуальные и средние по группам отношения анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1, анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1, анти-gD и анти-BACE1 для sAPP $\beta$ /sAPP $\alpha$  в CSF, как функцию времени после однократного внутривенного введения болюса при 30 мг/кг обезьянам циномогус. Фиг. 15B показывает индивидуальные концентрации антитела анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1, анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1, анти-gD и анти-BACE1 в различных областях головного мозга через 24 ч после дозирования.

Фиг. 16A-B изображают последовательности аминокислот легких и тяжелых цепей клона YW412.8 анти-BACE1, полученного из наивной библиотеки фаговых дисплеев природного разнообразия, и форм YW412.8 с созревшим сродством. Фиг. 16A изображает выравнивания вариабельных легких (VL) последовательностей (SEQ ID NO. 132-137). Фиг. 16B изображает выравнивания вариабельных тяжелых (VH) последовательностей (SEQ ID NO. 138-139). На обеих фигурах последовательности HVR для каждого клона показаны с помощью областей, обведенных прямоугольником, при этом первый прямоугольник показывает HVR-L1 (фиг. 16A) или HVR-H1 (фиг. 16B), второй прямоугольник показывает HVR-L2 (фиг. 16A) или HVR-H2 (фиг. 16B) и третий прямоугольник показывает HVR-L3 (фиг. 16A) или HVR-H3 (фиг. 16B).

Фиг. 17A-B изображают последовательности аминокислот легких и тяжелых цепей клона Fab 12 антитела анти-BACE1, полученных из наивной библиотеки фаговых дисплеев синтетического разнообразия, и формы Fab 12 с созревшим сродством. Фиг. 17A изображает выравнивания последовательности легкой цепи (SEQ ID NO. 140-143). Фиг. 17B изображает выравнивания последовательности тяжелой

цепи (SEQ ID NO. 144). На обеих фигурах последовательности HVR для каждого клона показаны с помощью областей, обведенных прямоугольником, при этом первый прямоугольник показывает HVR-L1 (фиг. 17A) или HVR-H1 (фиг. 17B), второй прямоугольник показывает HVR-L2 (фиг. 17A) или HVR-H2 (фиг. 17B) и третий прямоугольник показывает HVR-L3 (фиг. 17A) или HVR-H3 (фиг. 17B).

Фиг. 18А-В изображают тяжелую цепь (фиг. 18А; SEQ ID NO. 145) и легкую цепь (фиг. 18В; SEQ ID NO. 146) иллюстративного антитела анти-Аβ.

Фиг. 19 изображает фармакокинетические свойства анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1, анти-TfR<sup>52A</sup>/BACE1 и анти-TfR<sup>53A</sup>/BACE1, как описано в примере 5.

Фиг. 20 изображает фармакокинетические свойства антител анти-TfR<sup>D</sup>/BACE1 и анти-gD IgG2a мышинных с мутациями эффекторной функции Fc LALAPG, как описано в примере 7.

Фиг. 21 изображает общее количество и количество незрелых ретикулоцитов у мышей через 24 ч после введения дозы 50 мг/кг антител анти-TfR<sup>D</sup>/BACE1 и анти-gD IgG2a мышинных с мутациями эффекторной функции Fc LALAPG, как описано в примере 7.

Фиг. 22 изображает общее количество ретикулоцитов у мышей через 24 ч после введения дозы 50 мг/кг антител анти-TfR<sup>52A</sup>/BACE1 (N297G), анти-TfR<sup>52A</sup>/BACE1 (LALAPG), анти-TfR<sup>52A</sup>/BACE1 (LALAPG/YTE), TfR<sup>52A</sup>/BACE1 (LALAPG/AI) мышам, нокаутированным рецепторами трансферрина человека, как описано в примере 8.

Фиг. 23 изображает результаты экспериментов, оценивающих влияние статуса эффекторной функции на активность ADCC антител анти-TfR/gD, анти-TfR/BACE1 (N297G), анти-TfR/BACE1 (LALAPG), анти-TfR/BACE1 (N297G/434A/436I) и анти-TfR/BACE1 (LALAPG/YTE) в первичных мононуклеарных клетках костного мозга человека или в линии клеток эритробластов человека, как описано в примере 8.

Фиг. 24 изображает последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи 1511GV.5 (легкая цепь - SEQ ID NO: 105 и тяжелая цепь - SEQ ID NO: 108) и вариантов сродства 15G11.52A (легкая цепь - SEQ ID NO: 105 и тяжелая цепь - SEQ ID NO: 153), 15G11.53A (легкая цепь - SEQ ID NO: 105 и тяжелая цепь - SEQ ID NO: 154) и 15G11.92A (легкая цепь - SEQ ID NO: 151 и тяжелая цепь - SEQ ID NO: 108). HVR согласно Kabat показаны посредством подчеркивания.

Фиг. 25 изображает конкурентный анализ сравнения между 15G11v.5 и анти-TfR<sup>C12</sup>, как описано в примере 1.

### Подробное описание вариантов осуществления настоящего изобретения

#### 1. Определения.

"Сродство" относится к силе суммы общих нековалентных взаимодействий между отдельным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иного, как используется в настоящем документе, "сродство связывания" относится к собственному сродству связывания, которое отражает взаимодействие 1:1 между элементами пары связывания (например, антителом и антигеном). Сродство молекулы X к ее партнеру Y может, в целом, быть представлено с помощью константы диссоциации (KD, которая представляет собой отношение скорости отсоединения X от Y (kd или Koff) к скорости ассоциации X и Y (ka или kon)). Суррогатное измерение для сродства одного или нескольких антител к их мишени представляет собой их половинную максимальную ингибиторную концентрацию (IC<sub>50</sub>), меру того, сколько антитела требуется для ингибирования связывания известного лиганда с целевым антителом на 50%. Сродство может измеряться с помощью обычных способов, известных в данной области, включая те, которые описаны в настоящем документе. Конкретные иллюстративные и примерные варианты осуществления для измерения сродства связывания описаны в настоящем документе.

"Гематоэнцефалический барьер" или "BBB" относится к физиологическому барьеру между периферическим кровообращением и головным мозгом и спинным мозгом (т.е. CNS), который формируется с помощью плотных переходов с помощью плазматических мембран эндотелия капилляров головного мозга, создающих плотный барьер, который ограничивает перенос молекул в головной мозг, даже очень малых молекул, таких как мочевины (60 Да). Гематоэнцефалический барьер в головном мозге, гематоспинальный барьер в спинном мозге и гематоретинальный в сетчатке глаза представляют собой сплошные капиллярные барьеры в CNS, и они коллективно упоминаются в настоящем документе как гематоэнцефалический барьер или BBB. BBB также охватывает гемато-CSF барьер (хороидное сплетение), где барьер состоит из эпендимных клеток вместо капиллярных эндотелиальных клеток.

Термины "амилоид β", "β-амилоид", "Аβ", "амилоидβ" и "Аβ", используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к фрагменту белка предшественника амилоида ("APP"), который продуцируется при расщеплении APP посредством β-секретазы 1 ("BACE1"), а также к его модификациям, фрагментам и любым функциональным эквивалентам, включая, но не ограничиваясь этим, Аβ<sub>1-40</sub> и Аβ<sub>1-42</sub>. Аβ, как известно, существует в мономерной форме, а также ассоциируется с образованием олигомеров и фибриллярных структур, которые могут обнаруживаться в качестве составляющих элементов амилоидных бляшек. Структура и последовательности таких пептидов Аβ хорошо известны специалистам в данной области, и способы продуцирования указанных пептидов или извлечения их из головного мозга и других тканей описаны, например, в Glenner and Wong, *Biochem Biophys Res. Comm.* 129:885-890

(1984).

Кроме того, пептиды Аβ являются также коммерчески доступными в разнообразных формах.

"Иммуноглобулин анти-Аβ", "антитело анти-Аβ" и "антитело, которое связывает Аβ" используются в настоящем документе взаимозаменяемо, и относятся к антителу, которое специфично связывается с Аβ человека. Неограничивающий пример антитела анти-Аβ представляет собой кренезумаб. Другие неограничивающие примеры антител анти-Аβ представляют собой соланезумаб, бапинезумаб, гантенезумаб, адуканумаб, понезумаб и любые другие антитела анти-Аβ, описанные в следующих публикациях: WO 2000162801, WO 2002046237, WO 2002003911, WO 2003016466, WO 2003016467, WO 2003077858, WO 2004029629, WO 2004032868, WO 2004032868, WO 2004108895, WO 2005028511, WO 2006039470, WO 2006036291, WO 2006066089, WO 2006066171, WO 2006066049, WO 2006095041, WO 2009027105.

Термины "кренезумаб" и "MABT5102A" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к конкретному антителу анти-Аβ, которое связывается с мономерными, олигомерными и фибриллярными формами Аβ, и которые связаны с CAS registry number 1095207. В одном из вариантов осуществления, такое антитело содержит последовательности, приведенные на фиг. 18А и 18В.

"Носитель аполипопротеина Е4" или "носитель ApoE4" используются в настоящем документе взаимозаменяемо с "положительным по аполипопротеину Е4" или "положительным по ApoE4" и относятся к индивидууму, имеющему по меньшей мере одну аллель аполипопротеина Е4 (или "ApoE4"). Индивидуум с нулем аллелей ApoE4 упоминается в настоящем документе как являющийся "отрицательным по ApoE4" или "не носитель ApoE4". См. также Prekumar, et al., 1996, Am. J. Pathol. 148:2083-95.

Термин "церебральный вазогенный отек" относится к избыточной аккумуляции внутрисосудистой жидкости или белка во внутриклеточных или внеклеточных пространствах головного мозга. Церебральный вазогенный отек детектируется, например, с помощью MRI (магнитной резонансной томографии) головного мозга, включая, но не ограничиваясь этим FLAIR MRI, и может быть бессимптомным ("бессимптомный вазогенный отек") или связанным с неврологическими симптомами, такими как спутанность сознания, головокружение, тошнота и летаргия ("симптоматичный вазогенный отек") (см. Sperling et al. *Alzheimer's & Dementia*, 7:367, 2011).

Термин "церебральное макрокровоизлияние" относится к внутричерепному кровоизлиянию или кровотечению в головном мозге, площадь которого составляет больше примерно 1 см в диаметре. Церебральное макрокровоизлияние детектируется, например, с помощью MRI головного мозга, включая, но не ограничиваясь этим T2\*-взвешенную GRE MRI, и может быть бессимптомным ("бессимптомное макрокровоизлияние") или связанными с симптомами, такими как временное или постоянное очаговое ослабление моторики или сенсорики, атаксия, афазия и дизартрия ("симптоматичное макрокровоизлияние") (см., например, Chalela J.A., Gomes J. *Expert Rev. Neurother.* 2004 4:267, 2004 and Sperling et al. *Alzheimer's & Dementia*, 7:367, 2011).

Термин "церебральное микрокровоизлияние" относится к внутричерепному кровоизлиянию или кровотечению в головном мозге, площадь которого составляет меньше примерно чем 1 см в диаметре. Церебральное микрокровоизлияние детектируется, например, с помощью MRI головного мозга, включая, но не ограничиваясь этим, T2\*-взвешенную GRE MRI, и может быть бессимптомным ("бессимптомное микрокровоизлияние") или может потенциально быть связанным с такими симптомами, как временное или постоянное очаговое ослабление моторики или сенсорики, атаксия, афазия и дизартрия ("симптоматичное микрокровоизлияние"). См., например, Greenberg, et al., 2009, *Lancet Neurol.* 8:165-74.

Термин "сулькальный выпот" относится к выпоту жидкости в бороздке или в извилине головного мозга. Сулькальные выпоты детектируются, например, с помощью MRI головного мозга, включая, но не ограничиваясь этим FLAIR MRI. См. Sperling et al. *Alzheimer's & Dementia*, 7:367, 2011.

Термин "поверхностный сидероз центральной нервной системы" относится к кровоизлиянию в субарахноидальной области головного мозга и детектируется, например, с помощью MRI головного мозга, включая, но не ограничиваясь этим T2\*-взвешенную GRE MRI. Симптомы, указывающие на поверхностный сидероз центральной нервной системы, включают перцептивную глухоту, мозжечковую атаксию и пирамидальные признаки. См. Kumara-N, Am. J. *Neuroradiol.* 31:5, 2010.

Термин "амилоидоз", как используется в настоящем документе, относится к группе заболеваний и расстройств, вызываемых амилоидом или амилоидоподобными белками или ассоциированными с ними, и включает, но не ограничиваясь этим, заболевания и расстройства, вызываемые присутствием или активностью амилоидоподобных белков в мономерном, фибриллярном или полимерном состоянии, или в любом сочетании из этих трех состояний, включая амилоидные бляшки. Такие заболевания включают, но не ограничиваясь этим, вторичный амилоидоз и возрастной амилоидоз, например заболевания, включая, но не ограничиваясь этим, неврологические расстройства, такие как болезнь Альцгеймера ("AD"), заболевания или состояния, характеризующиеся потерей когнитивной способности памяти, такие, например, как умеренные когнитивные нарушения (MCI), деменция с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное кровоизлияние в мозг с амилоидозом (Голландского типа), Гуамский комплекс болезнь Паркинсона - деменция и другие заболевания, которые основаны на амилоидоподобных белках или ассоциируются с ними, такие как прогрессирующий супрануклеарный паралич, множественный склероз, болезнь Крейтц-

фельда-Якоба, болезнь Паркинсона, деменция, связанная с ВИЧ, ALS (боковой амиотрофический склероз), миозит с включенными тельцами (IBM), диабет взрослых, эндокринная опухоль и сенильный сердечный амилоидоз, и разнообразные заболевания глаз, включая дистрофию желтого пятна, связанную с друзами невропатию зрительного нерва, глаукому и катаракту, связанные с отложениями  $\beta$ -амилоидов.

Глаукома представляет собой группу заболеваний зрительного нерва, включающих потерю ганглионных клеток сетчатки (RGC) в виде характерной структуры оптической нейропатии. RGC представляют собой нервные клетки, которые передают зрительные сигналы от глаза в головной мозг. Каспаза-3 и Каспаза-8, два главных фермента в апоптотическом процессе, активируются в процессе, приводящем к апоптозу RGC. Каспаза-3 расщепляет белок предшественник амилоида (APP) с продуцированием нейротоксичных фрагментов, включая A $\beta$ . Без защитного воздействия APP аккумуляция A $\beta$  в слое ганглионных клеток сетчатки приводит в результате к гибели RGC и необратимой потере зрения.

Глаукома часто, но не всегда, сопровождается повышением глазного давления, которая может быть результатом блокировки циркуляции водной среды или ее дренирования. Хотя повышенное внутриглазное давление является важным фактором риска для развития глаукомы, нельзя определить порог внутриглазного давления, который, определенно, вызывал бы глаукому. Повреждение может также вызываться плохим кровоснабжением витальных волокон зрительного нерва, слабостью структуры нерва и/или проблемой со здоровьем самих нервных волокон. Нелеченая глаукома приводит к постоянному повреждению зрительного нерва и возникающей в результате потере поля зрения, которая может постепенно привести к слепоте.

Термин "легкая болезнь Альцгеймера" или "легкая AD", как используется в настоящем документе (например, "пациент с диагнозом легкая AD"), относится к стадии AD, отличающейся оценкой MMSE от 20 до 26.

Термин "легкая - умеренная болезнь Альцгеймера" или "легкая - умеренная AD", как используется в настоящем документе, охватывает как легкую, так и умеренную AD, и отличается оценкой MMSE от 18 до 26.

Термин "умеренная болезнь Альцгеймера" или "умеренная AD", как используется в настоящем документе (например, "пациент с диагнозом умеренная AD"), относится к стадии AD, отличающейся оценкой MMSE от 18 до 19.

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

"Рецептор гематоэнцефалического барьера" (в настоящем документе сокращенно "BBB-R") представляет собой трансмембранный рецепторный белок, экспрессируемый в эндотелиальных клетках головного мозга, который может переносить молекулы через гематоэнцефалический барьер. Примеры BBB-R включают, но не ограничиваясь этим, рецептор трансферрина (TfR), рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-R), рецепторы липопротеинов низкой плотности, включающие, без ограничения, белок 1, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности (LR1), и белок 8, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности (LRP8), переносчик глюкозы 1 (Glut1) и связывающий гепарин фактор роста подобный эпидермальному фактору роста (HB-EGF). Иллюстративный BBB-R в настоящем документе представляет собой рецептор трансферрина (TfR).

Термин "рецептор трансферрина" или "TfR", как используется в настоящем документе, относится к любому нативному TfR из любого источника - позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызунов (например, мышей и крыс), если не указано иное. Термин охватывает "полноразмерный" непротесированный TfR, а также любую форму TfR, которая получается в результате процессинга в клетке. Термин также охватывает встречающиеся в природе варианты TfR, например сплайсированные варианты или аллельные варианты. TfR представляет собой трансмембранный гликопротеин (с молекулярной массой примерно 180000), состоящей из двух дисульфидно связанных субъединиц (каждая с видимой молекулярной массой примерно 90000), вовлеченный в потребление железа у позвоночных животных. В одном из вариантов осуществления TfR в настоящем документе представляет собой TfR человека ("hTfR"), содержащий последовательность аминокислот, как приведено в Schneider et al. Nature 311:675-678 (1984), например, (SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления TfR в настоящем документе представляет собой TfR приматов ("pTfR"), содержащий последовательность аминокислот, как приведено в ссылке Genbank AFD 18260.1 (SEQ ID NO: 2). Для сравнения, последовательность TfR мыши можно найти в ссылке Genbank AAN54522.1 (SEQ ID NO: 3). "Неврологическое расстройство", как используется в настоящем документе, относится к заболеванию или расстройству, которое воздействует на CNS и/или которое имеет этиологию в CNS. Иллюстративные заболевания или расстройства CNS включают, но не ограничиваясь этим, невропатию, амилоидоз, рак, глазное заболевание или расстройство, вирусные или микробные инфекции, воспаление, ишемию, нейродегенеративное заболевание, эпилепсию, расстройства поведения и лизосомную болезнь накопления. Для целей настоящей заявки CNS будет, как понимается, включать глаз, который, обычно отделяется от остальной части организма, гематоретинальным барьером. Конкретные примеры неврологических расстройств включают, но не ограничиваясь этим, нейродегенеративные заболевания (включая, но не ограничиваясь

этим, заболевание с тельцами Леви, постполиомиелитный синдром, синдром Ши-Дрегера, оливомосто-мозжечковую атрофию, болезнь Паркинсона, множественную системную атрофию, стриатонигральную дегенерацию, тауопатии (включая, но не ограничиваясь этим, болезнь Альцгеймера и супрануклеарный паралич), прионные заболевания (включая, но не ограничиваясь этим, губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота, скрепи, синдром Крейтцфельда-Якоба, куру, болезнь Гершмана-Штрауслера-Шайнкера, хроническую вастинг-болезнь и фатальную наследственную инсомнию), бульбарный паралич, боковой амиотрофический склероз и гетеродегенеративные расстройства нервной системы (включая, но не ограничиваясь этим, болезнь Канавана, болезнь Хантингтона, нейрональный цероид-липофусциноз, болезнь Александра, синдром Туретта, синдром курчавых волос Менкеса, синдром Кокэйна, синдром Халервордена-Шпатца, болезнь Лафора, синдром Ретта, гепатолентикулярную дегенерацию, синдром Леша-Нихана и синдром Унферрихта-Лундборга), деменцию (включая, но не ограничиваясь этим, болезнь Пика и спинально-церебеллярную атаксию), рак (например, CNS, включая метастазы в головной мозг, возникающие в результате рака где-либо в организме).

"Лекарственное средство против неврологического расстройства" представляет собой лекарственное средство или терапевтический агент, который лечит одно или несколько неврологических расстройств. Лекарственные средства против неврологических расстройств по настоящему изобретению включают, но не ограничиваясь этим, антитела, пептиды, белки, естественные лиганды одной или нескольких мишеней в CNS, модифицированные версии естественных лигандов одной или нескольких мишеней в CNS, аптамеры, ингибиторные нуклеиновые кислоты (т.е. малые ингибиторные РНК (siRNA) и короткие шпилечные РНК (shRNA)), рибозимы и малые молекулы или активные фрагменты любого из упомянутых выше соединений. Иллюстративные лекарственные средства против неврологических расстройств по настоящему изобретению описываются в настоящем документе и включают, но не ограничиваясь этим, антитела, аптамеры, белки, пептиды, ингибиторные нуклеиновые кислоты и малые молекулы, и активные фрагменты любых из упомянутых выше соединений, которые либо сами собой представляют, либо специфично распознают и/или воздействуют (т.е. ингибируют, активируют или детектируют ее) на антиген в CNS или целевую молекулу, такую как, но не ограничиваясь этим, белок предшественник амилоида или его части, амилоид  $\beta$ ,  $\beta$ -секретаза,  $\gamma$ -секретаза, тау,  $\alpha$ -синуклеин, паркин, хантингтин, DR6, презенилин, АроЕ, глиома или другие маркеры рака CNS и нейротрофины. Неограничивающие примеры лекарственных средств против неврологических расстройств и расстройств, при которых их можно использовать для лечения, приводятся в следующей далее табл. 1.

Таблица 1

Неограничивающие примеры лекарственных средств против неврологических расстройств и соответствующие расстройства, для лечения которых их можно использовать

Лекарственное средство	Неврологическое расстройство
Антитело анти-BACE1	Болезнь Альцгеймера, острое и хроническое повреждение мозга, инсульт
Антитело анти-Abeta	болезнь Альцгеймера
Антитело анти-Tau	болезнь Альцгеймера, тауопатии
Нейтрофин	Инсульт, острое повреждение головного мозга, повреждение спинного мозга
Нейротрофический фактор, полученный из головного мозга (BDNF), фактор роста фибробластов 2 (FGF-2)	Хроническое повреждение головного мозга (нейрогенез)
Антитело анти-рецептор эпидерсального фактора роста (EGFR)	Рак мозга
Невральный фактор, полученный из линии глиальных клеток (GDNF)	Болезнь Паркинсона

Нейротрофический фактор, полученный из головного мозга (BDNF)	Боковой амиотрофический склероз, депрессия
Лизосомальный фермент	Расстройства лизосомального накопления головного мозга
Силиарный нейротрофический фактор (CNTF)	Боковой амиотрофический склероз
Нейрегулин-1	Шизофрения
Антитело анти-HER2 (например, транстузумаб, пертузумаб, и тому подобное)	Метастазы в головной мозг от HER2-положительного рака
Антитело анти-VEGF (например, бевацизумаб)	Возобновляющаяся или вновь диагностируемая глиобластома, возобновляющаяся злокачественная глиома, метастазы в головной мозг

"Агент для получения изображений" представляет собой соединение, которое имеет одно или несколько свойств, которое позволяет детектировать прямо или косвенно его присутствие и/или положение. Примеры таких агентов для получения изображений включают белки и низкомолекулярные соединения, содержащие меченый остаток, который делает возможным детектирование.

"Антиген CNS" или "антиген головного мозга" представляет собой антиген, экспрессируемый в CNS, включая головной мозг, на которое может нацеливаться антитело или малая молекула. Примеры таких антигенов включают, без ограничения,  $\beta$ -секретазу 1 (BACE1), амилоид  $\beta$  (A $\beta$ ), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), тау, аполиппротеин E4 (ApoE4),  $\alpha$ -синуклеин, CD20, хантингтин, прионный белок (PrP), обогащенную лейциновыми повторами киназу 2 (LRRK2), паркин, презенилин 1, презенилин 2,  $\gamma$ -секретазу, рецептор гибели 6 (DR6), белок предшественник амилоида (APP), рецептор нейротрофина p75 (p75NTR), рецептор интерлейкина 6 (IL6R), рецептор TNF 1 (TNFR1), интерлейкин 1  $\beta$  (IL1 $\beta$ ) и каспазу 6. В одном из вариантов осуществления антиген представляет собой BACE1.

Термин "BACE1", как используется в настоящем документе, относится к любой нативной  $\beta$ -секретазе 1 (также называемой фермент 1, расщепляющий  $\beta$ -сайт белка предшественника амилоида, ассоциированная с мембраной аспарагилпротеаза 2, мемпапин 2, аспартилпротеаза 2 или Asp2) от любого источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иного. Термин охватывает "полноразмерную" непротессированную BACE1, а также любую форму BACE1, которая получается в результате процессинга в клетке. Термин также охватывает встречающиеся в природе варианты BACE1, например сплайсированные варианты или аллельные варианты.

Последовательность аминокислот иллюстративного полипептида BACE1 представляет собой последовательность для BACE1 человека, изоформа A, как сообщается в Vassar et al., Science 286:735-741 (1999), которая включается в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте. Существуют несколько других изоформ BACE1 человека, включая изоформы B, C и D. См. UniProtKB/Swiss-Prot Entry P56817, которая включается в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

Термины "антитело анти- $\beta$ -секретазы", "антитело анти-BACE1", "антитело, которое связывается с  $\beta$ -секретазой" и "антитело, которое связывается с BACE1" относятся к антителу, которое может связывать BACE1 с достаточным сродством, так что антитело является полезным в качестве диагностического и/или терапевтического агента при нацеливании на BACE1. В одном из вариантов осуществления степень связывания антитела анти-BACE1 с неродственным белком, отличным от BACE1, меньше примерно чем 10% от связывания антитела с BACE1, как измерено, например, с помощью радиоиммунного анализа (RIA). В определенных вариантах осуществления антитело, которое связывается с BACE1, имеет константу диссоциации (Kd)  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ,  $\leq 0,01$  нМ или  $\leq 0,001$  нМ (например,  $10^{-8}$ М или меньше, например от  $10^{-8}$ М до  $10^{-13}$ М, например от  $10^{-9}$ М до  $10^{-13}$ М). В определенных вариантах осуществления антитело анти-BACE1 связывается с эпитопом BACE1, который является консервативным среди BACE1 от различных видов и изоформ. В одном из вариантов осуществления предлагается антитело, которое связывается с эпитопом на BACE1, связанным с антителом анти-BACE 1 YW412.8.31. В других вариантах осуществления предлагается антитело, которое связывается с экзосайтом в BACE1, расположенным в каталитическом домене BACE1. В одном из вариантов осуществления предлагается антитело, которое конкурирует с пептидами, идентифицируемыми в Kornacker et al., Bio-

chem. 44:11567-11573 (2005), которая включается в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте (например, пептиды 1, 2, 3, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 2-12, 3-12, 4-12, 5-12, 6-12, 7-12, 8-12, 9-12, 10-12, 4, 5, 6, 5-10, 5-9, рандомизированные, Y5A, P6A, Y7A, F8A, I9A, P10A и L11A), за связывание с BACE1. Иллюстративные последовательности антитела BACE1 изображены на фиг. 15А-В и 16А-В. Одно из иллюстративных антител в настоящем документе содержит переменные домены антитела YW412.8.31 (например, как на фиг. 15А-В).

Белок с "нативной последовательностью" в настоящем документе относится к белку, содержащему последовательность аминокислот белков, встречающихся в природе, включая встречающиеся в природе варианты белка. Термин, как используется в настоящем документе, включает белок, как изолированный из его естественного источника или как полученный рекомбинантно.

Термин "антитело" в настоящем документе используется в самом широком смысле и охватывает разнообразные структуры антител, включая, но не ограничиваясь этим, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител постольку, поскольку они демонстрируют желаемую активность связывания антигенов.

"Фрагмент антитела" относится к молекуле иной, чем интактное антитело, которое содержит часть интактного антитела, которое связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител хорошо известны в данной области (см., например, Nelson, MAbs (2010) 2(1):77-83) и включают, но не ограничиваясь этим, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub> и Fv; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител, включая, но не ограничиваясь этим, одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), продукты слияния связывающих антиген доменов легкой и/или тяжелой цепи, с линкером или без него (и необязательно, в тандеме); и моноспецифичные или мультиспецифичные молекулы, связывающие антиген, сформированные из фрагментов антител (включая, но не ограничиваясь этим, мультиспецифичные антитела, сконструированные из множества переменных доменов, в которых отсутствуют Fc области).

Термин "моноклональное антитело", как используется в настоящем документе, относится к антителу, полученному из популяции, по существу, гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов, например содержащих встречающиеся в природе мутации, или они могут возникнуть во время продуцирования моноклонального антитела, такие варианты, как правило, присутствуют в малых количествах. В противоположность препаратам поликлональных антител, которые, как правило, содержат антитела, направленные против различных детерминантов (эпитопов), каждое моноклональное антитело препарата моноклонального антитела направлено против одного детерминанта на антигене. Прилагательное "моноклональное" указывает на характер антитела как получаемого, по существу, из гомогенной популяции антител, и оно не должно рассматриваться как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, которые должны использоваться в соответствии с настоящим изобретением, могут быть приготовлены с помощью разнообразных методов, включая, но не ограничиваясь этим, метод гибридомы (см., например, Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)), методы с использованием рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567), методы фагового дисплея (например, с использованием методик, описанных в Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991), и Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)), и способы, использующие трансгенных животных, содержащих все локусы иммуноглобулина человека или часть их, такие способы и другие иллюстративные способы получения моноклональных антител описываются в настоящем документе. Конкретные примеры моноклональных антител в настоящем документе включают химерные антитела, гуманизированные антитела и антитела человека, включая их фрагменты, связывающие антиген.

Моноклональные антитела в настоящем документе конкретно включают "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретных видов или принадлежащих конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(цепей) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных от других видов или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, постольку, поскольку они демонстрируют желаемую биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

"Акцепторный каркас человека" для целей настоящего документа представляет собой каркас, содержащий последовательность аминокислот каркаса переменного домена легкой цепи (VL) или каркаса переменного домена тяжелой цепи (VH), полученный из каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека, как определено ниже. Акцепторный каркас человека, "полученный из" каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека, может содержать его последовательность аминокислот, или он может содержать изменения в последовательности аминокислот. В некоторых вариантах осуществления количество изменений аминокислот составляет 10 или меньше, 9 или меньше, 8 или меньше, 7 или меньше, 6 или меньше, 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше или 2 или меньше. В некоторых вариантах осуществления акцепторный каркас VL человека идентичен по последовательности последовательности каркаса VL иммуноглобулина человека или последовательности

консенсусного каркаса человека.

"Консенсусный каркас человека" представляет собой каркас, который представляет собой наиболее часто встречающиеся остатки аминокислот при выборе последовательностей каркаса VL или VH иммуноглобулина человека. Как правило, выбор последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека осуществляют из подгруппы последовательностей переменных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу как в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.* В одном из вариантов осуществления для VL подгруппа представляет собой подгруппу каппа I, как в Kabat et al., выше. В одном из вариантов осуществления для VH подгруппа представляет собой подгруппу III, как в Kabat et al., выше.

"Гуманизированные" формы антител (например, мышинных), не принадлежащих человеку, представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную от антител, не принадлежащих человеку. По большей части гуманизированные антитела представляют собой антитела человека (антитела реципиента), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменяются остатками из гипервариабельной области видов, отличных от человека (донорское антитело), таких как мышь, крыса, кролик или примат, отличный от человека, имеющих желаемую специфичность, сродство и емкость. Например, в определенных вариантах осуществления гуманизированное антитело будет содержать, по существу, все по меньшей мере из одного, а, как правило, из двух переменных доменов, в которых все или, по существу, все HVR (например, CDR) соответствуют остаткам антитела, не принадлежащего человеку, и все или, по существу, все области каркаса (FR) соответствуют областям антитела человека. В некоторых случаях остатки FR иммуноглобулина человека заменяются соответствующими остатками, не принадлежащими человеку. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не содержатся в антителе реципиента или в донорском антителе. Эти модификации осуществляют для дополнительного определения характеристик антитела. В определенных вариантах осуществления гуманизированное антитело будет содержать, по существу, все по меньшей мере из одного, а, как правило, двух переменных доменов, в которых все или, по существу, все гипервариабельные области соответствуют областям антитела, не принадлежащего человеку, и все или, по существу, все FR представляют собой области антитела человека, за исключением замещения (замещений) FR, как отмечено выше. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть постоянной области антитела, как правило, антитела человека. "Гуманизированная форма" антитела, например антитела, не принадлежащего человеку, относится к антителу, которое подвергается гуманизации. Относительно дополнительных деталей см. Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol* 2:593-596 (1992).

"Антитело человека" в настоящем документе представляет собой антитело, содержащее структуру последовательностей аминокислот, которая соответствует структуре последовательности аминокислот антитела, продуцируемого человеком или клеткой человека, или полученного из источника, отличного от человека, которая использует репертуары антител человека или другие последовательности, кодирующие антитело человека. Это определение антитела человека конкретно исключает гуманизированное антитело, содержащее связывающие антиген остатки, не принадлежащие человеку. Такие антитела могут идентифицироваться или приготавливаться с помощью разнообразных методик, включая, но не ограничиваясь этим, продуцирование с помощью трансгенных животных (например, мышей), которые способны при иммунизации продуцировать антитела человека в отсутствие эндогенного продуцирования иммуноглобулина (см., например, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year в Immune*, 7:33 (1993); и патенты США №№ 5591669, 5589369 и 5545807)); выбор из библиотек фаговых дисплеев, экспрессирующих антитела человека или фрагменты антител человека (см., например, McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990); Johnson et al., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993); Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991); Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993); патенты США №№ 5565332 и 5573905); генерирование посредством активируемых *in vitro* В-лимфоцитов (см. патенты США №№ 5567610 и 5229275) и изоляцию из гибридом, продуцирующих антитела человека.

"Мультиспецифичное антитело" в настоящем документе представляет собой антитело, имеющее специфичность связывания по меньшей мере с двумя различными эпитопами. Иллюстративные мультиспецифичные антитела могут связываться как с T<sub>H</sub>R, так и с антигеном головного мозга. Мультиспецифичные антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифичных антител F(ab')<sub>2</sub>). Полученные с помощью генной инженерии антитела с двумя, тремя или более (например, четырьмя) функциональными сайтами связывания антигена также рассматриваются (см., например, заявку на патент США № 2002/0004587 A1, Miller et al.). Мультиспецифичные антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или в виде фрагментов антител.

Антитела в настоящем документе включают "варианты последовательностей аминокислот" с измененной активностью связывания антигена или биологической активностью. Примеры таких изменений аминокислот включают антитела с повышенным сродством к антигену (например, антитела с "созревшим сродством") и антитела с измененной Fc областью, если она присутствует, например, с измененной

(повышенной или пониженной) антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) и/или компонент-зависимой цитотоксичностью (CDC) (см., например, WO 00/42072, Presta, L. и WO 99/51642, Iduosogie et al.); и/или с повышенным или пониженным временем полужизни в сыворотке (см., например, WO 00/42072, Presta, L.).

"Вариант с модифицированным средством" имеет один или несколько замещенных остатков гипервариабельной области или каркаса исходного антитела (например, исходного химерного, гуманизированного или антитела человека), которые изменяют (повышают или понижают) средство. Обычный путь генерирования таких замещенных вариантов использует фаговый дисплей. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельной области (например, 6-7 сайтов) мутируют с генерированием всех возможных замещений аминокислот на каждом сайте. Варианты антител, генерируемые таким образом, получают с помощью фагового дисплея одновалентным образом из нитевидных частиц фагов в виде слияний с продуктом гена III M13, упакованного внутри каждой частицы. Затем осуществляют скрининг вариантов, полученных с помощью фагового дисплея, на их биологическую активность (например, средство связывания). Для идентификации возможных сайтов гипервариабельной области для модификации можно осуществить аланин-сканирующий мутагенез для идентификации остатков гипервариабельных областей, вносящих значительный вклад в связывание антигена. Альтернативно или в дополнение к этому, может быть выгодным анализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и его мишенью. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами на замещение в соответствии с технологиями, разработанными в настоящем документе. После генерирования таких вариантов панели вариантов подвергают воздействию скрининга, и антитела с измененным средством могут выбираться для дальнейшей разработки.

"pH-чувствительный вариант антитела" представляет собой вариант антитела, который имеет средство связывания с целевым антигеном при первом pH иное, чем при связывании с этим целевым антигеном при другом pH. В качестве неограничивающего примера антитело анти-TfR по настоящему изобретению может быть выбрано или получено с помощью генной инженерии, чтобы оно имело pH-чувствительное связывание с TfR, с тем, чтобы оно связывалось с желательным низким средством (как описано в настоящем документе) с TfR поверхности клетки в плазме при pH 7,4, но при интернализации в эндосомальном компартменте, быстро диссоциировало бы от TfR при относительно низких pH (pH 5,5-6,0); такая диссоциация может защитить антитело от опосредуемого антигеном выведения и увеличить количество антитела, которое либо доставляется в CNS, либо рециклируется обратно через BBB - в любом случае, эффективная концентрация антитела увеличивается по сравнению с антителом анти-TfR, которое не содержит такой чувствительности к pH (см., например, Charatto-Riggers et al. *J. Biol. Chem.* 287(14):11090-11097; Igawa et al., *Nature Biotechnol.* 28(11):1203-1208). Желательное сочетание средства при pH сыворотки и при pH эндосомального компартмента может легко быть определено для TfR и конъюгированного соединения специалистом в данной области.

Антитело в настоящем документе может конъюгироваться с "гетерологичной молекулой", например, для увеличения времени полужизни или стабильности или для иного усовершенствования антитела. Например, антитело может связываться с одним или несколькими небелковыми полимерами, например, полиэтиленгликолем (PEG), пропиленгликолем, полиоксиполиэтиленами или сополимерами полиэтиленгликоля и пропиленгликоля. Фрагменты антитела, такие как Fab', связанные с одной или несколькими молекулами PEG, представляют собой иллюстративный вариант осуществления настоящего изобретения. В другом примере, гетерологичная молекула представляет собой терапевтическое соединение или агент для визуализации (т.е. детектируемую метку), и антитело используется для переноса такой гетерологичной молекулы через BBB. Примеры гетерологичных молекул включают, но не ограничиваясь этим, химическое соединение, пептид, полимер, липид, нуклеиновую кислоту и белок.

Антитело в настоящем документе может представлять собой "вариант с гликозилированием", такой, что любой углевод, присоединенный к Fc области, если он присутствует, изменяется, либо модифицируется относительно присутствия/отсутствия, либо модифицируется относительно типа. Например, антитела с созревшей структурой углеводов, в которой отсутствует фукоза, присоединенная к Fc области антитела, описаны в заявке на патент США № 2003/0157108 (Presta, L.). См. также US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Антитела с бисекцией N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) в углеводе, присоединенном к Fc области антитела, упоминаются в WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. и в патенте США № 6602684, Umana et al. Антитела по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc области антитела, обсуждаются в WO 1997/30087, Patel et al. См., также, WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.) относительно антител с измененным углеводом, присоединенным к их Fc области. См. также US 2005/0123546 (Umana et al.), описывающий антитела с модифицированным гликозилированием. Мутация консенсусной последовательности гликозилирования в Fc области (Asn-X-Ser/Thr в положениях 297-299, где X не может представлять собой пролина), например, посредством мутации Asn этой последовательности, с заменой на любую другую аминокислоту, посредством помещения Pro в положение 298 или модификации положения 299 с заменой на любую аминокислоту иную, чем Ser или Thr, должно подавлять гликозилирование в этом положении (см., например, Fares Al-Ejeh et al., *Clin. Cancer Res.* (2007) 13:5519s-5527s; Imperiali and Shannon, *Biochemistry* (1991) 30

(18):4374-4380; Katsuri, *Biochem J.* (1997) 323(Pt 2):415-419; Shakin-Eshleman et al, *J. Biol. Chem.* (1996) 271:6363-6366).

Термин "гипервариабельная область" или "HVR", как используется в настоящем документе, относится к каждой из областей вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными в последовательности ("области, определяющие комплементарность" или "CDR") и/или образуют структурно определенные петли ("гипервариабельные петли") и/или содержат остатки, вступающие в контакт с антигеном ("контакт с антигеном"). Как правило, антитела содержат шесть HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Иллюстративные HVR в настоящем документе включают:

(a) гипервариабельные петли, осуществляемые на остатках аминокислот 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR, осуществляемые на остатках аминокислот 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological of interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

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

(d) сочетания (a), (b) и/или (c), включающие остатки аминокислот HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

В одном из вариантов осуществления, остатки HVR содержат остатки, идентифицируемые на фиг. 3A-D или 4A-D, в табл. 4 или табл. 5 или еще где-либо в настоящем описании.

Если не указано иного, остатки HVR и другие остатки в вариабельном домене (например, FR остатки) нумеруются в настоящем документе в соответствии с Kabat et al., выше.

Остатки "каркаса" или "FR" представляют собой остатки вариабельного домена иные, чем остатки гипервариабельной области как определено в настоящем документе. FR вариабельного домена, как правило, состоит из четырех доменов FR: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности HVR и FR, как правило, появляются в следующей последовательности в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4. В определенных вариантах осуществления один или несколько FR остатков могут модифицироваться для модулирования стабильности антитела или для модулирования трехмерного позиционирования одной или нескольких HVR антитела, например, для усиления связывания.

"Полноразмерное антитело" представляет собой антитело, которое содержит вариабельную область связывания антигена, а также постоянный домен легкой цепи (CL) и постоянные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Постоянные домены могут представлять собой постоянные домены с нативной последовательностью (например, постоянные домены с нативной последовательностью человека) или варианты их последовательностей аминокислот.

Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "цельное антитело" используются в настоящем документе взаимозаменяемо для упоминания антитела, имеющего структуру по существу, сходную с нативной структурой антитела или имеющего тяжелые цепи, которые содержат Fc область, как определено в настоящем документе.

"Голое антитело" относится к антителу, которое не конъюгируется с гетерологичным остатком (например, с цитотоксичным остатком или радиоизотопной меткой). Голое антитело может присутствовать в фармацевтическом препарате.

"Нативные антитела" относятся к встречающимся в природе молекулам иммуноглобулина с различными структурами. Например, нативные антитела IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, которые связаны дисульфидными связями. От N- до C-окончания каждая тяжелая цепь имеет вариабельную область (VH), также называемую вариабельным тяжелым доменом или вариабельным доменом тяжелой цепи, за которым следуют три постоянных домена (CH1, CH2 и CH3). Подобным же образом от N- до C-окончания каждая легкая цепь имеет вариабельную область (VL), также называемую вариабельным легким доменом или вариабельным доменом легкой цепи, за которым следует постоянный легкий домен (CL). Легкая цепь антитела может быть приписана к одному из двух типов, называемых каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ), на основе последовательности аминокислот его постоянного домена.

"Эффекторные функции" антитела относятся к тем биологическим активностям антитела, которые дают в результате активирование иммунной системы иное, чем активирование пути комплемента. Такие активности по большей части находятся в Fc области (Fc области нативной последовательности или Fc области последовательности аминокислот варианта) антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают, например, связывание Fc рецептора и опосредуемую антитело-зависимыми клетками цитотоксичность (ADCC). В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему документу, по существу, не имеет эффекторной функции. В другом варианте осуществления, антитело по настоящему документу сохраняет минимальную эффекторную функцию. Способы модифицирования или устранения эффекторной функции хорошо известны в данной области и включают, но не ограничиваясь этим, устранение всей Fc области, ответственной за эффекторную функцию, или его части (т.е. использование антитела или фрагмента антитела в формате, где отсутствует вся Fc область или ее часть, такого, но не ограничиваясь этим, как фрагмент Fab, одноцепочечное антитело, и т.п., как описано в настоящем документе

и как известно в данной области; модификацию Fc области в одном или нескольких положениях аминокислот для устранения эффекторной функции (влияющих на Fc связывания: положения 238, 239, 248, 249, 252, 254, 256, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 311, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 436, 437, 438 и 439; и модификацию гликозилирования антитела (включая, но не ограничиваясь этим, продуцирование антитела в окружающей среде, которая не дает возможности для гликозилирования для млекопитающих дикого типа, удаление одной или нескольких углеводных групп из уже гликозилированного антитела и модификацию антитела в одном или нескольких положениях аминокислот для устранения способности антитела к гликозилированию в этих положениях (включая, но не ограничиваясь этим N297G и N297A и D265A)).

Функции "активирования комплемента" антитела или свойства антитела, которые делают возможным или запускают "активирование пути комплемента" используются взаимозаменяемо, и относятся к тем биологическим активностям антитела, которые вовлечены в путь активирования комплемента иммунной системы субъекта или стимулируют его. Такие активности включают, например, связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) и могут опосредоваться как Fc частью, так и отличной от Fc частью антитела. Способы модификации или устранения функции активирования комплемента хорошо известны в данной области и включают, но не ограничиваясь этим, удаление всей Fc области, ответственной за активирование комплемента, или ее части (т.е. использование антитела или фрагмента антитела в формате, где отсутствует вся Fc область или ее часть, таком как, но не ограничиваясь этим, фрагмент Fab, одноцепочечное антитело и т.п., как описано в настоящем документе и как известно в данной области, или модификацию Fc области в одном или нескольких положениях аминокислот для устранения или уменьшения взаимодействий с компонентами комплемента или способности к активированию компонентов комплемента, таких как положения 270, 322, 329 и 321, как известно, вовлеченные в связывание C1q), и модификацию или устранение части области, отличной от Fc, ответственной за активирование комплемента (т.е. модифицирование CH1 области в положении 132 (см., например, Vidarte et al., (2001) *J. Biol. Chem.* 276 (41):38217-38223)).

В зависимости от последовательности аминокислот постоянного домена их тяжелых цепей, полно-размерные антитела могут быть приписаны к различным "классам". Имеется пять главных классов полно-размерных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и несколько из них могут дополнительно подразделяться на "подклассы" (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Постоянные домены тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам антител, называют альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны в данной области.

Термин "рекомбинантное антитело", как используется в настоящем документе, относится к антителу (например, химерному, гуманизированному антителу или антителу человека или к его фрагменту, связывающему антиген), которое экспрессируется рекомбинантной клеткой хозяином, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело.

Термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые может вводиться экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первичные трансформированные клетки и потомство, полученное от них, вне зависимости от количества пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным по содержанию нуклеиновой кислоты исходной клетки но может содержать мутации. Мутантное потомство, которое имеет такую же функцию или биологическую активность, как было получено посредством скрининга или выбрано для исходных трансформированных клеток, включаются в рассмотрение в настоящем документе. Примеры "клеток хозяев" для продуцирования рекомбинантных антител включают: (1) клетки млекопитающих, например клетки яичников китайского хомячка (CHO), COS, клетки миеломы (включая клетки Y0 и NS0), клетки почек детенышей хомяка (BHK), клетки Hela и Vero; (2) клетки насекомых, например sf9, sf21 и Tn5; (3) клетки растений, например, растений, принадлежащих к роду *Nicotiana* (например, *Nicotiana tabacum*); (4) клетки дрожжей, например дрожжей, принадлежащих к роду *Saccharomyces* (например, *Saccharomyces cerevisiae*) или к роду *Aspergillus* (например, *Aspergillus niger*); (5) бактериальные клетки, например клетки *Escherichia coli* или клетки *Bacillus subtilis*, и т.п.

Как используется в настоящем документе, "специфично связывающееся" или "специфично связывается с" относится к антителу, селективно или предпочтительно связывающемуся с антигеном. Сродство связывания, как правило, определяется с использованием стандартного анализа, например анализа Скатчарда, или методики поверхностного плазмонного резонанса (например, с использованием BIACORE®).

"Антитело, которое связывается с таким же эпитопом" в качестве антитела сравнения относится к антителу, которое блокирует связывание антитела сравнения с его антигеном при конкурентном анализе на 50% или больше, и наоборот, антитело сравнения блокирует связывание антитела с его антигеном при конкурентном анализе на 50% или больше. В одном из вариантов осуществления, антитело анти-ВАСЕ1, образующее одно из биспецифичных или мультиспецифичных антител по настоящему изобретению, связывает эпитоп ВАСЕ1, связываемый с помощью YW412.8.31. Иллюстративный конкурентный анализ приводится в настоящем документе.

Термин "цитотоксичный агент", как используется в настоящем документе, относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает осуществление клеточной функции и/или вызывает гибель или разрушение клетки. Цитотоксичные агенты включают, но не ограничиваясь этим, радиоактивные изотопы (например,  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  и радиоактивные изотопы Lu); химиотерапевтические агенты или лекарственные средства (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды винка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие агенты); агенты ингибиторы роста; ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты; антибиотики; токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты; и разнообразные противоопухолевые или противораковые агенты, описанные в настоящем документе.

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

Термин "Fc область" в настоящем документе используется для определения C-конечной области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть постоянной области.

Термин включает Fc области нативной последовательности и Fc области вариантов. В одном из вариантов осуществления Fc область тяжелой цепи IgG человека простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного окончания тяжелой цепи. Однако C-конечный лизин (Lys447) Fc области может присутствовать или не присутствовать. Если в настоящем документе не указано иного, нумерация остатков аминокислот в Fc области или в постоянной области осуществляется в соответствии с системой нумерации ЕС, также называемой индекс ЕС, как описано в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Термин "рецептор FcRn" или "FcRn", как используется в настоящем документе, относится к Fc рецептору ("n" означает неонатальный), который, как известно, вовлечен в перенос материнских IgG в фетус через плаценту человека или приматов или желточный мешок (кролика) и новорожденному из молока через тонкий кишечник. Также известно, что FcRn вовлечен в поддержание постоянных уровней IgG в сыворотке посредством связывания молекул IgG и рециклирования их в сыворотку. "Область связывания FcRn" или "область связывания рецептора FcRn" относится к той части антитела, которая взаимодействует с рецептором FcRn. Определенные модификации области связывания FcRn антитела увеличивают сродство антитела или его фрагмента к FcRn, а также увеличивают время полужизни молекулы *in vivo*. Замещения аминокислот в одном или нескольких из следующих положений аминокислот 251, 256, 285, 290, 308, 314, 385, 389, 428, 434 и 436 увеличивают взаимодействие антитела с рецептором FcRn. Замещения в следующих далее положениях также увеличивают взаимодействие антитела с рецептором FcRn: 238, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, замещение из (патента США № 7371826).

"Иммуноконъюгат" представляет собой антитело, конъюгированное с одной или несколькими гетерологичными молекулами, включая, но не ограничиваясь этим, метку или цитотоксичный агент. Необязательно, такое конъюгирование осуществляется через линкер.

"Линкер", как используется в настоящем документе, представляет собой структуру, которая ковалентно или нековалентно соединяет антитело анти-TfR с гетерологичной молекулой. В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой пептид. В других вариантах осуществления линкер представляет собой химический линкер.

"Метка" представляет собой маркер, соединенный с антителом по настоящему документу и используется для детектирования или получения изображений. Примеры таких меток включают радиоизотопную метку, флуорофор, хромофор или афинную метку. В одном из вариантов осуществления метка представляет собой радиоизотопную метку, используемую для получения изображений, например  $^{99m}Tc$  или  $^{112}In$ , или спиновую метку для получения изображений с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известного как магнитная резонансная томография, MRI), такую, опять же, как йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец, железо и т.п.

"Индивидуум" или "субъект" представляет собой млекопитающее. Млекопитающие включают, но не ограничиваясь этим, одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и приматов иных, чем люди, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В определенных вариантах осуществления индивидуум или субъект представляет собой человека.

"Изолированное" антитело представляет собой антитело, которое отделено от компонента его естественной окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления антитело очищается до чистоты более чем 95 или 99%, как определяется, например, с помощью электрофоретических (например, SDS-PAGE, изоэлектрической фокусировки (IEF), капиллярного электрофореза) или хроматографических (например, ионообменной хроматографии или ВЭЖХ с обращенной фазой) способов. Относительно способов оценки чистоты антитела, см., например, Flatman et al, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

"Изолированная нуклеиновая кислота" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая отде-

лена от компонента ее естественной окружающей среды. Изолированная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует экстрахромосомально или в хромосомальном положении, которое отличается от ее естественного хромосомального положения.

"Изолированная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело анти-TfR", относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим тяжелые и легкие цепи антитела (или их фрагменты), включая такую молекулу (молекулы) нуклеиновой кислоты, встроенную в один вектор или в отдельные векторы, и такая молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты присутствует в одном или нескольких положениях в клетке-хозяине.

Термин "вставка в упаковку" используется для упоминания инструкций, вручную вставляемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировании, введении, сочетанной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно использования таких терапевтических продуктов.

"Процент (%) идентичности последовательностей аминокислот" по отношению к последовательности полипептидов сравнения определяется как процент остатков аминокислот в рассматриваемой последовательности, которые являются идентичными с остатками аминокислот в последовательности полипептидов сравнения, после выравнивания последовательностей и введения разрывов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и не рассматривая никакие консервативные замещения в качестве части идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процента идентичности последовательностей аминокислот может осуществляться различными способами, которые известны специалистам в данной области, например, с использованием публично доступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или программное обеспечение Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине последовательностей, которые сравнивают. Для целей в настоящем документе, однако, значения % идентичности последовательностей аминокислот генерируются с использованием компьютерной программы сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа сравнения последовательностей ALIGN-2 разработана Genentech, Inc., и код источника подан вместе с документацией пользователя в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован как U.S. Copyright Registration No. TXU 10087. Программа ALIGN-2 является публично доступной от Genentech, Inc., South San Francisco, California, или может быть компилирована из кода источника. Программа ALIGN-2 должна быть компилирована для использования на операционной системе UNIX, включая цифровую UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей устанавливаются программой ALIGN-2 и не изменяются.

В ситуациях, где ALIGN-2 используется для сравнения последовательностей аминокислот, % идентичности последовательностей аминокислот данной последовательности аминокислот А с данной последовательностью аминокислот В (это можно альтернативно перефразировать как % идентичности данной последовательности аминокислот А, которая имеет или содержит определенный % идентичности последовательностей аминокислот с данной последовательностью аминокислот В или по сравнению с ней) вычисляется следующим образом:  $100 \times \frac{X}{Y}$ , где X представляет собой количество остатков аминокислот, оцениваемых как идентичные совпадения с помощью программы выравнивания последовательностей ALIGN-2 при выравнивании программой А и В, и где Y представляет собой общее количество остатков аминокислот в В. Будет очевидно, что когда длина последовательности аминокислот А не равна длине последовательности аминокислот В, % идентичности последовательностей аминокислот А по отношению к В не будет равен % идентичности последовательностей аминокислот В по отношению к А. Если конкретно не утверждается иного, все значения % идентичности последовательностей аминокислот, используемые в настоящем документе, получают, как описано в предыдущем абзаце с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

Термин "фармацевтический препарат" относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы позволить биологической активности активного ингредиента, содержащегося в нем, быть эффективной, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому препарат должен вводиться.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтическом препарате иному, чем активный ингредиент, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничиваясь этим, буфер, наполнитель, стабилизатор или консервант.

Как используется в настоящем документе, "лечение" (и его грамматические варианты, такие как "лечить" или "леченый") относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественный ход событий для индивидуума, который лечится, и может осуществляться либо для профилактики, либо в ходе клинической патологии. Желаемые воздействия лечения включают, но не ограничиваясь этим, предотвращение появления или возобновления заболевания, ослабление симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение появления метастаз,

уменьшение скорости развития заболевания, облегчение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению используют для замедления развития заболевания или для замедления хода заболевания.

Термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который вовлечен в связывание антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных области каркаса (FR) и три гипервариабельных области (HVR). (См., например, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman и Co., page 91 (2007).) Один VH или VL домен может быть достаточным для придания специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть изолированы с использованием домена VH или VL от антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH соответственно. См., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al, *Nature* 352:624-628 (1991).

Термин "вектор", как используется в настоящем документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Термин включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки хозяина, в которую он вводится. Определенные векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они связаны в рабочем состоянии. Такие векторы упоминаются в настоящем документе как "векторы экспрессии".

## 2. Композиции и способы.

### А. Производство антител анти-TfR и их конъюгатов.

В одном из аспектов настоящее изобретение основывается, частично, на антителах анти-TfR, которые можно использовать для переноса желаемых молекул через BBB. В определенных вариантах осуществления предлагаются антитела, которые связываются с TfR человека. В определенных вариантах осуществления предлагаются антитела, которые связываются как с TfR человека, так и с TfR приматов. Антитела по настоящему изобретению являются полезными, например, для диагностики или лечения заболеваний, воздействующих на головной мозг и/или CNS.

### А. Иллюстративные антитела анти-TfR.

В одном из аспектов настоящее изобретение предлагает изолированные антитела, которые связываются с TfR. В определенных вариантах осуществления антитело анти-TfR по настоящему изобретению связывается специфично как с TfR человека, так и с TfR приматов. В определенных таких вариантах осуществления антитело анти-TfR по настоящему изобретению не ингибирует связывания трансферрина с TfR. В определенных таких вариантах осуществления антитело анти-TfR по настоящему изобретению связывается с апикальным доменом TfR. В других определенных таких вариантах осуществления антитело анти-TfR по настоящему изобретению связывается с неапикальным доменом TfR. В определенных аспектах антитела анти-TfR можно использовать для переноса одного или нескольких конъюгированных соединений для получения изображений или терапевтических соединений через BBB.

Предлагается антитело анти-TfR, где антитело содержит вариабельный домен (VL) легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 105. В определенных вариантах осуществления VL последовательность, имеющая по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность содержит замещения (например, консервативные замещения), инсерции или делеции, по сравнению с последовательностью сравнения, но антитело анти-TfR, содержащее такую последовательность, сохраняет способность к связыванию с TfR. В определенных вариантах осуществления в целом от 1 до 10 аминокислот замещаются, вставляются и/или удаляются в последовательности из SEQ ID NO: 105. В определенных вариантах осуществления замещения, инсерции или делеции осуществляются в областях вне HVR (т.е. в FR). Необязательно, антитело анти-TfR содержит последовательность VL в SEQ ID NO: 105, включая посттрансляционные модификации этой последовательности.

В другом аспекте настоящего изобретения антитело анти-TfR в соответствии с любым из рассмотренных выше вариантов осуществления представляет собой моноклональное антитело, включая химерное, гуманизованное антитело или антитело человека. В одном из вариантов осуществления антитело анти-TfR представляет собой фрагмент антитела, например Fv, Fab, Fab', scFv, диатело или фрагмент F(ab')<sub>2</sub>. В другом варианте осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело, например интактное антитело IgG1, IgG2, IgG3 или антитело IgG4 или другой класс или изотип антитела, как определено в настоящем документе.

В другом аспекте антитело анти-TfR в соответствии с любым из рассмотренных выше вариантов осуществления может включать любой из признаков по отдельности или в сочетании, как описано в разделах 1-7, ниже.

### 1. Сродство антитела.

В определенных вариантах осуществления антитело, предлагаемое в настоящем документе, имеет константу диссоциации (Kd)  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ,  $\leq 0,01$  нМ или  $\leq 0,001$  нМ (на-

пример,  $10^{-8}$ М или меньше, например от  $10^{-8}$ М до  $10^{-13}$ М, например от  $10^{-9}$ М до  $10^{-13}$ М).

В определенных аспектах настоящего изобретения антитело анти-TfR с "низким сродством" по настоящему изобретению выбирается, например, на основе результатов примера 5 и Atwal et al., *Sci. Transl. Med.* 3, 84ra43 (2011) и Yu et al, *Sci. Transl. Med.* 25 May 201 1:Vol. 3, Issue 84, p.84ra44, которые показывают, что такие антитела против TfR с низким сродством демонстрируют улучшенное потребление в CNS (например, в головном мозге) и/или устойчивость в головном мозге/CNS. Для идентификации таких антител с низким сродством доступны несколько анализов для измерения сродства антитела, включая, без ограничения, анализ Скоттхарда и методику поверхностного плазмонного резонанса (например, с использованием BIACORE®). В соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело имеет сродство к TfR человека или приматов примерно от 5 нМ или примерно от 20 нМ, или примерно от 100 нМ, примерно до 50 мкМ, или примерно до 30 мкМ, или примерно до 10 мкМ, или примерно до 1 мкМ, или примерно до 500 нМ. Таким образом, сродство может находиться в пределах примерно от 5 нМ примерно до 50 мкМ или в пределах примерно от 20 нМ примерно до 30 мкМ, или в пределах примерно от 30 нМ примерно до 30 мкМ, или в пределах примерно от 50 нМ примерно до 1 мкМ, или в пределах примерно от 100 примерно до 500 нМ, например, как измерено с помощью анализа Скоттхарда или BIACORE®. В других вариантах осуществления настоящего изобретения антитело имеет время полужизни при диссоциации с TfR меньше чем 1 мин, меньше чем 2 мин, меньше чем 3 мин, меньше чем 4 мин, меньше чем 5 мин или меньше чем от 10 и примерно до 20 мин, или примерно до 30 мин, как измерено с помощью анализа конкурентного связывания или BIACORE®.

Таким образом, настоящее изобретение предлагает способ получения антитела, пригодного для переноса лекарственного средства против неврологического расстройства через гематоэнцефалический барьер, включающий выбор антитела из панели антител против TfR, поскольку оно имеет сродство TfR, которое находится в пределах примерно от 5 или примерно от 20 нМ, или примерно от 100 нМ, примерно до 50 мкМ, или примерно до 30 мкМ, или примерно до 10 мкМ, или примерно до 1 мкМ, или примерно до 500 нМ. Таким образом, сродство может находиться в пределах примерно от 5 нМ примерно до 50 мкМ или в пределах примерно от 20 нМ примерно до 30 мкМ, или в пределах примерно от 30 нМ примерно до 30 мкМ, или в пределах примерно от 50 нМ примерно до 1 мкМ, или в пределах примерно от 100 примерно до 500 нМ, как измерено, например, с помощью анализа Скоттхарда или BIACORE®. Как будет понятно специалисту в данной области, конъюгирование гетерологичной молекулы/соединения с антителом часто будет уменьшать сродство антитела к его мишени, например, из-за стерического затруднения или даже устранения одного плеча связывания, если антитело делается мультиспецифичным с помощью одного или нескольких плеч, связывающихся с антигеном иным, чем исходная мишень антитела. В одном из вариантов осуществления антитело с низким сродством по настоящему изобретению, специфичное к TfR, конъюгированное с анти-BACE1, имеет Kd по отношению к TfR, как измерено с помощью BIACORE, примерно 30 нМ. В другом варианте осуществления антитело с низким сродством по настоящему изобретению, специфичное по отношению к TfR, конъюгированное с BACE1, имеет Kd по отношению к TfR, как измерено с помощью BIACORE, примерно 600 нМ. В другом варианте осуществления антитело с низким сродством по настоящему изобретению, специфичное к TfR, конъюгированное с BACE1, имеет Kd по отношению к TfR, как измерено с помощью BIACORE, примерно 20 мкМ. В других вариантах осуществления антитело с низким сродством по настоящему изобретению, специфичное к TfR, конъюгированное с BACE1, имеет Kd по отношению к TfR, как измерено с помощью BIACORE, примерно 30 мкМ.

В одном из вариантов осуществления Kd измеряют с помощью анализа связывания радиоактивно меченого антигена (RIA). В одном из вариантов осуществления RIA осуществляют с помощью версии Fab антитела, представляющего интерес, и его антигена. Например, сродство связывания в растворе Fab с антигеном измеряют посредством уравнивания Fab с помощью минимальной концентрации ( $^{125}$ I)-меченого антигена в присутствии последовательных титров немеченого антигена, затем захвата связанного антигена с помощью планшета, покрытого антителом анти-Fab (см., например, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Для установления условий анализа многолуночные планшеты MICROTITER (Thermo Scientific) покрывают в течение ночи 5 мкг/мл покрытия, захватывающего антитело анти-Fab (Cappel Labs), в 50 мМ карбоната натрия (pH 9,6), а впоследствии блокируют с помощью 2% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение 2-5 ч при комнатной температуре (приблизительно 23°C). На неадсорбирующем планшете (Nunc #269620), 100 пМ или 26 пМ [ $^{125}$ I]-антигена смешивают с последовательными разбавлениями Fab, представляющих интерес (например, совместимых с оценками антитела анти-VEGF, Fab-12, в Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)).

Затем Fab, представляющий интерес, инкубируется в течение ночи; однако инкубирование может продолжаться в течение более продолжительного периода (например, примерно 65 ч), чтобы обеспечить достижение равновесия. После этого, смеси переносят в захватывающий планшет для инкубирования при комнатной температуре (например, в течение 1 ч). Затем раствор удаляют и планшет промывают восемь раз 0,1% раствора полисорбата 20 (TWEEN-20®) в PBS. Когда планшеты сушат, добавляют 150 мкл/луночка сцинтиллянта (MICROSCINT-20™; Packard), и планшеты считают на  $\gamma$ -счетчике TOPCOUNT™

(Packard) в течение 10 мин. Концентрации каждого Fab, которые дают 20% от максимального связывания или меньше, выбирают для использования в конкурентных анализах связывания.

В одном из аспектов RIA представляет собой анализ Скоттхарда. Например, антитело анти-TfR, представляющее интерес, может йодироваться с использованием лактопероксидазного способа (Bennett and Horuk, *Methods in Enzymology* 288 pg. 134-148 (1997)). Радиоактивно меченое антитело анти-TfR очищают от свободного  $^{125}\text{I}$ -Na с помощью гель-филтрации с использованием колонки NAP-5, и измеряют его удельную активность. Конкурентные реакционные смеси по 50 мкл, содержащие фиксированную концентрацию йодированного антитела и уменьшающиеся концентрации последовательно разбавленного немеченого антитела, помещают в 96-луночные планшеты. Клетки, транзитивно экспрессирующие TfR, культивируют в средах роста, состоящих из модифицированной по способу Дульбекко среды Игла (DMEM) (Genentech), дополненной 10% FBS, 2 mM L-глутамина и 1 × пенициллина-стрептомицина, при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Клетки отделяют от чашек с использованием Sigma Cell Dissociation Solution и промывают буфером для связывания (DMEM с 1% раствором бычьего сывороточного альбумина, 50 mM HEPES, pH 7,2 и 0,2% азида натрия). Промытые клетки добавляют при примерной плотности 200000 клеток в 0,2 мл буфера для связывания в 96-луночные планшеты, содержащие по 50 мкл конкурентных реакционных смесей. Конечная концентрация немеченого антитела при конкурентной

реакции с клетками изменяется, начиная от 1000 нМ, а затем уменьшается посредством кратного разбавления 1:2 для 10 концентраций, и включая образец, содержащий только буфер с нулевым добавлением. Конкурентные реакции с клетками для каждой концентрацией немеченого антитела анализируются трехкратно. Конкурентные реакции с клетками инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре. После 2-часового инкубирования, конкурентные реакции переносят на фильтровальный планшет и промывают четыре раза буфером для связывания с целью разделения свободных и связанных йодированных антител. Фильтры считают с помощью  $\gamma$ -счетчика, и данные по связыванию оценивают с использованием алгоритма подгонки Munson and Rodbard (1980) для определения сродства связывания антитела.

Иллюстративный анализ BIACORE® с использованием композиции по настоящему изобретению может быть осуществлен следующим образом.

Kd измеряют с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIACORE®-2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с использованием набора анти-Fc человека (BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Вкратце, биосенсорные чипы на основе карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIACORE, Inc.) активируют с помощью N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антитело анти-Fc человека разбавляют с помощью 10 mM ацетата натрия, pH 4,0, до 50 мкг/мл перед инъекцией при скорости потока 5 мкл/мин с получением приблизительно 10000 единиц реакции (RU) связанного белка. После инъекции антитела 1M этаноламина инжикируют для блокировки непрореагировавших групп. Для измерений кинетики, моноспецифичные или мультиспецифичные варианты антитела анти-TfR инжикируют в HBS-P с получением примерно 220 RU (единиц реакции), затем инжикируют двукратные последовательные разбавления MuTfR-His (от 0,61 до 157 нМ) в HBS-P при 25°C при скорости потока приблизительно 30 мкл/мин. Скорости ассоциации (kon) и скорости диссоциации (koff) вычисляют с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) с помощью одновременной подгонки сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесная константа диссоциации (Kd) вычисляется как отношение koff/kon. См., например, Chen et al, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999).

В соответствии с другим вариантом осуществления Kd измеряют с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса с помощью устройства BIACORE®-2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C, с использованием набора анти-Fc человека (BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Вкратце, биосенсорные чипы на основе карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIACORE, Inc.) активируются с помощью N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антитело анти-Fc человека разбавляют 10 mM ацетата натрия, pH 4,0, до 50 мкг/мл перед инжикированием при скорости потока 5 мкл/мин с получением приблизительно 10000 единиц реакции (RU) связанного белка. После инжикирования антитела инжикируют 1M этаноламина для блокировки непрореагировавших групп. Для измерения кинетики, варианты антитела анти-TfR инжикируют в HBS-P с получением примерно 220 RU, затем двукратные последовательные разбавления TfR-His (от 0,61 до 157 нМ) инжикируют в HBS-P при 25°C при скорости потока приблизительно 30 мкл/мин. Скорости ассоциации (kon) и скорости диссоциации (koff) вычисляют с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) с помощью одновременной подгонки сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесная константа диссоциации (Kd) вычисляется как отношение koff/kon. См., например, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999).

В настоящей области известны несколько способов определения IC<sub>50</sub> для данного соединения; обычный подход заключается в осуществлении анализа конкурентного связывания, такого как описано в настоящем документе. В целом, высокое значение IC<sub>50</sub> показывает, что требуется больше антитела для

ингибирования связывания известного лиганда, и таким образом, что сродство антитела к этому лиганду является относительно низким. Наоборот, низкое значение  $IC_{50}$  показывает, что требуется меньше антитела для ингибирования связывания известного лиганда, и таким образом, что сродство антитела к этому лиганду является относительно высоким.

Иллюстративный конкурентный анализ ELISA для измерения значения  $IC_{50}$  представляет собой анализ, при котором возрастающие концентрации вариантов антител анти-Tf или анти-TfR/антиген головного мозга (т.е. анти-TfR/BACE1, анти-TfR Abeta и т.п.) используются для конкуренции с биотинилированным известным антителом анти-TfR за связывание с TfR. Конкурентный анализ ELISA анти-TfR осуществляют на планшетах Maxisorp (Neptune, N.J.), покрытых 2,5 мкг/мл очищенного внеклеточного домена TfR мышиных в PBS при 4°C в течение ночи. Планшеты промывают с помощью PBS/0,05% Tween 20 и блокируют с использованием блокирующего буфера Superblock в PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Титры каждого индивидуального антитела анти-TfR или анти-TfR/антиген головного мозга (т.е. анти-TfR/BACE 1 или анти-TfR/A $\beta$ ) (последовательные разбавления 1:3) объединяют с биотинилированным известным антителом анти-TfR (конечная концентрация 0,5 нМ) и добавляют на планшет в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и добавляют на планшет HRP-стрептавидин (Southern Biotech, Birmingham), и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и биотинилированное антитело анти-TfR, связанное на планшете, детектируют с использованием субстрата TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

## 2. Фрагменты антител.

В определенных вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, представляет собой фрагмент антитела.

Фрагменты антител включают, но не ограничиваясь этим, фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv и scFv и другие фрагменты, описанные ниже. Относительно обзора определенных фрагментов антител, см. Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Относительно обзора фрагментов scFv, см., например, Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); см. также WO 93/16185; и патенты США №№ 5571894 и 5587458. Относительно обсуждения фрагментов Fab и F(ab')<sub>2</sub>, содержащих остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации и имеющих повышенное время полужизни *in vivo*, см. патент США № 5869046.

Диатела представляют собой фрагменты антител с двумя сайтами связывания антигена, которые могут быть бивалентными или биспецифичными. См., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); и Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993). Триатела и тетраатела также описываются в Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие все переменные домены тяжелой цепи или их часть или все переменные домены легкой цепи антитела или их часть. В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека (Domantis, Inc., Waltham, MA; см., например, патент США № 6248516 B1).

Фрагменты антител могут быть получены с помощью различных методик, включая, но не ограничиваясь этим, протеолитическое переваривание интактного антитела, а также продуцирование посредством рекомбинантных клеток хозяев (например, *E. coli* или фага), как описано в настоящем документе.

## 3. Химерные и гуманизированные антитела.

В определенных вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, представляет собой химерное антитело. Определенные химерные антитела описаны, например, в патенте США № 4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:681-6855 (1984)). В одном из примеров химерное антитело содержит переменную область, не принадлежащую человеку (например, переменную область, полученную от мыши, крысы, хомяка, кролика или примата, отличного от человека, такого как обезьяна), и постоянную область человека. Химерные антитела, представляющие интерес, в настоящем документе включают "приматизированные" антитела, содержащие связывающие антиген последовательности переменного домена, полученные от примата, отличного от человека (например, мартышковых, таких как бабуин, макак-резус или обезьяна циномогус) и последовательности постоянной области человека (патент США № 5693780). В другом примере химерное антитело представляет собой антитело "с переключением синтеза", у которого класс или подкласс отличается от класса или подкласса исходного антитела. Химерные антитела включают их фрагменты, связывающие антиген.

В определенных вариантах осуществления химерное антитело представляет собой гуманизированное антитело. Как правило, антитело, не принадлежащее человеку, гуманизируется для уменьшения иммуногенности для человека, в то же время сохраняя специфичность и сродство исходного антитела, не принадлежащего человеку. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или несколько переменных доменов, в которых HVR, например CDR (или их части), получают из антитела, не принадлежащего человеку, а FR (или их части) получают из последовательности антитела человека. Гуманизированное антитело необязательно будет также содержать по меньшей мере часть постоянной области человека. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR в гуманизированном антителе замещаются соответствующими остатками из антитела, не принадлежащего человеку (например, антитела, из которого получают остатки HVR), например, для восстановления или улучшения специфичности

или сродства антитела.

Гуманизированные антитела и способы их получения обсуждаются, например, в Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) и дополнительно описываются, например, в Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); в патентах США №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (описывающей прививку области, определяющей специфичность (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (описывающей "изменение поверхности"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (описывающей "перемешивание FR"); и Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) и Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (описывающей подход "направленной селекции" к перемешиванию FR).

Области каркаса человека, которые можно использовать для гуманизации, включают, но не ограничиваясь этим, области каркаса, выбранные с использованием способа "наилучшей подгонки" (см., например, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); области каркаса, полученные из консенсусной последовательности антител человека из конкретной подгруппы вариабельных областей легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); и Presta et al. *J. Immunol.* 151:2623 (1993)); области созревшего (соматически мутировавшего) каркаса человека или области зародышевой линии каркаса человека (см., например, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); и из областей каркаса, полученных при скрининге FR библиотек (см., например, Vasa et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) и Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

#### 4. Антитела человека.

В определенных вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, представляет собой антитело человека. Антитела человека могут быть получены с использованием различных технологий, известных в данной области. Антитела человека в целом описаны в van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001), и в Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Антитела человека могут быть получены посредством введения иммуногена трансгенному животному, которое модифицируется для продуцирования интактных антител человека или интактных антител с вариабельными областями человека в ответ на антигенное провоцирование. Такие животные, как правило, содержат все те локусы иммуноглобулина человека или их часть, которые заменяют локусы эндогенного иммуноглобулина или которые присутствуют экстрахромосомально или встраиваются неупорядоченно в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей локусы эндогенного иммуноглобулина, как правило, дезактивируются. Относительно обзора способов получения антител человека от трансгенных животных, см. Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). См. также, например, патенты США №№ 6075181 и 6150584, описывающие методику XENOMOUSE™; патент США № 5770429, описывающий методику HUMAB®; патент США № 7041870, описывающий методику K-M MOUSE®, и публикацию заявки на патент № US 2007/0061900, описывающую методику VELOCIMOUSE®). Вариабельные области человека от интактных антител, генерируемых такими животными, могут дополнительно модифицироваться, например, посредством объединения с другой постоянной областью человека.

Антитела человека могут также быть получены с помощью способов, основанных на гибридоме. Описаны линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для продуцирования моноклональных антител человека. (См., например, Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Voerner et al., *J. Immunol.*, 147:86 (1991).) Антитела человека, генерируемые посредством методики гибридомы В-лимфоцитов человека, также описываются в Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Дополнительные способы включают те, которые описаны, например, в патенте США № 7189826 (описывающих получение моноклональных антител IgM человека из линий клеток гибридомы) и Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (описывающей гибридомы человек-человек). Методика гибридомы человека (методика Trioma) также описана в Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005), и в Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Антитела человека могут также генерироваться посредством изолирования последовательностей вариабельного домена клона Fv, выбранных из библиотек фаговых дисплеев, полученных от человека. Такие последовательности вариабельного домена могут затем объединяться с желаемым постоянным доменом человека. Методики выбора антител человека из библиотек антител описаны ниже.

#### 5. Антитела, полученные из библиотек.

Антитела по настоящему изобретению могут изолироваться посредством скрининга комбинаторных библиотек относительно антител с желаемой активностью или активностями. Например, в данной области известны различные способы генерирования библиотек фаговых дисплеев и скрининга таких библиотек относительно антител, обладающих желаемыми характеристиками связывания. Такие способы обсуждаются, например, в Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001), и дополнительно описываются, например, в McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Marks and Bradbury, в *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu

et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); и Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004).

В определенных способах фагового дисплея репертуары генов VH и VL клонируются по отдельности с помощью цепной реакции полимеразы (PCR) и рекомбинируют случайным образом в фаговых библиотеках, которые затем могут просматриваться относительно фага, связывающего антиген, как описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Фаговый дисплей, как правило, отображает фрагменты антител, либо как одноцепочечные Fv(scFv) фрагменты, либо как Fab фрагменты. Библиотеки от иммунизированных источников обеспечивают антитела с высоким сродством к иммуногену без требования конструирования гибридом. Альтернативно, может клонироваться наивный репертуар (например, от человека) для получения антител из одного источника для широкого диапазона не своих, а также своих антигенов без какой-либо иммунизации, как описано Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Наконец, наивные библиотеки могут также быть получены синтетически посредством клонирования неперегруппированных сегментов V-генов от стволовых клеток и с использованием праймеров PCR, содержащих случайную последовательность, для кодирования сильно варьируемых областей CDR3 и для осуществления перегруппировки *in vitro*, как описано Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992). Патентные публикации, описывающие фаговые библиотеки антител человека, включают, например, патент США № 5750373 и публикации патентов США №№ 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

Антитела или фрагменты антител, изолированных из библиотек антител человека, рассматриваются в настоящем документе как антитела человека или фрагменты антител человека.

#### 6. Мультиспецифичные антитела.

В определенных вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, представляет собой мультиспецифичное антитело, например биспецифичное антитело. Мультиспецифичные антитела представляют собой моноклональные антитела, которые имеют специфичность связывания по меньшей мере для двух различных сайтов. В определенных вариантах осуществления одна из специфичностей связывания предназначена для Tfr, а другая для любого другого антигена. В определенных вариантах осуществления биспецифичные антитела могут связываться с двумя различными эпитопами Tfr. Биспецифичные антитела могут также использоваться для локализации цитотоксичных агентов в клетках, которые экспрессируют Tfr. Биспецифичные антитела могут быть получены как полноразмерные антитела или фрагменты антитела.

Методики получения мультиспецифичных антител включают, но не ограничиваясь этим, рекомбинантное совместное экспрессирование двух пар тяжелая цепь - легкая цепь иммуноглобулина, имеющих различные специфичности (см. Milstein and Cuello, *Nature* 305:537 (1983)), WO 93/08829 и Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655 (1991)), и генную инженерию "выступ во впадину" (см., например, патент США № 5731168). Мультиспецифичные антитела могут также быть получены посредством конструирования электростатических управляющих эффектов для получения Fc-гетеродимерных молекул антител (WO 2009/089004A1); перекрестного связывания двух или более антител или фрагментов (см., например, патент США № 4676980 и Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)); использования лейциновых 'молний' для получения биспецифичных антител (см., например, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); использование методики "диател" для получения биспецифичных фрагментов антител (см., например, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)) и использование одноцепочечных димеров Fv(sFv) (см., например Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); и приготовление триспецифичных антител, как описано, например, в Tutt et al. *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Антитело или фрагмент в настоящем документе также включает "Fab двойного действия" или "DAF", содержащий сайт связывания антигена, который связывается с Tfr, а также с другим, отличным от него антигеном (см., например, US 2008/0069820).

В соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, "связывание" осуществляется посредством генерирования мультиспецифичного антитела (например, биспецифичного антитела). Мультиспецифичные антитела представляют собой моноклональные антитела, которые имеют специфичности связывания по меньшей мере к двум различным антигенам или эпитопам. В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело содержит первый сайт связывания антигена, который связывает Tfr, и второй сайт связывания антигена, который связывает антиген головного мозга, такой как  $\beta$ -секретаза 1 (BACE1) или A $\beta$ , и другие антигены головного мозга, описанные в настоящем документе.

Иллюстративный антиген головного мозга, связываемый с помощью мультиспецифичного/биспецифичного антитела, представляет собой BACE1, и иллюстративное антитело, связывающееся с ним, представляет собой антитело YW412.8.31 на фиг. 16A-B в настоящем документе.

В другом варианте осуществления антиген головного мозга представляет собой A $\beta$ , примеры таких антител описаны в WO 2007068412, WO 2008011348, WO 20080156622 и WO 2008156621, в явном виде включаемых в настоящий документ в качестве ссылок, при этом иллюстративное антитело к A $\beta$  включает антитело IgG4 MABT5102A, содержащее последовательности аминокислот тяжелой и легкой цепи, на

фиг. 11А и 11В соответственно.

Методики получения мультиспецифичных антител включают, но не ограничиваясь этим, рекомбинантное совместное экспрессирование двух пар тяжелая цепь - легкая цепь иммуноглобулина, имеющих различные специфичности (см. Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)), WO 93/08829, и Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991)) и генную инженерию "выступ во впадину" (см., например, патент США № 5731168). Мультиспецифичные антитела могут также быть получены посредством конструирования электростатических управляющих эффектов для получения Fc-гетеродимерных молекул антител (WO 2009/089004 A1); перекрестного связывания двух или более антител или фрагментов (см., например, патент США № 4676980 и Brennan et al., Science, 229:81 (1985)); использования лейциновых 'молний' для получения биспецифичных антител (см., например, Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)); использования методики "диател" для получения биспецифичных фрагментов антител (см., например, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)) и использования одноцепочечных димеров Fv (sFv) (см., например Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)) и приготовления триспецифичных антител, как описано, например, в Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991).

Полученные с помощью генной инженерии антитела с тремя или более функциональными сайтами связывания антигена, включая "антитела осьминоги" или "иммуноглобулины с двумя варибельными доменами" (DVD), также включаются в настоящий документ (см., например, US 2006/0025576 A1 и Wu et al. Nature Biotechnology (2007)).

#### 7. Варианты антител.

В определенных вариантах осуществления рассматриваются варианты последовательностей аминокислот антител, предложенных в настоящем документе. Например, может быть желательным улучшение средства связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты последовательности аминокислот антитела могут быть получены посредством введения соответствующих модификаций в последовательность нуклеотидов, кодирующую антитело, или посредством пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или инсерции и/или замещения остатков в последовательностях аминокислота антитела. Может осуществляться любое сочетание делеций, инсерции и замещений для получения конечного конструкта, при условии, что конечный конструкт обладает желаемыми характеристиками, например связывает антиген.

##### а) Варианты замещений, инсерций и делеций.

В определенных вариантах осуществления предлагаются варианты антител, имеющие одно или несколько замещений аминокислот. Сайты, представляющие интерес, для мутагенеза с помощью замещений включают HVR и FR. Консервативные замещения показаны в табл. 2 под заголовком "Предпочтительные замещения". Более существенные изменения приводятся в табл. 2 под заголовком "Иллюстративные замещения" и дополнительно описываются ниже со ссылками на классы боковых цепей аминокислот. Замещения аминокислот могут вводиться в антитело, представляющее интерес, и в продукты, просматриваемые относительно желаемой активности, например, сохранения/улучшения связывания антигена, уменьшения иммуногенности или улучшения ADCC или CDC.

Таблица 2

Исходный остаток	Иллюстративные замещения	Предпочтительные замещения
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn (N)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gin

Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Scr; Ala	Ser
Gin (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин; lie; Val; Met; Ala; Phe	lie
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; lie	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; lie; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	lie; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Аминокислоты могут группироваться в соответствии с общими свойствами боковых цепей:

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

Неконсервативные замещения будут давать замену элемента одного из этих классов на другой класс.

Один из типов вариантов с замещением включает замещение одного или нескольких остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, полученный в результате вариант(варианты) выбранный для дальнейших исследований, будет иметь модификации (например, улучшения) определенных биологических свойств (например, повышенное сродство, пониженную иммуногенность) по сравнению с исходным антителом и/или будет иметь, по существу, сохраненные определенные биологические свойства исходного антитела. Иллюстративный вариант с замещением представляет собой антитело с созревшим сродством, которое может быть удобным генерировать, например, с использованием методик созревания сродства на основе фагового дисплея, таких как те, которые описаны в настоящем документе. Вкратце, один или несколько остатков HVR мутируют, и варианты антител получают с помощью фагового дисплея и просматривают на конкретную биологическую активность (например, сродство связывания).

Изменения (например, замещения) могут осуществляться, например, в HVR, для улучшения сродства антитела. Такие изменения можно осуществлять в "горячих точках" HVR, т.е. на остатках, кодируемых кодонами, которые подвергаются мутациям с высокой частотой в течение процесса соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), и/или на остатках, которые вступают в контакт с антигеном, при этом полученный в результате вариант VH или VL исследуют на сродство связывания. Созревание сродства посредством конструирования и повторного выбора из вторичных библиотек описано, например, в Hoogenboom et al. *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) В некоторых вариантах осуществления созревания сродства вводится разнообразие в вариабельные гены, выбранные для созревания, с помощью любого из разнообразных способов (например, PCR со склонностью к ошибкам, перемешивания цепей или олигонуклеотид-направленного мутагенеза). Затем создается вторичная библиотека. Затем осуществляют скрининг библиотеки для идентификации любых вариантов антитела с желаемым сродством. Другой способ введения разнообразия включает HVR-направленные подходы, при которых рандомизируются

несколько остатков HVR (например, 4-6 остатков за один раз).

Остатки HVR, вовлеченные в связывание с антигеном, могут быть специфично идентифицированы, например, с использованием аланин-сканирующего мутагенеза или моделирования. В частности, мишенями часто являются CDR-H3 и CDR-L3.

В определенных вариантах осуществления замещения, инсерции или делеции могут осуществляться в одной или нескольких HVR постольку, поскольку такие изменения не уменьшают существенно способности антитела к связыванию антигена. Например, в HVR можно осуществлять консервативные изменения (например, консервативные замещения, как предлагается в настоящем документе), которые не уменьшают существенно сродства связывания. Такие изменения могут находиться, например, вне остатков, вступающих в контакт с антигеном, в HVR. В определенных вариантах осуществления вариантов VH и VL последовательностей, предложенных выше, каждая HVR либо остается неизменной, либо содержит не более одного, двух или трех замещений аминокислот.

Полезный способ для идентификации остатков или областей антитела, которые могут быть мишенями для мутагенеза, называется "аланин-сканирующий мутагенез", как описано в Wells (1989) Science, 244:1081-1085. В этом способе остаток или группа целевых остатков (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) идентифицируются и заменяются нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином) для определения того, влияет ли это на взаимодействие антитела с антигеном. Дополнительные замещения могут вводиться в положениях аминокислот, демонстрирующих функциональную чувствительность к начальным замещениям. Альтернативно или в дополнение к этому, кристаллическая структура комплекса антиген-антитело может использоваться для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние с ними остатки могут быть сделаны мишенями или устранены в качестве кандидатов на замещение. Можно осуществить скрининг вариантов для определения того, содержат ли они желаемые свойства.

Инсерции в последовательности аминокислот включают amino- и/или карбоксилконечные слияния, находящиеся в пределах длины от одного остатка до полипептидов, содержащих сотню или более остатков, а также инсерции внутри последовательности из одного или множества остатков аминокислот. Примеры конечных инсерции включают антитело с N-конечным метионильным остатком. Другие варианты инсерции для молекулы антитела включают слияние с N-или C-окончанием антитела фермента (например, ADEPT) или полипептида, который увеличивает время полужизни антитела в сыворотке.

#### b) Варианты с гликозилированием.

В определенных вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, изменяется для увеличения или уменьшения той степени, до которой антитело гликозилировано. Добавление или удаление сайтов гликозилирования в антитело может быть удобным осуществлять посредством такого изменения последовательности аминокислот, при котором создается или удаляется один или несколько сайтов гликозилирования.

Когда антитело содержит Fc область, углеводов, присоединенный к ней, может изменяться. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, как правило, содержат разветвленный, двухантенный олигосахарид, который, как правило, присоединен с помощью N-связи к Asn297 домена CH2 Fc области. См., например, Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). Олигосахарид может содержать разнообразные углеводы, например маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, соединенную с GlcNAc, в "стебле" двухантенной структуры олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления могут осуществляться модификации олигосахаридов в антителе по настоящему изобретению для создания вариантов антитела с определенными улучшенными свойствами.

В одном из вариантов осуществления предлагаются варианты антитела, имеющие структуру углевода, в котором отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или косвенно) к Fc области. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1 до 80%, от 1 до 65%, от 5 до 65% или от 20 до 40%. Количество фукозы определяется посредством вычисления среднего количества фукозы в сахарной цепи на Asn297, по отношению к сумме всех гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, комплексных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), как измерено с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к аспарагиновому остатку, расположенному около положения 297 в Fc области (ЕС нумерация остатков Fc области); однако Asn297 может также располагаться примерно за  $\pm 3$  аминокислоты до или после положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, из-за малого разброса последовательностей в антителах. Такие варианты с фукозилированием могут иметь улучшенную функцию ADCC. См., например, публикации патентов США №№ 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (yowa Nakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, относящихся к "дефукозилированным" или "фукоза-дефицитным" вариантам антител, включают US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004). Примеры линий клеток, способных продуцировать дефукозилированные антитела, вклю-

чают линию клеток Lec13CHO, дефицитную по фукозилрованию белка (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); заявка на патент США № 2003/0157108 A1, Presta, L.; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., в частности пример 11), и линии нокаутированных клеток, такие как клетки с геном  $\alpha$ -1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, нокаутированные клетки CHO (см., например, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006) и WO 2003/08107).

Кроме того, предлагаются варианты антител с разделенными пополам олигосахаридами, например, в которых двухантеннарный олигосахарид, присоединенный к Fc области антитела, делится пополам посредством GlcNAc. Такие варианты антител могут иметь пониженное фукозилрование и/или улучшенную функцию ADCC. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); в патенте США № 6602684 (Umana et al); и в US 2005/0123546 (Umana et al.). Варианты антител по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc области, также предлагаются. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию CDC. Такие варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); и WO 1999/22764 (Raju, S.).

#### с) Варианты Fc области.

В определенных вариантах осуществления одна или несколько модификаций аминокислот могут вводиться в Fc область антитела, предложенного в настоящем документе, тем самым генерируя вариант Fc области. Вариант Fc области может содержать последовательность Fc области человека (например, Fc область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую модификацию аминокислот (например, замещение) в одном или нескольких положениях аминокислот.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение рассматривает вариант антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, которые делают его желательным кандидатом для применений, в которых является важным время полужизни антитела *in vivo*, и при этом определенные эффекторные функции (такие как активирование комплемента и ADCC) являются ненужными или вредными. Могут осуществляться анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo*, чтобы подтвердить уменьшение/обеднение активностей CDC и/или ADCC. Например, могут осуществляться анализы связывания Fc рецептора (FcR), чтобы убедиться, что для антитела отсутствует связывание Fc $\gamma$ R (следовательно, вероятно отсутствует активность ADCC), но сохраняется способность связывания FcRn. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK клетки экспрессируют только Fc $\gamma$ RIII, в то время как моноциты экспрессируют Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII и Fc $\gamma$ RIII. Экспрессирование FcR в гематопоэтических клетках приводится в табл. 3 на стр. 464 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки активности ADCC молекулы, представляющей интерес, описаны в патенте США № 5500362 (см., например Hellstrom, I. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5821337 (см. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Альтернативно, можно использовать методы нерадиоактивных анализов (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТП<sup>М</sup> для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные клетки киллеры (NK). Альтернативно или в дополнение к этому, активность ADCC молекулы, представляющей интерес, может оцениваться *in vivo*, например, на животной модели такой, как та, которая описывается в Clynes et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Анализ связывания C1q может также осуществляться для подтверждения того, что антитело не способно связывать C1q, и, следовательно, у него отсутствует активность CDC. См., например, анализ ELISA связывания C1q и C3s в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активирования комплемента может быть осуществлен анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); и Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). Связывание FcRn и определение выведения/времени полужизни *in vivo* также могут осуществляться с использованием способов, известных в данной области (см., например, Petkova, S.B. et al., Intl. Immunol. 18 (12):1759-1769 (2006)).

Неограничивающие примеры антител с уменьшенной эффекторной функцией включают антитела с замещением одного или нескольких остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 Fc области (патент США № 6737056). Такие Fc мутанты включают Fc мутанты с замещениями в двух или более положениях аминокислот 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый Fc мутант "DANA" с замещением остатков 265 и 297 аланином (патент США № 7332581).

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

В определенных вариантах осуществления вариант антитела содержит Fc область с одним или несколькими замещениями аминокислот, которые улучшают ADCC, например, замещениями в положениях 298, 333 и/или 334 Fc области (нумерация остатков ЕС).

В некоторых вариантах осуществления осуществляют изменения в Fc области, которые дают в ре-

зультате изменение (т.е. либо улучшение, либо ухудшение) связывания C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в патенте США № 6194551, WO 99/51642 и в Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

Антитела с увеличенными временами полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным Fc рецептором (FcRn), который является ответственным за перенос материнских IgG фетусу (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), описаны в US 2005/0014934 A1 (Hinton et al.). Эти антитела содержат Fc область с одним или несколькими замещениями в ней, которые улучшают связывание Fc области с FcRn. Такие неограничивающие варианты Fc включают варианты с замещениями в одном или нескольких остатках Fc области: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например замещение остатка 434 Fc области (патент США № 7371826).

См. также Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821 и WO 94/29351 относительно других примеров вариантов Fc области.

d) Полученные с помощью геной инженерии цистеиновые варианты антител.

В определенных вариантах осуществления может быть желательным создание полученных с помощью геной инженерии цистеиновых антител, например "thioMAb", в которых один или несколько остатков антитела замещены цистеиновыми остатками. В конкретных вариантах осуществления замещенные остатки появляются на доступных сайтах антитела. Посредством замещения этих остатков цистеином реакционноспособные тиольные группы позиционируются тем самым на доступных сайтах антитела и могут использоваться для конъюгирования антитела с другими остатками, такими как остатки лекарственных средств или остатки линкер-лекарственное средство, для создания иммуноконъюгата, как дополнительно описывается в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления любые один или несколько из следующих остатков могут быть замещены цистеином: V205 (нумерация Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация ЕС) тяжелой цепи и S400 (нумерация ЕС) Fc области тяжелой цепи.

Полученные с помощью геной инженерии цистеиновые антитела могут генерироваться, как описано, например, в патенте США № 7521541.

e) Производные антител.

В определенных вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, может дополнительно модифицироваться, чтобы оно содержало дополнительные небелковые остатки, которые известны в данной области и являются легкодоступными. Остатки, пригодные для дериватизации антитела, включают, но не ограничиваясь этим, водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но не ограничиваясь этим, полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоль/пропиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилен/малеиновый ангидрид, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо неупорядоченные сополимеры) и декстран или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры пропиленпропиленоксид/этиленоксид, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерол), поливиниловый спирт и их смеси.

Проциональдегид полиэтиленгликоля может иметь преимущества при производстве, благодаря его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным.

Количество полимеров, присоединенных к антителу, может изменяться, и если присоединено больше одного полимера, они могут представлять собой одинаковые или различные молекулы. Как правило, количество и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, может определяться на основе соображений, включающих, но не ограничиваясь этим, конкретные свойства или функции антитела, которые должны быть улучшены, то, будет ли производное антитела использоваться в терапии при определенных состояниях, и т.п.

В другом варианте осуществления предлагаются конъюгаты антитела и небелкового остатка, которые могут селективно нагреваться при экспонировании для излучения. В одном из вариантов осуществления небелковый остаток представляет собой углеродную нанотрубку (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005)). Излучение может иметь любую длину волны, и они включают, но не ограничиваясь этим, длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают небелковый остаток до такой температуры, при которой клетки, находящиеся рядом с антителом-небелковым остатком, погибают.

В. Рекомбинантные способы и композиции.

Антитела могут продуцироваться с использованием рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. В одном из вариантов осуществления предлагается изолированная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело анти-TfR, описанное в настоящем документе. Такая нуклеиновая кислота может кодировать последовательность аминокислот, содержащую VL, и/или последовательность аминокислот, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). В другом варианте осуществления предлагаются один или несколько векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такую нуклеиновую кислоту. В другом варианте осуществления

предлагается клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном из таких вариантов осуществления клетка-хозяин содержит (например, трансформируется с его помощью): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует последовательность аминокислот, содержащую VL антитела, и последовательность аминокислот, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует последовательность аминокислот, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует последовательность аминокислот, содержащую VH антитела. В одном из вариантов осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидную клетку (например, клетку Y0, NS0, Sp20). В одном из вариантов осуществления предлагается способ получения антитела анти-TfR, где способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как приведено выше, при условиях, пригодных для экспрессирования антитела, и необязательно, извлечение антитела из клетки-хозяина (или культурной среды клетки-хозяина).

Для рекомбинантного продуцирования антитела анти-TfR, нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, например, как описано выше, изолируется и вставляется в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессирования в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может легко быть изолирована и секвенирована с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Клетки-хозяева, пригодные для клонирования или экспрессирования векторов, кодирующих антитело, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем документе. Например, антитела могут продуцироваться в бактериях, в частности, когда не нужны гликозилирование и Fc эффекторная функция. Относительно экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактерии, см., например, патенты США №№ 5648237, 5789199 и 5840523. (См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, которая описывает экспрессирование фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессирования антитело может изолироваться из пасты бактериальных клеток в виде растворимой фракции и может дополнительно очищаться.

В дополнение к прокариотам эукариотические микробы, такие как нитевидные грибки или дрожжи, являются пригодными для использования хозяевами для клонирования или экспрессирования векторов, кодирующих антитело, включая штаммы грибов и дрожжей, где пути гликозилирования являются "германизированными", что дает в результате продуцирование антитела со структурой гликозилирования, которая частично или полностью соответствует человеку. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Клетки хозяева пригодные для экспрессирования гликозилированного антитела также получают из многоклеточных организмов (беспозвоночных животных и позвоночных животных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и клетки насекомых. Идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые могут использоваться в связи с клетками насекомых, в частности, для трансфицирования клеток *Spodoptera frugiperda*.

Культуры клеток растений также могут использоваться в качестве хозяев. См., например, патенты США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описывающие методику PLANTIBODIES™ для продуцирования антител в трансгенных растениях).

Клетки позвоночных можно также использовать в качестве хозяев. Например, полезными могут быть линии клеток млекопитающих, которые адаптированы для роста в суспензии. Другие примеры полезных линий клеток хозяев млекопитающих представляют собой линию клеток CV1 почек обезьян, трансформированную посредством SV40 (COS-7); линию клеток почек эмбриона человека (293 или клетки 293, как описано, например, в Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детеныша хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (клетки TM4, как описано, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (CV1); клетки почек африканской зеленой обезьяны (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почек собачьих (MDCK); клетки печени крысы баффало (BRL 3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather et al., *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другие полезные линии клеток хозяев млекопитающих включают клетки яичников китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR<sup>+</sup>CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)) и линии клеток шелкомоты, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Относительно обзора определенных линий клеток хозяев млекопитающих пригодных для продуцирования антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

#### С. Анализы.

Антитела анти-TfR, предложенные в настоящем документе, могут идентифицироваться, просматриваться или характеризоваться относительно их физических/химических свойств и/или биологических активностей с помощью разнообразных анализов, известных в данной области.

### 1. Анализ связывания и другие анализы.

Доступны разнообразные методики для определения связывания антитела с TfR. Один из таких анализов представляет собой иммуносорбентный анализ с помощью связанного фермента (ELISA) для подтверждения способности связывания с TfR человека (и с антигеном головного мозга). В соответствии с этим анализом планшеты, покрытые антигеном (например, рекомбинантным TfR), инкубируют вместе с образцом, содержащим антитело анти-TfR, и определяют связывание антитела с антигеном, представляющим интерес.

В одном из аспектов антитело по настоящему изобретению исследуют относительно его активности связывания антигена, например, с помощью известных способов, таких как ELISA, Western blot и т.п.

В другом аспекте можно использовать конкурентные анализы для идентификации антитела, которое конкурирует с любым из антител по настоящему изобретению за связывание с TfR. В определенных вариантах осуществления такое конкурирующее антитело связывается с таким же эпитопом (например, с линейным или конформационным эпитопом), как связан с любым из антител по настоящему изобретению, более конкретно, с любым из эпитопов, специфично связанных с антителами в классе I, классе II, классе III или классе IV, как описано в настоящем документе (см., например, пример 1 и табл. 4). Подробные иллюстративные способы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, приведены в Morris (1996) "Epitop Mapping Protocols", in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

В иллюстративном конкурентном анализе иммобилизованный TfR инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с TfR (например, одно или несколько из антител, описанных в настоящем документе), и второе немеченое антитело, которое исследуют на его способность конкурировать с первым антителом за связывание с TfR. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный TfR инкубируется в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе немеченое антитело. После инкубирования при условиях, дающих возможность для связывания первого антитела с TfR, избыток несвязанного антитела удаляют и измеряют количество метки, связанное с иммобилизованным TfR. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным TfR, существенно уменьшается в исследуемом образце по сравнению с контрольным образцом, это показывает, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с TfR. См. Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

### 2. Анализы активности.

В одном из аспектов предлагаются анализы для идентификации антител анти-TfR, имеющих биологическую активность. Биологическая активность может включать, например, перенос соединения, ассоциированного/конъюгированного с антителом, через BBB в головной мозг и/или CNS. Также предлагаются антитела, имеющие такую биологическую активность *in vivo* и/или *in vitro*.

В определенных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению исследуется на такую биологическую активность.

### D. Иммуноконъюгаты.

Настоящее изобретение также предлагает иммуноконъюгаты, содержащие антитело анти-TfR по настоящему документу, конъюгированное с одним или несколькими цитотоксичными агентами, такими как химиотерапевтические агенты или лекарственные средства, агенты для ингибирования роста, токсины (например, белковые токсины, ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивные изотопы.

В одном из вариантов осуществления антитело анти-TfR по настоящему документу связано с лекарственным средством против неврологического расстройства, химиотерапевтическим агентом и/или агентом для получения изображений для более эффективного переноса лекарственного средства, химиотерапевтического агента и/или радиофармацевтического средства через BBB.

Ковалентное конъюгирование может быть либо прямым, либо через линкер. В определенных вариантах осуществления прямое конъюгирование осуществляется посредством конструирования белка слияния (т.е. посредством генетического слияния двух генов, кодирующих антитело анти-TfR, и, например, лекарственное средство против неврологического расстройства, и экспрессирования их в виде одного белка). В определенных вариантах осуществления прямое конъюгирование осуществляется посредством образования ковалентной связи между реакционноспособной группой на одной из двух частей антитела анти-TfR и соответствующей группой или акцептором, например, на неврологическом лекарственном средстве. В определенных вариантах осуществления прямое конъюгирование осуществляется посредством модифицирования (т.е. генетического модифицирования) одной из двух молекул, которые должны конъюгироваться, для включения реакционноспособной группы (в качестве неограничивающих примеров, сульфгидрильной группы или карбоксильной группы), которая образует ковалентное присоединение к другой молекуле, которая должна конъюгироваться, при соответствующих условиях. В качестве одного из неограничивающих примеров молекула (например, аминокислота) с желаемой реакционноспособной группой (например, цистеиновым остатком) может вводиться в антитело анти-TfR, и образуется дисульфидная связь, например, с неврологическим лекарственным средством. Способы ковалентного конъюги-

рования нуклеиновых кислот с белками также известны в данной области (т.е. фотосвязывание, см., например, Zatsepin et al. Russ. Chem. Rev. 74:77-95 (2005)).

Нековалентное конъюгирование может представлять собой любые средства нековалентного присоединения, включая гидрофобные связи, ионные связи, электростатические взаимодействия и т. п., как можно легко понять специалисту в данной области.

Конъюгирование также может осуществляться с использованием разнообразных линкеров. Например, антитело анти-TfR и неврологическое лекарственное средство могут конъюгироваться с использованием различных бифункциональных белковых связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидозэфиров (таких как диметилладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), бис-диазониевые производные (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол).

Например, рициновый иммунотоксин может быть приготовлен, как описано в Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Меченая углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилтриамипентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой иллюстративный хелатирующий агент для конъюгирования радиоактивного нуклеотида с антителом. См. WO 94/11026. Пептидные линкеры, состоящие из одной-двадцати аминокислот, соединенных пептидными связями, также могут использоваться. В определенных таких вариантах осуществления аминокислоты выбираются из двадцати встречающихся в природе аминокислот. В определенных других таких вариантах осуществления одна или несколько аминокислот выбираются из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. Линкер может представлять собой "отщепляемый линкер", облегчающий высвобождение неврологического лекарственного средства при доставке в головной мозг. Можно использовать, например, кислотнo-лабильный линкер, пептидазочувствительный линкер, фотоллабильный линкер, диметиловый линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); патент США № 5208020).

Настоящее изобретение в явном виде рассматривает, но не ограничиваясь этим, конъюгаты, полученные с помощью кросс-линкерных реагентов, включая, но не ограничиваясь этим, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые являются коммерчески доступными (например, от Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., USA).

В одном из вариантов осуществления иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в котором антитело конъюгируется с одним или несколькими лекарственными средствами, включая, но не ограничиваясь этим, майтансиноид (см. патенты США №№ 5208020, 5416064 и европейский патент EP 0425235 B1); ауристин, такой как остатки DE и DF лекарственного средства монометилауристинина (MMAE и MMAF) (см. патенты США №№ 5635483 и 5780588 и 7498298); доластатин; калихимидин или его производное (см. патенты США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 и 5877296; Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); и Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубицин (см. Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002); и патент США № 6630579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксель, паклитаксель, ларотаксель, тезетаксель и ортатаксель; трихотхедин и CC1065.

В другом варианте осуществления иммуноконъюгат содержит антитело, как описано в настоящем документе, конъюгированное с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая, но не ограничиваясь этим, цепь А дифтерии, несвязывающиеся активные фрагменты токсина дифтерии, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модециина,  $\alpha$ -сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *mordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *saraoparia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

В другом варианте осуществления иммуноконъюгат содержит антитело, как описано в настоящем документе, конъюгированное с радиоактивным атомом с образованием радиоактивного конъюгата. Доступны разнообразные радиоактивные изотопы для получения радиоактивных конъюгатов. Примеры включают  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  и радиоактивные изотопы Lu. Когда для детектирования используют радиоактивный конъюгат, он может содержать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например  $^{99m}Tc$  или  $I^{123}$ , или спиновую метку для получения изображений с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известного как магнитная резонансная томография, MRI), такую, опять же, как йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Е. Способы и композиции диагностики и детектирования.

В определенных вариантах осуществления любое из антител анти-TfR, предложенных в настоящем документе, являются полезными для детектирования присутствия TfR в биологическом образце. Термин "детектирование", как используется в настоящем документе, охватывает количественное или качественное детектирование. В определенных вариантах осуществления биологический образец содержит клетку или ткань, например кровь (например, незрелые эритроциты), CSF и ткань, содержащую ВВВ.

В одном из вариантов осуществления предлагается антитело анти-TfR для использования в способе диагностики или детектирования. В другом аспекте предлагается способ детектирования присутствия TfR в биологическом образце. В определенных вариантах осуществления способ включает вступление в контакт биологического образца с антителом анти-TfR, как описано в настоящем документе, при условиях, дающих возможность для связывания антитела анти-TfR с TfR и для детектирования того, образуется ли комплекс между антителом анти-TfR и TfR. Такой способ может представлять собой способ *in vitro* или *in vivo*. В одном из вариантов осуществления антитело анти-TfR используется для выбора субъектов, пригодных для терапии с помощью антитела анти-TfR, например, когда TfR представляет собой биомаркер для выбора пациентов.

Иллюстративные расстройства, которые могут диагностироваться с использованием антитела по настоящему изобретению, включают расстройства с участием незрелых эритроцитов, благодаря тому факту, что TfR экспрессируется в ретикулоцитах и по этой причине является детектируемым с помощью любых антител по настоящему изобретению. Такие расстройства включают анемию и другие расстройства, возникающие из-за пониженных уровней ретикулоцитов, или врожденную полицитемию или истинную неопластическую полицитемию, где повышенные количества эритроцитов из-за гиперпролиферации, например ретикулоцитов, дает в результате загущение крови и сопутствующие физиологические симптомы.

В определенных вариантах осуществления предлагаются меченые антитела анти-TfR. Метки включают, но не ограничиваясь этим, метки или остатки, которые детектируются непосредственно (например, флуоресцентные, хромофорные, электронно-оплотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также такие остатки, как ферменты или лиганды, которые детектируются опосредованно, например, с помощью ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Иллюстративные метки включают, но не ограничиваясь этим, радиоизотопы  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  и  $^{131}\text{I}$ , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных металлов или флуоресцеин и их производные, родамин и его производные, данзил, умбеллиферон, люциферазы, например люциферазу светлячков и бактериальную люциферазу (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу, глюкоамилазу, лизозим, сахаридоксидазы, например глюкозаоксидазу, галактозаоксидазу и глюкоза-6-фосфатдегидрогеназу, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантиноксидаза, связанные с ферментом, который использует перекись водорода для окисления предшественника красителя, такого как HRP, лактопероксидазу или микропероксидазу, биотин/авидин, спиновые метки, бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы и т.п.

В одном из вариантов осуществления у интактного антитела отсутствует эффекторная функция. В другом варианте осуществления интактное антитело имеет пониженную эффекторную функцию. В другом варианте осуществления интактное антитело получают с помощью генной инженерии, чтобы оно имело пониженную эффекторную функцию. В одном из аспектов антитело представляет собой Fab. В другом аспекте антитело имеет одну или несколько Fc мутаций, уменьшающих или устраняющих эффекторную функцию. В другом аспекте антитело имеет модифицированное гликозилирование, например, благодаря продуцированию антитела в системе, в которой отсутствуют нормальные ферменты гликозилирования человека. В другом аспекте основная цепь Ig модифицируется до цепи, которая естественным образом обладает пониженной эффекторной функцией или вообще ее не имеет.

Доступны разнообразные методики для определения связывания антитела с TfR. Один из таких анализов представляет собой иммуносорбентный анализ с помощью связанного фермента (ELISA) для подтверждения способности к связыванию с TfR человека (и с антигеном головного мозга). В соответствии с этим анализом планшеты, покрытые антигеном (например, рекомбинантным TfR), инкубируются вместе с образцом, содержащим антитело анти-TfR, и определяется связывание антитела с антигеном, представляющим интерес.

Анализ для оценки потребления системно вводимого антитела и другой биологической активности антитела могут осуществляться, как описано в примерах или как известно для антитела антиантген CNS, представляющего интерес.

В одном из аспектов предлагаются анализы для идентификации антител анти-TfR, конъюгированных (либо ковалентно, либо нековалентно) с антителами анти-BACE1, имеющими биологическую активность. Биологическая активность может включать, например, ингибирование активности аспартилпротеазы BACE1. Также предлагаются антитела, имеющие такую же биологическую активность *in vivo* и/или *in vitro*, например, как оценивается с помощью гомогенного флуоресцентного анализа HTRF с разрешением по времени или микрогидродинамического капиллярного электрофоретического анализа (MCE) с использованием синтетических пептидов в качестве субстрата или *in vivo* в линиях клеток, ко-

торые экспрессируют субстраты BACE1, такие как APP.

#### F. Фармацевтические препараты.

Фармацевтические препараты для анти-TfR, как описано в настоящем документе, приготавливают посредством смешивания такого антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются, как правило, нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничиваясь этим, буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид; гексаметонийхлорид; бензалконийхлорид, бензетонийхлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (меньше примерно, чем 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глютамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; формирующие соли противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG). Иллюстративные фармацевтически приемлемые носители по настоящему документу дополнительно включают агенты для диспергирования лекарственных средств в кишечнике, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например растворимые гликопротеины гиалуронидазы человека PH-20, такие как gHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Определенные иллюстративные sHASEGPs и их способы использования, включая gHuPH20, описаны в публикациях патентов США № 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном из аспектов sHASEGP объединяется с одной или несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

Иллюстративные лиофилизированные препараты антитела описаны в патенте США № 6267958. Водные препараты антитела включают те, которые описаны в патенте США № 6171586 и в WO 2006/044908, последние препараты включают гистидин-ацетатный буфер.

Препарат по настоящему документу может также содержать несколько активных ингредиентов, как необходимо для конкретного показания, которое лечится, предпочтительно ингредиентов с комплементарными активностями, которые не влияют отрицательно друг на друга. Например, было бы желательным предложить один или несколько активных ингредиентов для лечения невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, расстройства глазного заболевания, эпилептического расстройства, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения или воспаления CNS. Такие иллюстративные лекарственные препараты обсуждаются в настоящем документе ниже. Такие активные ингредиенты присутствуют соответствующим образом в сочетании, в количествах, которые являются эффективными для предполагаемой цели.

Активные ингредиенты могут быть захвачены в приготовленные микрокапсулы, например, с помощью методик коацервации, или посредством полимеризации на границе раздела, например, микрокапсул из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и поли(метилметакрилатных) микрокапсул, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, в липосомах, альбуминовых микроэмульсиях, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие методики описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Один или несколько активных ингредиентов могут инкапсулироваться в липосомах, которые соединены антителами анти-TfR, описанными в настоящем документе (см., например, публикацию заявки на патент США № 20020025313).

Могут быть приготовлены препараты с задержкой высвобождения. Соответствующие примеры препаратов с задержкой высвобождения включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, эти матрицы имеют форму формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Неограничивающие примеры матриц с задержкой высвобождения включают сложные полиэфир, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат) или поли(виниловый спирт)), полиактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и  $\gamma$ -этил-L-глутамата, недеградируемый этиленвинилацетат, деградируемые сополимеры молочная кислота-гликолевая кислота, такие как LUPRON DEPOT™ (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочная кислота-гликолевая кислота и леупролида ацетата) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Препараты, которые должны использоваться для введения *in vivo*, как правило, являются стерильными. Стерильность может быть легко получена, например, с помощью фильтрования через мембраны для стерильного фильтрования.

### Г. Терапевтические способы и композиции.

Любое из антител анти-TfR, предложенных в настоящем документе, можно использовать в терапевтических способах. В одном из аспектов предлагается антитело анти-TfR для применения в качестве лекарственного препарата. Например, настоящее изобретение предлагает способ переноса терапевтического соединения через гематоэнцефалический барьер с уменьшением или устранением влияния на популяции эритроцитов, включающий экспонирование антитела анти-TfR, связанного с терапевтическим соединением (например, мультиспецифичного антитела, которое связывается как с TfR, так и с антигеном головного мозга), для BBB таким образом, что антитело переносит терапевтическое соединение, связанное с ним, через BBB. В другом примере настоящее изобретение предлагает способ переноса лекарственного средства против неврологического расстройства через гематоэнцефалический барьер, включающий экспонирование антитела анти-TfR по настоящему изобретению, связанного с лекарственным средством против расстройства головного мозга (например, мультиспецифичного антитела, которое связывается как с TfR, так и с антигеном головного мозга), для BBB таким образом, что антитело переносит лекарственное средство против неврологического расстройства, связанное с ним, через BBB с уменьшением или устранением влияния на популяции эритроцитов. В одном из вариантов осуществления BBB имеется у млекопитающего (например, человека), например, такого, которое имеет неврологическое расстройство, включая, без ограничения: болезнь Альцгеймера (AD), инсульт, деменцию, мышечную дистрофию (MD), множественный склероз (MS), боковой амиотрофический склероз (ALS), кистозный фиброз, синдром Эйнджелмена, синдром Лиддла, болезнь Паркинсона, болезнь Пика, болезнь Педжета, рак, травматическое повреждение головного мозга и т.п.

В одном из вариантов осуществления неврологическое расстройство выбирается из невропатического расстройства, амилоидоза, рака (например, включая рак CNS или рак головного мозга), глазного заболевания или расстройства, вирусной или микробной инфекции, воспаления (например, CNS или головного мозга), ишемии, нейродегенеративного заболевания, эпилепсии, расстройства поведения, лизосомной болезни накопления и т.п. Антитела по настоящему изобретению являются особенно полезными для лечения таких неврологических расстройств благодаря их способности переносить один или несколько ассоциированных активных ингредиентов/связанных терапевтических соединений через BBB и в CNS/головной мозг, где такие расстройства находят их молекулярную, клеточную или вирусную/микробную основу.

Невропатические расстройства представляют собой заболевания или нарушения нервной системы, отличающиеся несоответствующей или неконтролируемой передачей нервных сигналов или ее отсутствием, и включают, но не ограничиваясь этим, хроническую боль (включая ноцицептивную боль), боль, вызываемую повреждением тканей организма, включая боль, связанную с раком, невропатическую боль (боль, вызываемую нарушениями в нервах, спинном мозге или в головном мозге) и психогенную боль (полностью или по большей части связанную с психологическим расстройством), цефалгию, мигрень, невропатию и симптомы и синдромы, часто сопровождающие невропатические расстройства, такие как головокружение или тошнота.

Для невропатического расстройства, может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой анальгетик, включая, но не ограничиваясь этим, наркотический/опиоидный анальгетик (т.е. морфин, фентанил, гидрокодон, меперидин, метадон, оксиморфон, пентазоцин, пропоксифен, трамадол, кодеин и оксикодон), нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (NSAID) (т.е. ибупрофен, напроксен, диклофенак, дифлунизал, этодолак, фенпрофен, флурбипрофен, индометацин, кеторолак, мефенамовую кислоту, мелоксикам, набуметон, оксапрозин, пироксикам, сулиндак и толметин), кортикостероид (т.е. кортизон, преднизон, преднизолон, дексаметазон, метилпреднизолон и триамцинолон), агент против мигрени (т.е. суматриптин, алмотриптам, фроватриптам, суматриптам, ризатриптам, элетриптам, золмитриптам, дигидроэрготамин, элетриптам и эрготамин), ацетаминофен, салицилат (т.е. аспирин, холин салицилат, магний салицилат, дифлунизал и салсалат), антиконвульсант (т.е. карбамазепин, клоназепам, габапентин, ламотригин, прегабалин, тиагабин и топирамат), болеутоляющие средства (т.е. изофлуран, трихлорэтилен, галотан, севофлуран, бензокаин, хлорпрокаин, кокаин, циклометикаин, диметоксаин, пропоксикаин, прокаин, новокаин, пропараксаин, тетракаин, артикаин, бупивакаин, картикаин, цинхокаин, этидокаин, левобупивакаин, лидокаин, мепивакаин, пиперокаин, прилокаин, ропивакаин, тримекаин, сакситоксин и тетродотоксин) и ингибитор соx-2 (т.е. целококсиб, рофекоксиб и валдекоксиб). Для невропатического расстройства с головокружениями может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой агент против головокружения, включая, но не ограничиваясь этим, меклизин, дифенгидрамин, прометазин и диазепам. Для невропатического расстройства с тошнотой, может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой агент против тошноты, включая, но не ограничиваясь этим, прометазин, хлорпромазин, прохлорпемазин, триметобензамид и метоклопрамид.

Амилоидозы представляют собой группу заболеваний и расстройств, связанных с внеклеточными белковыми отложениями в CNS, включая, но не ограничиваясь этим, вторичный амилоидоз, возрастной амилоидоз, болезнь Альцгеймера (AD), умеренные когнитивные нарушения (MCI), деменцию с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное кровоизлияние в мозг с амилоидозом (голландского типа); Гуам-

ский комплекс болезнь Паркинсона деменция, церебральную амилоидную ангиопатию, болезнь Хантингтона, прогрессирующий супрануклеарный паралич, множественный склероз; болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, трансмиссивную губчатую энцефалопатию, деменцию, связанную с ВИЧ, амиотропный латеральный склероз (ALS), миозит с включенными тельцами (IBM) и глазные заболевания, связанные с отложениями  $\beta$ -амилоидов (т.е. дистрофию желтого пятна, связанную с друзами невропатию зрительного нерва и катаракту).

Против амилоидоза может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое включает, но не ограничиваясь этим, антитело или другую связывающуюся молекулу (включая, но не ограничиваясь этим, малую молекулу, пептид, аптамер или другой белковый связывающий агент), которая специфично связывается с мишенью, выбранной из  $\beta$ -секретазы, тау, презенилина, белка предшественника амилоида или его частей, пептида  $\beta$ -амилоида или их олигомеров или фибрилл, репептора гибели 6 (DR6), рецептора конечных продуктов усиленного гликозилирования (RAGE), паркина и хантингтина; ингибитор холинэстеразы (т.е. галантамин, донепезил, ривастигмин и такрин); антагонист рецептора NMDA (т.е. мемантин), деплетор моноамина (т.е. тетрабенезин); эрголоид мезилат; антихолинергический антипаркинсонический агент (т.е. проклидин, дифенгидрамин, тригексилфенидил, бензтропин, бипериден и тригексилфенидил); дофаминергический антипаркинсонический агент (т.е. энтакапон, селегилин, прамипексол, бромкриптин, ротиготин, селегилин, ропинирол, расагилин, апоморфин, карбидопа, леводопа, перголид, толкапон и амантадин); тетрабенезин; противовоспалительное лекарственное средство (включая, но не ограничиваясь этим, нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (т.е. индометацин и другие соединения, перечисленные выше); гормон (т.е. эстроген, прогестерон и леупролид); витамин (т.е. фолат и никотинамид); димеболин; гомотаурин (т.е. 3-аминопропансульфоновую кислоту; 3 APS); модулятор активности рецепторов серотонина (т.е. ксалипроден); интерферон и глюкокортикоид.

Раковые заболевания CNS отличаются аберрантной пролиферацией одной или нескольких клеток CNS (т.е. нервных клеток) и включают, но не ограничиваясь этим, глиому, глиобластому мультиформ, менингиому, астроцитому, невриному слухового нерва, хондрому, олигодендроглиому, медуллобластому, ганглиоглиому, шванному, нейрофибромому, нейробластому и экстрадуральные, интрамедуллярные или интрадуральные опухоли.

Против рака может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой химиотерапевтический агент. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид CYTOXAN®; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамида, триэтилендиофосфор-амид и триметилломеламин; ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабиол (дронабинол, MARINOL®);  $\beta$ -лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSA ®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистагин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотные горчицы, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамм, мехлоретамм оксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловую горчицу; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихимицин, в частности калихимицин гамма I и калихимицин омега II (см., например, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))); динемидин, включая динемидин A; эсперамицин; а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые энединовые антибиотические хромофоры), аклациномизины, актиномицины, аутрамицин, азасерин, блеомицины, сактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин ADRIAMYCIN® (включая морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и диоксидоксорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин C, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромидин, хеламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, триамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, фиоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепитиостан, тестостерон; агенты против опухоли надпочечников, такие как аминок, митотан, трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновую кислоту; энилу-

рацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазихинон; элфорнитин; эллиптиний ацетат; эпотилон; этоглоцид; галлий нитрат; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтансиноиды, такие как майтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лосоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, IL, ИЛИ); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиохон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндесин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); тиотепа; таксоиды, например паклитаксель TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), не содержащий кремофора ABRAXANETM, полученный с помощью генной инженерии препарат паклитакселя в наночастицах альбумина (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) и доксетаксель TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); хлоранбуцил; генцитабин (GEMZAR®); 6-тиогуанин; меркатопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин (VELBAN®); платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин (ONCOVIN®); оксалиплатин; лейкововин; винорельбин (NAVELBINE®); новатрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин (XELODA®); фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из указанных выше соединений; а также сочетания двух или более из указанных выше соединений, такие как СНОР, сокращенное наименование препарата для сочетанной терапии из циклофосфида, доксорубина, винкрестина и преднизолона, и FOLFOX, сокращенное наименование для режима лечения с помощью оксалиплатина (ELOXATF TM), объединенного с 5-FU и лейкововином.

В это определение также включаются химиотерапевтические агенты, которые представляют собой антигормональные агенты, которые действуют для регуляции, уменьшения, блокировки или ингибирования воздействия гормонов, которые могут способствовать росту рака и часто имеют форму системного или предназначенного для лечения организма в целом препарата. Они сами могут представлять собой гормоны. Примеры включают антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогенов (SERM), включая, например, тамоксифен (включая тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен EVISTA®, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, опаристон и торемифен FARESTON®; антипрогестероны; даун-регуляторы рецепторов эстрогенов (ERD); агенты, которые функционируют для подавления или выключения яичников, например агонисты гормона, высвобождающего леутизирующий гормон (LHRH), такие как леупролид ацетат LUPRON® и ELIGARD®, гозерелин ацетат, бусерелин ацетат и триптерелин; другие антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; и ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, который регулирует продуцирование эстрогенов в надпочечниках, такие, например, как 4(5)-имидазолы, аминоглутетимид, мегестрол ацетат MEGASE®, экземестан AROMASIN®, форместание, фадрозол, ворозол RIVISOR®, летрозол FEMARA® и анастрозол ARIMIDEX®. В дополнение к этому такое определение химиотерапевтических агентов включает бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат DIDROCAL®, NE-58095, золедроновую кислоту/золедронат ZOMETA®, алендронат FOSAMAX®, памидронат AREDIA®, тилудронат SKELID® или ризедронат ACTONEL®; а также троксацитабин (аналог 1,3-диоксолан нуклеозида цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности те, которые ингибируют экспрессирование генов в путях передачи сигналов, участвующих в aberrантной пролиферации клеток, такие, например, как PKC-α, Raf, H-Ras и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина THERATOPE® и вакцины для генной терапии, например вакцина ALL-OVECTF®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы 1 LURTOTECAN®; gmRH ABARELIX®; лапатиниб дитозилат (двойной низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы ErbB-2 и EGFR, также известный как GW572016) и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из указанных выше соединений.

Другая группа соединений, которые могут быть выбраны в качестве неврологических лекарственных средств для лечения или предотвращения рака, представляют собой противораковые иммуноглобулины (включая, но не ограничиваясь этим, транстузумаб, петузумаб, бевацизумаб, алемтуксумаб, цетуксимаб, гемтузумаб озогаминин, ибритумомаб тиуксетан, панитумаб и ритуксимаб). В некоторых случаях антитела в конъюгировании с токсичной меткой или конъюгатом можно использовать для нацеливания и уничтожения желаемых клеток (т.е. раковых клеток), включая, но не ограничиваясь этим, тозитумомаб вместе с радиоизотопной меткой <sup>131</sup>I или транстузумаб эмтанзин.

Глазные заболевания или расстройства представляют собой заболевания или расстройства глаз, которые для целей настоящего документа считаются органами CNS, отделенными с помощью BBB. Глазные заболевания или расстройства включают, но не ограничиваясь этим, расстройства склеры, роговицы, радужной оболочки и ресничного тела (т.е. склерит, кератит, язву роговицы, эрозию роговицы, снежную слепоту, ожог глаз, поверхностный точечный кератит Тайджесона, неоваскуляризацию роговицы, дистрофию Фукса, кератоконус, сухой кератоконъюнктивит, воспаления радужной оболочки глаза и увеи-

ты), расстройства хрусталика (т.е. катаракту), расстройства сосудистой оболочки и сетчатки глаза (т.е. отслоение сетчатки, ретиношизис, гипертоническую ретинопатию, диабетическую ретинопатию, ретинопатию, ретинопатию недоношенных, возрастную дистрофию желтого пятна, дистрофию желтого пятна (влажную или сухую), эпиретинальную мембрану, пигментную дистрофию сетчатки и макулярный отек), глаукому, плавающее помутнение, расстройства зрительного нерва и зрительных путей (т.е. наследственную нейропатию зрительного нерва Лебера и друзы диска зрительного нерва), расстройства глазных мышц/аккомодации/рефракции бинокулярного движения (т.е. косоглазие, офтальмопарез, прогрессирующую внешнюю офтальмоплегию, эзотропию, экзотропию, дальнорукость, близорукость, астигматизм, анизометропию, старческую дальнорукость и паралич глазных мышц), расстройства зрения и медицинскую слепоту (т.е. амблиопию, наследственный амвроз Левера, скотому, цветовую слепоту, полную цветовую слепоту, никталопию, медицинскую слепоту, речную слепоту и микроофтальмию/колобому), красный глаз, зрачок Аргилла Робертсона, кератомикоз, ксерофтальмию и анданиридию.

Против глазного заболевания или расстройства может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой антиангиогенный офтальмологический агент (т.е. бевацизумаб, ранибизумаб и пегаптаниб), офтальмологический агент против глаукомы (т.е. карбахол, эпинефрин, демкарыйбромид, апраклонидин, бримонидин, бринзоламид, левобунолол, тимолол, бетаксол, дорзоламид, биматопрост, картеолол, метипранолол, дипивефрин, травопрол и латанопрост), ингибитор угольной ангидразы (т.е. метазоламид и ацетазоламид), офтальмологическое антигистаминное средство (т.е. нафазолин, фенилэфрин и тетрагидрозолин), смазывающее вещество для глаз, офтальмологический стероид (т.е. фторметолон, преднизолон, лотепреднол, дексаметазон, дифлупреднат, римексолон, флуоцинолон, медризон и триамцинолон), офтальмологический анестетик (т.е. лидокаин, пропаракан и тетракаин), офтальмологическое противомикробное средство (т.е. левофлоксацин, гатифлоксацин, цiproфлоксацин, моксифлоксацин, хлорамфеникол, бацитрацин/полимиксин b, сульфацил, тобрамицин, азитромицин, безифлоксацин, норфлоксацин, сульфизоксазол, гентамицин, идоксуридин, эритромицин, натамицин, грамицидин, неомицин, офлоксацин, трифлуридин, ганцикловир, видарабин), офтальмологический противовоспалительный агент (т.е. нерафенак, кеторолак, флурбипрофен, супрофен, циклоспорин, триамцинолон, диклофенак и бромфенак) и офтальмологическое антигистаминное средство или деконгестант (т.е. кетотифен, олопатадин, эпинастин, нафазолин, кромолин, тетрагидрозолин, пемиролас, бепотастин, нафазолин, фенилэфрин, недокромил, лодоксамид, фенилэфрин, эмедастатин и азеластин).

Вирусные или микробные инфекции CNS включают, но не ограничиваясь этим, инфекции вирусом (т.е. гриппа, ВИЧ, вируса полиомиелита, краснухи), бактерий (т.е. *Neisseria sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, *E. coli*, *S. aureus*, *Pneumococcus sp.*, *Meningococcus sp.*, *Haemophilus sp.* и *Mycobacterium tuberculosis*) и других микроорганизмов, таких как грибки (т.е. дрожжи, *Cryptococcus neoformans*), паразитов (т.е. *Toxoplasma gondii*), или амёб, приводящие в результате к патологическим изменениям CNS, включая, но не ограничиваясь этим, менингит, энцефалит, миелит, васкулит и абсцесс, которые могут быть острыми или хроническими.

Против вирусного или микробного заболевания может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое включает, но не ограничиваясь этим, противовирусное соединение (включая, но не ограничиваясь этим, адамантановое противовирусное лекарственное средство (т.е. римантадин и амантадин), противовирусный интерферон (т.е. пегинтерферон  $\alpha$ -2b), антагонист рецептора хемокинов (т.е. маравирок), ингибитор переноса цепи интегразы (т.е. ралтегравир), ингибитор нейраминидазы (т.е. озельтамивир и занамивир), нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (т.е. эфавиренз, этравирин, делавирдин и невирапин), нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (тенофовир, абакавир, ламивудин, зидовудин, ставудин, энтекавир, эмтрицитабин, адефовир, зальцитабин, тельбивудин и дидазотин), ингибитор протеазы (т.е. дарунавир, атазанавир, фосампренавир, типранавир, ритонавир, нелфинавир, ампренавир, индинавир и саквинавир), пуриновый нуклеозид (т.е. валацикловир, фамцикловир, ацикловир, рибавирин, ганцикловир, вальганцикловир и цидофовир) и разнообразные противовирусные лекарственные средства (т.е. энфувиртид, фоскарнет, паливизумаб и фомивирсен), антибиотик (включая, но не ограничиваясь этим, аминопенициллин (т.е. амоксициллин, ампициллин, оксациллин, нафциллин, клоксациллин, диклоксациллин, флуоксациллин, темоциллин, азлоциллин, карбенициллин, тикарциллин, мезлоциллин, пиперациллин и бакампициллин), цефалоспорины (т.е. цефазолин, цефалексин, цефалотин, цефамандол, цефтриаксон, цефотаксим, цефподоксим, цефтазидим, цефадроксил, цефрадин, лоракарбеф, цефотетан, цефуросим, цефрозил, цефаклор и цефокситин), карбапенем/пенем (т.е. имипенем, меропенем, эртапенем, фаропенем и дорипенем), монобактам (т.е. азтреонам, тигеноман, норкардицин A и табоксинин- $\beta$ -лактамы, ингибитор  $\beta$ -лактамазы (т.е. клавулановую кислоту, тазобактам и сульбактам) в конъюгировании с другим  $\beta$ -лактамовым антибиотиком, аминогликозид (т.е. амикацин, гентамицин, канамицин, неомицин, нетилмицин, стрептомицин, тобрамицин, и паромомицин), ансамицин (т.е. гелданамицин и гербимицин), карбацефем (т.е. лоракарбеф), гликопептиды (т.е. тейкопланин и ванкомицин), макролиды (т.е. азитромицин, клэритромицин, диритромицин, эритромицин, рокситромицин, троландомицин, телитромицин и спектиномицин), монобактам (т.е. азтреонам), хинолон (т.е. цiproфлокса-

цин, энноксацин, гатифлоксацин, левофлоксацин, ломефлоксацин, моксифлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, trovафлоксацин, грепафлоксацин, спарфлоксацин и темафлоксацин), сульфонамид (т.е. мафенид, сульфонамидохризоидин, сульфациетамид, сульфадиазин, сульфаметизол, сульфаниламид, сульфасалазин, сульфизоксазол, триметоприм, триметоприм и сульфаметоксазол), тетрациклин (т.е. тетрациклин, демеклоциклин, доксициклин, миноциклин и окситетрациклин), противоопухолевый или цитотоксичный антибиотик (т.е. доксорубин, митоксантрон, блеомицин, даунорубин, дактиномицин, эпирубицин, идарубин, пликамицин, митомицин, пентостатин и вальрубицин) и разнообразные антибактериальные соединения (т.е. бацитрацин, колистин и полимиксин В)), противогрибковые средства (т.е. метронидазол, нитазоксанид, тинидазол, хлорохин, йодхинол и паромомицин) и противопаразитарные средства (включая, но не ограничиваясь этим, хинин, хлорохин, амодиахин, пириметамин, сульфадоксин, прогунил, мефлохин, атовахон, примахин, артемезинин, галофантрин, доксициклин, клиндамицин, мебендазол, пирантел памоат, тиабендазол, диэтилкарбамазин, ивермектин, рифампин, амфотерицин В, мералсопрол, эфортинин и альбендазол). Воспаление CNS включает, но не ограничиваясь этим, воспаление, которое вызывается повреждением CNS, которое может представлять собой физическое повреждение (т.е. из-за несчастного случая, хирургической операции, травмы головного мозга, повреждения спинного мозга, сотрясения головного мозга) и повреждение, вызванное одним или несколькими другими заболеваниями или расстройствами CNS (т.е. абсцессом, раком, вирусной или микробной инфекцией) или связанное с ним.

Против воспаления CNS может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое соответствует самому воспалению (т.е. нестероидный противовоспалительный агент, такой как ибупрофен или напроксен), или такое, которое лечит причину воспаления (т.е. противовирусный или противоопухолевый агент).

Ишемия CNS, как используется в настоящем документе, относится к группе расстройств, относящихся к аберрантному кровотоку или сосудистому поведению в головном мозге или вызывающих его, и включает, но не ограничиваясь этим: местную ишемию головного мозга, общую ишемию головного мозга, инсульт (т.е. субарахноидальное кровоизлияние и внутримозговое кровоизлияние) и аневризму.

Против ишемии может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое включает, но не ограничиваясь этим, тромболитическое лекарственное средство (т.е. урокиназу, альтеплазу, ретеплазу и тенеклеплазу), ингибитор агрегации тромбоцитов (т.е. аспирин, цилостазол, клопидогрель, прасугрель и дипиридамола), статины (т.е. ловастатин, правастатин, флувастатин, розувастатин, аторвастатин, симвастатин, церивастатин и питавастатин) и соединение для улучшения кровотока или гибкости сосудов, включая, например, лекарственные препараты против повышенного кровяного давления.

Нейродегенеративные заболевания представляют собой группу заболеваний и расстройств, ассоциированных с потерей функций или гибелью нервных клеток в CNS, и включают, но не ограничиваясь этим, аденолейкодистрофию, болезнь Александра, болезнь Альпера, боковой амиотрофический склероз, атаксию-телеангиэктазию, болезнь Баттена, кокаиновый синдром, кортикобазальную дегенерацию, дегенерацию, вызываемую амилоидозом или ассоциированную с ним, атаксию Фридрейха, лобно-височную лобарную дегенерацию, болезнь Кеннеди, множественную системную атрофию, множественный склероз, первичный латеральный склероз, прогрессирующий супрануклеарный паралич, спинальную мышечную атрофию, поперечный миелит, болезнь Рефсума и спинально-церебеллярную атаксию.

Против нейродегенеративного заболевания может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой гормон роста или нейротрофический фактор; примеры включают, но не ограничиваясь этим, полученный из головного мозга нейротрофический фактор (BDNF), фактор роста нервных клеток (NGF), нейротрофин-4/5, фактор роста фибробластов (FGF)-2 и другие FGF, нейротрофин (NT)-3, эритропоэтин (EPO), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор эпидермального роста (EGF), трансформирующий фактор роста (TGF)-  $\alpha$ , TGF- $\beta$ , фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейртулин, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), херегулин, нейрегулин, артемин, персефин, интерлейкины, нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GFR), фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов (CSF), CSF гранулоцитов-макрофагов, нетрины, кардиотрофин-1, белки хеджегоги, ингибиторный фактор лейкемии (LIF), мидкин, плейотрофин, морфогенетические белки костей (BMP), нетрины, сапозины, семафорины и фактор стволовых клеток (SCF).

Заболевания эпилепсии и расстройства CNS включают несоответствующую и/или аномальную электропроводимость в CNS, и они включают, но не ограничиваясь этим, эпилепсию (т.е. малый эпилептический припадок, атонический припадок, доброкачественную детскую эпилепсию, ювенильный абсанс, клонические судороги, комплексные парциальные судороги, лобную эпилепсию, лихорадочные судороги, младенческие судороги, ювенильную миоклоническую эпилепсию, ювенильную абсансную эпилепсию, синдром Леннокса-Гасто, синдром Ландау-Клефнера, синдром Драве, синдром Отахары, синдром Веста, миоклонические судороги, митохондриальные расстройства, прогрессирующий миоклонический эпилептический припадок, психогенные судороги, рефлекторную эпилепсию, синдром Расмуссена, простые парциальные судороги, вторичные генерализованные судороги, височную эпилепсию, то-

ноклонические судороги, тонические судороги, психомоторные эпилептические припадки, лимбическую эпилепсию, парциальные припадки, генерализованные припадки, эпилептический статус, абдоминальную эпилепсию, акинетические припадки, спонтанные припадки, массивные двухсторонние миоклонические судороги, катамениальную эпилепсию, судороги с падениями, эмоциональные судороги, фокальный эпилептический припадок, эпилептические припадки смеха, Джексоновскую эпилепсию, болезнь Лафора, моторные судороги, многофокальный эпилептический припадок, ночные эпилептические припадки, фотогенную эпилепсию, псевдоэпилепсию, сенсорную эпилепсию, слабовыраженную эпилепсию, лесную эпилепсию, эпилепсию при абстинентном синдроме и зрительные рефлекторные эпилептические припадки).

Против эпилептического расстройства может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое представляет собой антиконвульсант или противозлепептик, включая, но не ограничиваясь этим, барбитуратные антиконвульсанты (т.е. примидон, метарбитал, мефобарбитал, аллобарбитал, амобарбитал, апробарбитал, альфенал, барбитал, браллобарбитал и фенолбарбитал), бензодиазепиновые антиконвульсанты (т.е. диазепам, клоназепам и лоразепам), карбаматные антиконвульсанты (т.е. фельбамат), антиконвульсанты на основе ингибитора угольной ангидразы (т.е. ацетозоламид, топирамат и зонизамид), дибензазепиновые антиконвульсанты (т.е. рафмамид, карбамазепин и окскарбазепин), антиконвульсанты на основе производных жирных кислот (т.е. дивалпрокс и вальпроевую кислоту), аналоги  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (т.е. прегабалин, габапентин и вигабатрин), ингибиторы повторного потребления  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (т.е. тиагабин), ингибиторы трансаминазы  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (т.е. вигабатрин), гидантоиновые антиконвульсанты (т.е. дифенин, этотоин, фосдифенин и медифенин), разнообразие антиконвульсанты (т.е. лакозамид и сульфат магния), прогестины (т.е. прогестерон), оксазолидиндионовые антиконвульсанты (т.е. параметадион и триметадион), пирролидиновые антиконвульсанты (т.е. леветиракетам), сукцинимидные антиконвульсанты (т.е. этосуксимид иметсуксимид), триазиновые антиконвульсанты (т.е. ламотригин) и мочевиновые антиконвульсанты (т.е. фенацеид и фенетурид).

Расстройства поведения и расстройства CNS, отличающиеся аберрантным поведением со стороны подверженного им субъекта, включают, но не ограничиваясь этим, расстройства сна (т.е. инсомнию, парасомнию, ночные страхи, расстройства сна, связанные с циркадианным ритмом и нарколепсию), расстройства настроения (т.е. депрессию, суицидальную депрессию, страх, хронические аффективные расстройства, фобии, приступы паники, обсессивно-компульсивное расстройство, расстройство гиперактивности с дефицитом внимания (ADHD), расстройство дефицита внимания (ADD), синдром хронической усталости, агорафобию, расстройство пост-травматического стресса, биполярное расстройство), расстройства питания (т.е. анорексию или булимию), психозы, поведенческие расстройства развития (т.е. аутизм, синдром Ретта, синдром Аспергера), расстройства личности и психотические расстройства (т.е. шизофрения, бредовое расстройство и т.п.).

Против расстройства поведения может быть выбрано неврологическое лекарственное средство из соединения, модифицирующего поведение, включая, но не ограничиваясь этим, атипичные антипсихотические средства (т.е. рисперидон, аланзапин, априпипразол, хетиапин, палиперидон, азенапин, клозапин, илоперидон и zipразидон), фенотиазиновое антипсихотическое средство (т.е. прохлорпемазин, хлорпромазин, флуфеназин, перфеназин, трифлуоперазин, тиоридазин и мезоридазин), тиоксантеновое антипсихотическое средство (т.е. тиотиксен), разнообразные антипсихотические средства (т.е. пимозид, литий, молиндон, галоперидол и локсапин), селективный ингибитор повторного потребления серотонина (т.е. циталопрам, эсциталопрам, пароксетин, флуоксетин и сертралин), ингибитор повторного потребления серотонина-норэпинефрина (т.е. дулоксетин, велафаксин, десвелафаксин, трициклический антидепрессант (т.е. доксерин, кломипрамин, амоксапин, нортриптилин, амитриптилин, тримипрамин, имипрамин, протриптилин и дезипрамин), тетрациклический антидепрессант (т.е. миртазапин и мапротилин), фенилпиперазиновый антидепрессант (т.е. тразодон и нефазодон), ингибитор моноаминоксидазы (т.е. изокарбоксазид, фенелзин, селегилин и транилципромин), бензодиазепин (то есть алпразолам, эстазолам, флуразептам, клоназепам, лоразепам и диазепам), ингибитор повторного потребления норэпинефрина-допамина (т.е. бупропион), стимулятор CNS (т.е. фентермин, диэтилпропион, метамфетамин, декстроамфетамин, амфетамин, метилфенидат, дексметилфенидат, лиздексамфетамин, модафинил, пемсолин, фендиметразин, бензфетамин, фендиметразин, армодафинил, диэтилпропион, кофеин, атомоксетин, доксапрам и мазиндол), анксиолитическое/седативное/снотворное средство (включая, но не ограничиваясь этим, барбитурат (т.е. секобарбитал, фенобарбитал и мефобарбитал), бензодиазепин (как описано выше), и разнообразные анксиолитические/седативные/снотворные средства (т.е. дифенгидрамин, натрий оксидат, залеплон, гидроксизин, хлораль гидрат, аолпидем, буспирон, доксерин, эзопиклон, рамелтеон, мепробамат и этхлорвинол)), секретин (см., например, Ratliff-Schaub et al. *Autism* 9:256-265 (2005)), опиоидный пептид (см., например, Cowen et al., *J. Neurochem.* 89:273-285 (2004)) и нейорпептид (см., например, Hethwa et al. *Am. J. Physiol.* 289:E301-305 (2005)).

Лизосомные расстройства накопления представляют собой метаболические расстройства, которые в некоторых случаях ассоциируются с CNS или имеют CNS-специфичные симптомы; такие расстройства включают, но не ограничиваясь этим, болезнь Тея-Сакса, болезнь Гоше, болезнь Фабри, мукополисахар-

ридоз (типы I, II, III, IV, V, VI и VII), болезнь накопления гликогена, GM1-ганглиозидоз, метахроматическую лейкодиетрофию, болезнь Фарбера, лейкодиетрофию Канавана и типы 1 и 2 нейронного цероидного липофуциноза, болезнь Нимана-Пика, болезнь Помпе и болезнь Краббе.

Против лизосомной болезни накопления может быть выбрано неврологическое лекарственное средство, которое само по себе имеет активность фермента, которая ослабляется при заболевании, или иным образом воспроизводит ее. Иллюстративные рекомбинантные ферменты для лечения лизосомных расстройств накопления включают, но не ограничиваясь, те, которые приведены, например, в публикации заявки на патент США № 2005/0142141 (т.е.  $\alpha$ -L-идуронидазу, идуронат-2-сульфатазу, N-сульфатазу,  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидазу, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазу,  $\beta$ -галактозидазу, арилсульфатазу B,  $\beta$ -глюкуронидазу, кислую  $\alpha$ -глюкозидазу, глюкоцереброзидазу,  $\alpha$ -галактозидазу A, гексозаминидазу A, кислую сфингомиелиназу,  $\beta$ -галактоцереброзидазу,  $\beta$ -галактозидазу, арилсульфатазу A, кислую церамидазу, аспартоацилазу, пальмитоил-протеинтиозинэстеразу 1 и трипептидиламинопептидазу 1).

В других вариантах осуществления заболевания, связанные с неправильным сверхпродукцией эритроцитов или вызываемые им, или заболевания, где сверхпродукция эритроцитов является воздействием заболевания, могут предотвращаться или лечиться посредством воздействия обеднения ретикулоцитов, наблюдаемого в настоящем документе для антител анти-TfR, сохраняющих, по меньшей мере, частичную эффекторную функцию. Например, при наследственной или неопластической истинной полицитемии повышенные количества эритроцитов из-за гиперпролиферации, например, ретикулоцитов дает в результате загущение крови и сопутствующие физиологические симптомы (d'Onofrio et al., Clin. Lab. Haematol. (1996) Suppl. 1:29-34). Введение антитела анти-TfR по настоящему изобретению, где, по меньшей мере, частичная эффекторная функция антитела сохраняется, сделала бы возможным селективное удаление популяции незрелых ретикулоцитов без влияния на нормальный перенос трансферрина в CNS. Дозирование такого антитела модулировалось бы таким образом, что острые клинические симптомы могли бы сводиться к минимуму (т.е. посредством дозирования при очень низкой дозе или через большие временные интервалы), как хорошо известно в данной области.

В одном из аспектов антитело по настоящему изобретению используется для детектирования неврологического расстройства до наступления симптомов и/или для оценки тяжести или продолжительности заболевания или расстройства. В одном из аспектов антитело делает возможным детектирование и/или получение изображений неврологического расстройства, включая получение изображений с помощью радиологии, томографии или магнитной резонансной томографии (MRI).

В одном из аспектов предлагается антитело анти-TfR с низким сродством по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного препарата. В других аспектах предлагается антитело анти-TfR с низким сродством для применения при лечении неврологического заболевания или расстройства (например, болезни Альцгеймера) без обеднения эритроцитов (т.е. ретикулоцитов). В определенных вариантах осуществления предлагается модифицированное антитело анти-TfR с низким сродством для использования в способе лечения, как описано в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает антитело анти-TfR с низким сродством, модифицированное для улучшения его безопасности, для использования в способе лечения индивидуума, имеющего неврологическое заболевание или расстройство, включающий введение индивидууму эффективного количества антитела анти-TfR (необязательно, связанного с лекарственным средством против неврологического расстройства). В одном таком варианте осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента. В других вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает антитело анти-TfR, модифицированное для улучшения его безопасности, для использования при уменьшении или ингибировании образования амилоидных бляшек у пациента, имеющего риск неврологического заболевания или расстройства (например, болезни Альцгеймера) или страдающего от него. "Индивидуум" в соответствии с любым из рассмотренных выше вариантов осуществления необязательно представляет собой человека. В определенных аспектах антитело анти-TfR по настоящему изобретению для использования в способах по настоящему изобретению улучшает потребление лекарственного средства против неврологического расстройства, с которым оно связано.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает для использования антитела анти-TfR с низким сродством по настоящему изобретению при производстве или приготовлении лекарственного препарата. В одном из вариантов осуществления лекарственный препарат предназначен для лечения неврологического заболевания или расстройства. В другом варианте осуществления лекарственный препарат предназначен для использования в способе лечения неврологического заболевания или расстройства, включающем введение индивидууму, имеющему неврологическое заболевание или расстройство, эффективного количества лекарственного препарата. В одном таком варианте осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения болезни Альцгеймера. В одном из вариантов осуществления способ включает введение индивидууму, имеющему болезнь Альцгей-

мера, эффективного количества мультиспецифичного антитела по настоящему изобретению, которое связывает как BACE1, так и Tfr или как Abeta, так и Tfr. В одном таком варианте осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента. "Индивидуум" в соответствии с любым из рассмотренных выше вариантов осуществления может представлять собой человека.

Антитела анти-Tfr по настоящему изобретению могут использоваться при терапии либо сами по себе, либо в сочетании с другими агентами. Например, антитело анти-Tfr по настоящему изобретению может вводиться совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой терапевтический агент, эффективный при лечении такого же или иного неврологического расстройства, как то, для лечения которого используется антитело анти-Tfr. Иллюстративные дополнительные терапевтические агенты включают, но не ограничиваясь этим, разнообразные неврологические лекарственные средства, описанные выше, ингибиторы холинэстеразы (такие как донепезил, галантамин, ровастигмин и такрин), антагонисты рецепторов NMDA (такие как мемантин), ингибиторы агрегации пептидов амилоида  $\beta$ , антиоксиданты, модуляторы  $\gamma$ -секретазы миметики фактора роста нервов (NGF) или генную терапию NGF, агонисты PPAR $\gamma$ , ингибиторы редуктазы HMS-CoA (статины), ампакины, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты рецепторов GABA, ингибиторы гликогенсинтазакиназы, внутривенный иммуноглобулин, агонисты мускариновых рецепторов, модуляторы никотиновых рецепторов, активную или пассивную иммунизацию пептида амилоида  $\beta$ , ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты рецепторов серотонина и антитела антипептид амилоида  $\beta$ . В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент выбирается по его способности ослаблять одно или несколько побочных воздействий неврологического лекарственного средства.

Как иллюстрируется в настоящем документе, определенные антитела анти-Tfr могут иметь побочные воздействия, которые отрицательно влияют на популяции ретикулоцитов у субъекта, которого лечат с помощью антитела анти-Tfr. Таким образом, в определенных вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, выбранный из-за его способности ослаблять такое отрицательное побочное воздействие на популяции ретикулоцитов, вводится совместно с антителом анти-Tfr по настоящему изобретению. Примеры таких терапевтических агентов включают, но не ограничиваясь этим, агенты для увеличения популяции эритроцитов (т.е. ретикулоцитов), агенты для поддержания роста и развития эритроцитов (т.е. ретикулоцитов) и агенты для защиты популяции эритроцитов от воздействий антитела анти-Tfr; такие агенты включают, но не ограничиваясь этим, эритропоэтин (EPO), добавки, содержащие железо, витамин C, фолиевую кислоту и витамин B12, а также физическое восполнение эритроцитов (т.е. ретикулоцитов) с помощью, например, вливания сходных клеток, которые могут происходить от другого индивидуума со сходным типом крови или могут предварительно извлекаться у субъекта, которому вводят антитело анти-Tfr. Для специалиста в данной области будет понятно, что в некоторых случаях агенты, предназначенные для защиты существующих эритроцитов (т.е. ретикулоцитов), предпочтительно вводятся субъекту до терапии с помощью антитела анти-Tfr или одновременно с ней, в то время как агенты, предназначенные для поддержания или инициирования повторного роста/развития эритроцитов или популяций клеток крови (т.е. ретикулоцитов или популяции ретикулоцитов), предпочтительно вводятся одновременно с терапией с помощью антитела анти-Tfr или после нее, так что такие клетки крови могут восполняться после лечения с помощью антитела анти-Tfr.

В определенных других вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент выбирается из-за его способности ингибировать или предотвращать активирование пути комплемента при введении антитела анти-Tfr. Примеры таких терапевтических агентов включают, но не ограничиваясь этим, агенты, которые отрицательно влияют на способность антитела анти-Tfr к связыванию или активированию пути комплемента, и агенты, которые ингибируют одно или несколько молекулярных взаимодействий с путем комплемента, и описываются в целом, в Mollnes and Kirschftnk (2006) *Molec. Immunol.* 43:107-121, содержание которой в явном виде включается в настоящий документ в качестве ссылки.

Такие сочетанные терапии, отмеченные выше, в настоящем документе охватывают сочетанное введение (когда два или более терапевтических агента включаются в один и тот же или в различные препараты) и раздельное введение, в этом случае введение антитела по настоящему изобретению может осуществляться до, во время и/или после введения дополнительного терапевтического агента и/или вспомогательного вещества. В одном из вариантов осуществления введение антитела анти-Tfr и введение дополнительного терапевтического агента осуществляется с разницей по времени в пределах примерно одного месяца, или в пределах примерно одной, двух или трех недель, или в пределах примерно одного, двух, трех, четырех, пяти или шести дней. Антитела по настоящему изобретению могут также использоваться в сочетании с другими видами интервенционной терапии, такими как, но не ограничиваясь этим, радиационная терапия, поведенческая терапия или другие виды терапии, известные в данной области и соответствующие неврологическому расстройству, которое должно лечиться или предотвращаться.

Антитело анти-Tfr по настоящему изобретению (и любой дополнительный терапевтический агент)

может вводиться с помощью любых пригодных для использования средств, включая парентеральное, интрапульмонарное и интраназальное введение, и, по желанию, местного лечения, внутриваневого введения. Парентеральные вливания включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование может осуществляться с помощью любого пригодного для использования способа, например с помощью инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, в зависимости, отчасти, от того, является ли введение кратким или хроническим. В настоящем документе предполагаются разнообразные временные графики дозирования, включая, но не ограничиваясь этим, однократное или множественное введение в различные моменты времени, введение болюса и импульсное вливание.

Антитела по настоящему изобретению могут приготавливаться, дозироваться и вводиться способом, соответствующим хорошей медицинской практике. Факторы для рассмотрения в этом контексте включают конкретное расстройство, которое лечится, конкретное млекопитающее, которое лечится, клиническое состояние индивидуального пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, временной график введения и другие факторы, известные медицинским работникам. Антитело не должно приготавливаться, но необязательно приготавливается вместе с одним или несколькими агентами, используемыми в настоящее время для предотвращения или лечения рассматриваемого расстройства или для предотвращения, ослабления или облегчения одного или нескольких побочных воздействий введения антитела. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в препарате, типа расстройства или лечения и от других факторов, обсуждаемых выше. Они, как правило, используются при таких же дозировках и с помощью таких же способов введения, как описывается в настоящем документе, или в пределах примерно от 1 до 99% дозировок, описанных в настоящем документе, или при любой дозировке и с помощью любого способа, который эмпирически/клинически определяется как соответствующий.

Для предотвращения или лечения заболевания, соответствующая дозировка антитела по настоящему изобретению (когда оно используется отдельно или в сочетании с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, которое должно лечиться, типа антитела, тяжести и хода заболевания, от того, вводится ли антитело для превентивных или терапевтических целей, от предыдущей терапии, от клинической истории пациента и от реакции на антитело и от суждения наблюдающего врача. Антитело вводится соответствующим образом пациенту за один раз или в течение ряда сеансов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-10 мг/кг) антитела может представлять собой начальную пробную дозировку для введения пациенту, например, посредством одного или нескольких отдельных введений или с помощью непрерывного вливания. Одна типичная ежедневная доза может находиться в пределах примерно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или больше, в зависимости от факторов, рассмотренных выше. Для многократных введений в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение, как правило, быть продлено до тех пор, пока не произойдет желаемого подавления симптомов заболевания. Одна иллюстративная дозировка антитела может находиться в пределах примерно от 0,05 примерно до 40 мг/кг. Таким образом, пациенту могут вводиться одна или несколько доз примерно по 0,5, 2,0, 4,0, 5,0, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 мг/кг (или любое их сочетание). Такие дозы могут вводиться с промежутками, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, что пациент принимает примерно от двух примерно до двадцати доз или, например, примерно шесть доз антитела). Можно вводить начальную более высокую нагрузочную дозу, за которой следуют одна или несколько более низких доз. Однако могут быть полезными и другие режимы дозирования. Будет очевидно, что один из способов уменьшения воздействия на популяции ретикулоцитов посредством введения антитела анти-TfR заключается в модификации количества доз или временного режима дозирования таким образом, что в кровотоке присутствуют в целом более низкие количества циркулирующего антитела для взаимодействия с ретикулоцитами. В одном из неограничивающих примеров может вводиться более низкая доза антител анти-TfR с большей частотой, чем это было бы при более высокой дозе. Используемая доза может соответствовать балансу между количеством антитела, которое должно доставляться в CNS (которое само по себе связано со сродством с CNS антиген-специфичной частью антитела), сродством этого антитела к TfR и тем, вводится ли соединение (соединения), защищающее эритроциты (т.е. ретикулоциты), стимулирующее рост и развитие или ингибирующее путь комплемента, совместно с антителом или последовательно. Ход этой терапии легко отслеживается с помощью обычных методик и анализов, как описано в настоящем документе и как известно в данной области.

Понятно, что любой из указанных выше препаратов или терапевтических способов может осуществляться с использованием иммуноконъюгата по настоящему изобретению вместо антитела анти-TfR или в дополнение к нему.

Н. Промышленные изделия.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается промышленное изделие, содержащее материалы полезные при лечении, предотвращении и/или диагностике расстройств, описанных выше. Промышленное изделие содержит контейнер и метку или вставку в упаковку, на контейнере или связанную с ним. Пригодные для использования контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, меш-

ки с растворами для внутривенного введения и т.п. Контейнеры могут быть сформированы из разнообразных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предотвращения и/или диагностики состояния, и может иметь узел стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой мешок с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, прокалываемую с помощью иглы для гиподермических инъекций). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антитело по настоящему изобретению. Этикетка или вставка в упаковку показывает, что композиция используется для лечения выбранного состояния. Кроме того, промышленное изделие может содержать (а) первый контейнер с композицией, содержащейся в нем, где композиция содержит антитело по настоящему изобретению; и (б) второй контейнер с композицией, содержащейся в нем, где композиция содержит дополнительный цитотоксичный или иной терапевтический агент. Промышленное изделие в этом варианте осуществления настоящего изобретения может дополнительно содержать вставку в упаковку, показывающую, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. Альтернативно или в дополнение к этому, промышленное изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWI), фосфатный солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно содержать другие материалы, желательные с промышленной точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Понятно, что любое из указанных выше промышленных изделий может содержать иммуноконъюгат по настоящему изобретению вместо антитела анти-TfR или в дополнение к нему.

#### Примеры

Пример 1. Генерирование, характеристика и гуманизация перекрестно-реактивных антител анти-TfR человека/цино.

Сначала осуществляют процесс фагового пэннинга наивных антител в попытке идентификации антител перекрестно-реактивных по отношению как к TfR человека, так и к TfR обезьяны циномогус ("цино"), которые в дальнейшем не конкурируют с Tf за связывание с TfR (Lee et al. JMB (2004) 1073-1093). Такого перекрестно-реактивного, не конкурирующего с Tf клона не идентифицируют в этом процессе фагового пэннинга. Однако идентифицируют два антитела, которые являются полезными при характеристике генерируемых впоследствии клонов гибридомы.

Идентифицируют виды перекрестно-реактивного антитела, которое конкурирует с Tf за связывание с TfR человека или цино (Tf-конкурирующее антитело). Эпитоп другого клона, специфичный для TfR человека, картируется в апикальном домене huTfR с использованием химерных рецепторов TfR мыши/человека (фиг. 1). Этот клон, связывающийся с апикальным доменом, теряет связь с huTfR, когда последовательность TfR мыши в апикальном домене замещают в положении huTfR.

Затем осуществляют основанный на иммунизации подход к генерированию перекрестно-реактивных антител анти-TfR человека/цино. Внеклеточный домен TfR человека ("HFE"), содержащий N-конечную метку His и белок гемахроматоза человека ("HFE"), экспрессируют и очищают, как описано (Bennet et al., Nature (2000) 403, 46-53). Получают аналогичный конструкт ecd TfR цино. TfR цино экспрессируют и очищают сходным способом. Перекрестно-реактивные антитела TfR человека и цино генерируют посредством иммунизации 5 мышей Balb/C в подошву лапы с помощью 6 доз (два раза в неделю), содержащих по 2 мкг, каждая, ecd супоTfR и huTfR. Все сыворотки мышей являются положительными по FACS, и все мыши являются слитыми. Из 1632 просмотренных гибридом 111 являются положительными согласно ELISA относительно связывания с TfR как человека, так и цино.

Полученные в результате ELISA-положительные гибридомы просматривают посредством FACS в присутствии 1 мкМ голо-Tf человека на связывание с 293 клетками, транзитивно экспрессирующими TfR человека или цино. Вкратце, анализ FACS осуществляют с использованием 293 клеток, трансфицированных полноразмерным TfR человека или цино с использованием липофектамина 2000 плюс (Invitrogen) за 48-72 ч перед анализом FACS. Нетрансфицированные (контрольные) и трансфицированные 293 клетки промывают два раза буфером FACS (PBS содержащий 1% BSA), добавляют 50 мкл супернатанта гибридомы (нормированного на 10 мкг/мл) к клеткам 293 в присутствии 1 мкМ голо-Tf человека и инкубируют на льду в течение 30 мин. Клетки промывают два раза буфером FACS, добавляют 50 мкл PE-козы-анти-Fcy мышиных (Jackson ImmunoResearch) к клеткам и инкубируют их на льду в течение 30 мин. Клетки промывают буфером FACS и повторно суспендируют в 100 мкл буфера FACS для анализа.

14 клонов являются положительными относительно связывания TfR как человека, так и цино (фиг. 2A и 2B). Эти клоны дополнительно субклонировать и оценивают на связывание с TfR как человека, так и цино, с помощью ELISA и картируют эпитоп на huTfR с использованием клона фага с апикальным связыванием, идентифицированного выше. Вкратце, конкурентный анализ ELISA фага с апикальным доменом осуществляют на планшетах Maxisorp, покрытых 2 мкг/мл очищенного TfR человека или цино, в PBS при 4°C в течение ночи. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и блокируют с использованием Superblock с казеином (Thermo Scientific, Hudson, NH). В каждую лунку добавляют 30-мкл аликвоту супернатанта гибридомы (нормированного на 10 мкг/мл) в течение 45 мин. За этим следует добавление 30 мкл фага, связывающегося с апикальным доменом, при OD (оптической плотности) 0,05 в течение 15

мин. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и добавляют на планшет разбавленное 1:1000 HRP-мышь-анти M13 (GE healthcare) и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20, и связанный фаг детектируют с использованием субстрата TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). Девять из четырнадцати клонов, как обнаружено, блокируют связывание антитела с апикальным связыванием, согласно фаговому дисплею (см. фиг. 2С).

Сродство антител измеряют с использованием поверхностного плазмонного резонанса ("SPR") (Biacore™, GE Healthcare). Антитело анти-His (Qiagen) связывается на четырех различных проточных ячейках сенсорного чипа CM5 BIACORE™ (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) при значении в пределах между 6000 и 8000 RU. Иммунизация осуществляется посредством неупорядоченного связывания через амино группы с использованием протокола, поставляемого производителем. 10X HBS-P (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) разбавляют в воде и используют в качестве буфера для разбавления и проточного буфера. Очищенный Tfr человека или цино захватывается, после этого инжектируют 3-кратные последовательные разбавления IgG или Fab при скорости потока 30 мл/мин с использованием способа одноциклового кинетики. Постоянные сродства определяют с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 или с использованием стационарной модели, когда  $k_{on}$  или  $k_{off}$  находятся ниже пределов детектирования. Равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) вычисляют как отношение константы скорости ассоциации ( $k_{on}$ ) и константы скорости диссоциации ( $k_{off}$ ). Результаты показаны на фиг. 2С.

Каждую гибридому клонируют. РНК в целом изолируют от гибридом с использованием набора RNeasy (Qiagen). cDNA генерируют с использованием SMART 5' RACE cDNA Amplification kit (Clontech) на основе инструкций производителя. Варибельную область каждого антитела амплифицируют с использованием UPM (5' олиго), поставляемого в наборе, и 3' олиго, который отжигается по отношению к постоянной области. Затем продукт PCR в целом клонируют в вектор pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) для секвенирования. После анализа последовательностей гибридомы могут дополнительно подразделяться на 4 группы (фиг. 3А-3D). Клоны, которые конкурируют с антителом с апикальным связыванием, попадают в 3 родственных класса последовательностей (фиг. 3А-С). 4 неапикальных клон (фиг. 3D) состоят из 2 родственных клонов и 2 других уникальных последовательностей. CDR легкой и тяжелой цепи каждого клон приводятся в табл. 3.

Таблица 3

CDR легких и тяжелых цепей перекрестно-реактивных антител анти-Tfr цино/человека

Наименование клон	Тяжелая/легкая	HVR1	SEQ ID №	HVR2	SEQ ID №	HVR3	SEQ ID №
7A4	Легкая	RASESVDSYGNSFMH	29	RASNLES	30	QQSNEAPPT	31
	Тяжелая	DYAMH	32	GISTYFGRITNYNQKFRG	33	GLSGNYVM DY	34
8A2	Легкая	RASESVDSYGNSFMH	35	RASNLES	30	QQSNEGPPT	36
	Тяжелая	DYGMH	37	VISFYSGKTYNQKFMG	38	GLSGNYVVDY	39
15D2	Легкая	RASESVDSYGNSFMH	35	RASNLES	30	QQSNEGPPT	36
	Тяжелая	DYAMH	32	VISPYSGRTNYNQKFRG	40	GLSGNYVMDY	34
10D11	Легкая	RASESVDSYGNSFMH	41	RASNLES	30	QHSNEDPPT	42
	Тяжелая	DYGMH	37	VISPYSGKTYNSQKFRG	43	GLSGNFVMDY	44
7B10	Легкая	RASESVDSYGNSFMH	29	RASNLES	30	QQSNEGPPT	31
	Тяжелая	DYAMH	32	GISTYFGRITNYNQKFRG	33	GLSGNYVMDY	34
CDR легких цепей консенсусного класса I		RASESVD(S/D)YG(N/P)SFMH	45	RASNLES	30	Q(Q/H)SNE(A/G/D)PPT	46
CDR тяжелых цепей консенсусного класса I		DY(A/G)MH	47	(G/V)IS(T/F/P)Y(F/S)G(R/K)TNY(N/S)Q(K/N)F(K/M)G	48	GLSGN(Y/F)V(M/V)D(Y/F)	49

15 G11	Легкая	RASDNLYSNLA	50	DATNLAD	51	QHFWGTPLT	52
	Тяжелая	SYWMH	53	EINPTNGRTNY1EKFKS	54	GTRAYHY	55
16G5	Легкая	RASENIYSNLA	56	AATDLAD	57	QHFWGTPLT	52
	Тяжелая	SYWMH	53	EINPTNGRTNYNENFKS	58	GTRAYHF	59
13C3	Легкая	RASDNLYSNLA	60	AATNLAD	61	QHFWGTPLM	62
	Тяжелая	SYWMH	53	EINPTNGRTNYSEKPKK	63	GTRAYHY	55
16G4	Легкая	RASDNLYSNLA	60	AVTNLAD	64	QHFWGTPLT	52
	Тяжелая	SYWMH	53	EINPSNGRTNYNETFKS	65	GTRAYHY	55
CDR легких цепей консенсусного класса II		RAS (E/D)N (L/1)YSNLA	66	(D/A) (A/V)T (N/D)LAD	67	QHFWGTPL (T/M)	68
CDR тяжелых цепей консенсусного класса II		SYWMH	53	EINP (T/I/S)NGRTNY (I/N/S) E (K/N/T)FK (S/K)	69	GTRAYH (Y/F)	70
16F6	Легкая	RASKSISKYLA	71	SGSTLQS	72	QQHNEYPWT	73
	Тяжелая	SEYAWN	74	YISYSGTTSYNPSLKS	75	YGYGNPATR YFDV	76
7G7	Легкая	RAROSVSTSSYSFMH	77	YASIQES	78	QHTWEIPFT	79
	Тяжелая	SYWMH	80	NIYPGSGSTKYDERFKS	81	GGYDSRAWFAY	82
4C2	Легкая	RARQSVSTSSYSFMH	77	YASIQES	78	QHTWEIPFT	79
	Тяжелая	SYWMH	80	NIYPGSGSTKYDEKFKS	83	GGYDSRAWFAH	84
1B12	Легкая	TTSSVPSSEYEH	85	STSNLAS	86	HQYHRSPFT	87
	Тяжелая	DYYMY	88	SISNGGDNTYYPDTVRG	89	QGALYDGYR GAMDY	90
13D4	Легкая	RAGQDITNYLN	91	YTSRLHS	92	QQANTLPYT	93
	Тяжелая	NYWIE	94	EILPGSGSTKYNEKFKG	95	RGGYGDGEFAY	96
CDR легких цепей консенсусного класса IV		(R/T) (A/T) (R/S/G) (Q/S) (S/-) (V/-) (S/-) (T/-) (S/V/D) (S/P/I) (Y/S/T) (S/N) (F/Y) (M/E/L) (H/N)	97	(Y/S) (A/T)S (I/N/R) (Q/L) (E/A/H)S	98	(Q/H) (H/Q) (T/Y/A) (W /H/N) (E/R/T) (I/S/L) P (F/Y)T	99
CDR тяжелых цепей консенсусного класса IV		(S/D/N)Y (W/Y) (M/I) (H/Y/E)	100	(N/S/E)I (Y/S/L) (P/N)G (S/ G) (G/D) (S/N)T (K/Y)Y (D/P/ N) (E/D) (R/K/T) (F/V)K (S/G)	101	(G/Q/R)G (Y/A/G) (D/L /Y) (S/Y/G) (R/D/Y) (A /G/D) (W/Y/G) (F/Y/E) (R/F/-) (G/-) (A/-) (M/-) (A/D) (Y/H)	102

Репрезентативные клоны из каждого класса (15G11, 7A4, 16F6 и 7G7) приводятся для иллюстрации в настоящем документе с целью гуманизации и дополнительной характеристики. Гуманизация осуществляется с использованием прививок HVR вместе с включением выбранных верньерных положений, как изображено ниже на фиг. 4А-4Е. 15G11 гуманизируют посредством прививки HVR в переменных доменах человека IGKV1-NL1\*01 и IGHV1-3\*01. Сочетания различных верньерных положений мыши включаются в гуманизированные варианты, как изображено на фиг. 4Е. Гуманизированный вариант 15G11 15G11.v5 содержит выбранные верньерные положения в VL (положения 43 и 48) и VH (положения 48, 67, 69, 71 и 73), как изображено на фиг. 4А. В дополнение к этому N-окончание VH изменено с Q на E. Для гуманизации 7A4 делают прививку HVR с использованием HVR тяжелой цепи 7A4 и легкой цепи 8A2 (7A4 и 8A2 представляют собой родственные клоны, фиг. 3А). HVR прививают в переменных доменах человека IGKV4-1\*01 и IGHV1-2\*02. Сочетания различных верньерных положений мыши включаются в гуманизированные варианты, как изображено на фиг. 4Е. Гуманизированный вариант 7A4 7A4.v15 содержит выбранные верньерные положения в VL (положение 68) и VH (положения 24 и 71) и изменение CDR-L3 G94A, как изображено на фиг. 4В. 7G7 гуманизируют посредством прививки HVR в консенсусных переменных доменах человека каппа 4 и подгруппы I вместе с выбранными верньерными положениями в VH (положение 93), как изображено на фиг. 4С. Это гуманизированный вариант называется 7G7.v1. 16F6 гуманизируют посредством прививки HVR в переменных доменах человека IGKV1-9\*01 и IGHV4-59\*01. Сочетания различных верньерных положений мыши включают в гуманизированные варианты, как изображено на фиг. 4Е. Гуманизированный вариант 16F6 16F6.v4 содержит 2 изменения в VL (148L и F71Y), а также выбранные верньерные положения в VL (положения 43 и 44) и VH (положения 71 и 78), как изображено на фиг. 4D.

Таблица 4

## CDR легкой и тяжелой цепи гуманизированных антител/Fab

Наименование клона	Тяжелая/ легкая	CDR1	SEQ	CDR2	SEQ	CDR3	SEQ
			ID №		ID №		ID №
15G11.v5	Легкая	RASDNLYSNLA	50	DATNLAD	51	QHFVGTPLT	52
	Тяжелая	SYWMH	53	EINPTNGRTNYIEKFKS	54	GTRAYHY	55
7A4.v15	Легкая	RASESVDSYGNSEFMH	29	RASNLES	30	QQSNEAPPT	127
	Тяжелая	DYAMH	32	GISTYFGRNTNYNQKFK G	33	GLSGNYVM DY	34
7G7.v1	Легкая	RAROSVSTSSYSEFMH	77	YASIQES	78	QHTWEIPFT	79
	Тяжелая	SYWMH	80	NIYPGSGSTKYDERFKS	81	GGYDSRAWF AY	82
16F6.v4	Легкая	RASKSISKYLA	71	SGSTLQS	72	QQHNEYPT	73
	Тяжелая	SEYAWN	74	YISYSGTTSYNPPLKS	75	YGYGNPATR YFDV	76

Сродство гуманизированных вариантов по отношению к TfR человека и цино определяют с помощью SPR как IgG (фиг. 4Е). Выбранные клоны также анализируют с помощью SPR как Fab для оценки одновалентного сродства (табл. 7). В обоих случаях эксперименты SPR осуществляют, как описано выше.

Таблица 5

## Данные Вiasore по связыванию выбранных Fab-форматированных вариантов

Образец	HuTfR			CynoTfR			Отношение Cy/hu
	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
Mu15G11.Fab	1,38E+06	4,65E-03	3,37E-09	1,07E+06	6,23E-03	5,81E-09	1,72
Mu15G11.Fab	6,34E+05	1,52E-03	2,41E-09	4,85E+05	3,68E-03	7,57E-09	3,15
Hu15G11.v1.Fab	6,38E+05	0,006986	1,09E-08	5,05E+05	0,0373	7,39E-08	
Hu15G11.v3.Fab	6,42E+05	0,004657	7,26E-09	4,83E+05	0,0201	1,09E-08	
Hu15G11.v5.Fab	4,56E+05	0,004063	8,91E-09				
hu15G11.v5.Fab	7,76E+05	0,003643	4,70E-09	1,41E+06	0,02184	1,56E-08	3,4
Mu7A4.Fab	1,65E+06	3,13E-04	1,90E-10	1,14E+06	8,45E-04	7,41E-10	3,9
Hu7A4.v5.Fab	2,24E+06	1,53E-03	6,86E-10	1,18E+06	6,41E-03	5,44E-09	
Hu7A4.v8.Fab	9,28E+05	1,07E-03	1,15E-09	7,97E+05	6,81E-03	8,55E-09	
Hu7A4.v9.Fab	1,71E+06	6,86E-04	4,01E-10	8,08E+05	3,42E-03	4,23E-09	
Hu7A4.v12.Fab	3,32E+06	8,44E-04	2,55E-10	1,74E+06	3,31E-03	1,90E-09	
hu7A4.v15.Fab	9,10E+05	3,17E-04	3,48E-10	3,78E+05	0,001618	4,28E-09	11
Hu7G7.v1 Fab	1,44E+05	0,006594	4,58E-08	3,84E+04	0,007231	1,88E-07	4,4
Mu16F6.Fab	6,07E+04	1,90E-04	3,13E-09	5,11E+04	1,37E-03	2,68E-08	8,56
Hu16F6.v4.Fab	1,31E+05	1,69E-04	1,29E-09	9,89E+04	2,44E-03	2,47E-08	19,1

Эпитопы связывания для антител подтверждаются повторно следующим образом.

Осуществляют ELISA с блокированием Tf-TfR на планшетах Maxisorp, покрытых 2 мкг/мл очищенного TfR человека в PBS, при 4°C в течение ночи. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и блокируют с использованием блокирующего буфера Superblock в PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). На планшеты добавляют 50 мкл 12,5 мкМ голо-Tf человека (R&D Systems, Minneapolis, MN) в течение 40 мин. На планшеты добавляют 50-мкл титры hu7A4.v15, hu15G11.v5, антитела, конкурирующего с Tf и hu7G7.v1 (начиная с 10 мкг/мл, последовательные разбавления 1:3), и инкубируют в течение 20 мин. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и добавляют разбавленное 1:1000 HRP-козы-анти-Fc $\gamma$  человека (Jackson ImmunoResearch) на планшет и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и детектируют с использованием субстрата TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

Осуществляют анализ ELISA связывания HFE-TfR на планшетах Maxisorp, покрытых 1 мкг/мл HFE в PBS, при 4°C в течение ночи. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и блокируют с использованием блокирующего буфера Superblock в PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Титр TfR человека (начиная при 100 мкг/мл, последовательное разбавление 1:3) добавляют на планшет и инкубируют в течение 1 ч. 1 мкг/мл of hu15G11.v5, hu7A4.v15 или hu7G7.v1 добавляют затем на планшет в течение 1 ч. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и добавляют на планшет разбавленное 1:1000 HRP-козы-анти-Fc $\gamma$  человека (Jackson ImmunoResearch) и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и детектируют с использованием субстрата TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). Осуществляют анализ ELISA с блокированием HFE-TfR на планшетах Maxisorp, покрытых 1 мкг/мл HFE в PBS, при 4°C в течение ночи. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и блокируют с использованием блокирующего буфера Superblock в PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). На планшете

NUNC™, титр hu7A4.v15, hu15G11.v5, антитела конкурирующего с Tf, голо-Tf человека и контрольный IgG (400 мкг для всех антител, 8000 мкг/мл для голотрансферрина, последовательное разбавление 1:3) объединяют с 2 мкг/мл биотинилированного TfR человека и инкубируют в течение 1 ч. Смесь затем добавляют на планшет, покрытый HFE, в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и разбавленное 1:1000 HRP-стрептавидин (SouthernBiotech, Birmingham) добавляют на планшет и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и детектируют биотинилированный TfR человека, связанный на планшете с использованием субстрата TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

На связывание этих гуманизированных вариантов с TfR не оказывает влияния присутствие 6,3 мкМ голо-Tf, в то время как связывание антитела, конкурирующего с Tf, которое связывается с сайтом связывания Tf на TfR, ингибируется (фиг. 5). Кроме того, гуманизированные 7A4.v15, 15G11.v5 и 7G7.v1 по-прежнему могут связывать HFE, захваченный huTfR, показывая, что на них не влияет связывание huTfR с иммобилизованным HFE (фиг. 6A). В родственном эксперименте 7A4.v15 и 15G11.v5 не блокируют связывание биотинилированного TfR с иммобилизованным HFE. В противоположность этому это взаимодействие блокируется антителом, конкурирующим с Tf и голо-Tf (фиг. 6B). HFE и Tf, как известно, имеют общий эпитоп, сходный с TfR (Bennet et al., Nature (2000) 403, 46-53).

Иммобилизованные 15G11.v5 и анти-TfR оценивают на связывание с ECD биотинилированного TfR человека или с одновалентным фагом M13, осуществляющим фаговый дисплей апикального домена TfR человека. Анти-TfR<sup>C12</sup> получают из фаговой библиотеки синтетических антител, для которых осуществляют пэннинг по отношению к ECD TfR человека, и оно связывается с сайтом на TfR человека, который конкурирует со связыванием трансферрина. Антитела наносят в виде покрытия при 1 мкг/мл в PBS на планшеты Maxisorp. Связанный биотинилированный ECD TfR человека или фаг апикального домена TfR детектируют с помощью HRP-стрептавида (GE health care, RPN 4401V) или HRP-анти-M13 (GE health care, 27-9421-01) соответственно. Фиг. 25 показывает, что 15G11.v5 связывается с апикальным доменом TfR человека. Сайт связывания 15G11.v5 картируется в апикальном домене, это сайт, удаленный от сайтов связывания лигандов TfR.

Пример 2. Получение с помощью генной инженерии средства перекрестно-реактивных антител анти-TfR человека/цино.

В дополнение к гуманизированным вариантам, описанным выше, получают дополнительные, полученные с помощью генной инженерии варианты со средством. В настоящем документе иллюстрируется получение с помощью генной инженерии средства 15G11.v5 и 7A4.v15. Варианты со средством генерируют посредством осуществления индивидуальных замещений аланина в CDR-L3 или CDR-H3 с использованием стандартных методик. Эти варианты просматриваются как IgG с помощью ELISA и SPR для идентификации положений, важных для связывания TfR человека и цино; одновалентное средство выбранных вариантов как Fab также определяется. Вариант со сканированием Ala IgG или Fab экспрессируются в клетках 293 и связываются с TfR человека или цино, количественно определенным с помощью ELISA на планшетах Maxisorp, покрытых 1,8 мкг/мл антитела козы анти-Fcγ человека (Jackson ImmunoResearch) в PBS, при 4°C в течение ночи. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и блокируют с использованием блокирующего буфера Superblock в PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Супернатанты, содержащие экспрессируемый IgG, последовательно разбавляют 1:5 и добавляют на планшет в течение 1 ч. Очищенные hu15G11.v5 или hu7A4.v15 используют в качестве стандартов (разбавленные 1:5, начиная при 1 мкг/мл). Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и добавляют на планшет разбавленное 1:1000 HRP-kozy-анти каппа (Southern Biotech) и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и детектируют с использованием субстрата TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). Связывание также оценивают с помощью SPR, как описано выше. Результаты показаны на фиг. 7A (варианты 15G11.v5) и 7B (варианты 7A4.v15).

Дополнительные варианты 15G11.v5 с индивидуальными аланиновыми замещениями в положениях в CDR-L1, CDR-L2, CDR-H1 и CDR-H2 также генерируются, экспрессируются и сначала просматриваются на связывание с TfR человека и цино с помощью анализа ELISA (табл. 6). Анализ ELISA связывания Hu/Су осуществляют на планшетах Maxisorp, покрытых 2 мкг/мл очищенного TfR человека или цино в PBS при 4°C в течение ночи. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и блокируют с использованием блокирующего буфера Superblock в PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Супернатанты культуры клеток, содержащие экспрессируемые варианты IgG со Ala-сканами, последовательно разбавляют 1:5 и добавляют в лунки в течение 1 ч. Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и добавляют на планшет разбавленное 1:1000 HRP-kozy-анти-Fcγ человека (Jackson ImmunoResearch) и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре.

Планшеты промывают PBS/0,05% Tween 20 и детектируют с использованием субстрата TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

Анализ ELISA Ala вариантов IgG hu15G11.v5

		EC50 <sub>сyно</sub> TfR	EC50 <sub>Hu</sub> TfR	
		(нг/мл)	(нг/мл)	
HVR-H1	15G11.v5		1,8	0,8
	G26A		6,1	1,1
	Y27A		1467,1	21,1
	T28A		0,8	0,4
	F29A		12,5	1,5
	T30A		0,9	0,4
	S31A		0,1	0,05
	Y32A		1,4	0,4
	W33A		362,5	59,6
	M34A		1,1	0,4
	G49A		1,1	0,3
HVR-H2	E50A		409,7	20,6
	I51A		0,6	0,2
	N52A		0,9	0,3
	P52aA		8,1	3,9
	T53A		0,7	0,3
	R56A		5405,4	55,1
	N58A		80,4	6,3
	Y59A		0,7	0,3
	I60A		0,7	0,3
	E61A		0,6	0,2
	K62A		0,7	0,3
	F63A		0,6	0,4
	K64A		0,6	0,3
S65A		0,7	0,2	
HVR-L1	R24A		0,4	0,1
	S26A		0,6	0,2
	D27A		0,8	0,2
	N28A		0,8	0,2
	L29A		0,9	0,3
	Y30A		1,0	0,3
	S31A		0,7	0,3
	N32A		4,0	1,6
	L33A		0,1	0,05
	ID50A		0,5	0,2
	T52A		0,3	0,2
	N53A		0,6	0,3
L54A		0,6	0,4	
D56A		0,5	0,3	

Затем выбранные варианты очищаются, и их одновалентное сродство к TfR человека или цино оценивают с помощью SPR (табл. 7).

Одновалентный анализ SPR выбранных аланиновых вариантов Fab 15G11.v5

	HuTfR			CynoTfR			Отношение Cy/hu
	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
Hu15G11.v5 Fab	6,74E+05	4,74E-03	7,03E-09	4,51E+5	1,27E-02	2,82E-08	4,0
Hu15G11.HC32A Fab	2,38E+05	1,78E-03	7,47E-09	1,77E+05	8,51E-03	4,80E-08	6,4
Hu15G11.HC34A Fab	5,64E+05	4,03E-03	7,14E-09	3,04E+05	9,90E-03	3,26E-08	4,6
Hu15G11.HC52A Fab	5,30E+05	2,36E-02	4,44E-08	4,87E+05	5,67E-02	1,17E-07	2,6
Hu15G11.HC52A Fab	5,64E+05	1,96E-02	3,46E-08	ND	ND	ND	ND
Hu15G11.HC51A Fab	4,33E+05	1,04E-02	2,39E-08	3,13E+05	3,29E-02	1,05E-07	4,4
Hu15G11.HC53A Fab	8,90E+05	1,15E-02	1,29E-08	4,84E+05	2,50E-02	5,18E-08	4,0
Hu15G11.HC54A Fab	2,06E+05	8,71E-03	4,24E-08	2,80E+05	1,69E-02	6,02E-08	1,4

Пример 3. Конструирование и анализ *in vitro* биспецифичного антитела анти-TfR человека.

Определенные варианты упомянутых выше антител переформируются как биспецифичные антитела со вторым плечом, специфично связывающимся с BACE1. Антитела анти-TfR человека Hu15G11.v5, Hu15G11.LC92A, Hu15G11.HC52A и Hu15G11.HC53A используются для получения с помощью генной инженерии плеча для связывания TfR биспецифичного антитела с использованием методики конструирования биспецифичного антитела 'выступ во впадину' (Carter, P. (2001) *J. Immunol. Methods* 248, 7-15; Ridgway, J.B., Presta, L.G., and Carter, P. (1996) *Protein Eng.* 9, 617-621; Merchant, A., Zhu, Z., Yuan, J.Q., Goddard, A., Adams, C.W., Presta, L.G., and Carter, P. (1998) *Nat. Biotechnol.* 16, 677-681; Atwell, S., Ridgway, J.B., Wells, J.A., and Carter, P. (1997) *J. Mol. Biol.* 270, 26-35). В дополнение к мутациям типа выступа и впадины в Fc для анти-TfR (впадина) и анти-BACE1 (выступ) все половинки антител содержат мутации в Fc области, которые аннулируют эффекторную функцию (N297G) и Hu15G11.v5, и Hu15G11.LC92A содержат дополнительную мутацию Fc, которая аннулирует эффекторную функцию (D265A). Половинки антител типа выступ и впадина очищаются отдельно от *E.coli* и объединяются при отношении 1:1,1 анти-TfR для предотвращения образования гомодимеров анти-TfR. Сборка биспецифичного антитела завершается посредством восстановительного отжига в течение по меньшей мере трех дней при комнатной температуре в буфере, содержащем восстановленный глутатион при отношении 100× к антителу и 200мМ аргинина, pH 8,0. После сборки биспецифичные антитела очищают с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий. Сборка подтверждается с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии и SDS-PAGE. С помощью эксклюзионной хроматографии и спектроскопии многоуглового лазерного рассеяния подтверждается, что очищенные антитела являются гомогенными и монодисперсными.

Полученные в результате биспецифичные антитела называются 15G11.v5 (анти-TfR<sup>1</sup>), 15G11.W92A (15G11.LC92A или анти-TfR<sup>2</sup>), Hu15G11.N52A (анти-TfR<sup>52A</sup>) и Hu15G11.T53A (анти-TfR<sup>53A</sup>).

Одновалентное сродство и кинетика по отношению к TfR человека и цино определяются для 15G11.v5 и 15G11.W92A с помощью SPR, как выше (см. табл. 9). Анти-TfR<sup>1</sup> и анти-TfR<sup>2</sup> обладают сродством одновалентного связывания сходным с анти-TfR<sup>A</sup> и анти-TfR<sup>D</sup>, относительно связывания с TfR мыши (см. Atwal et al., *Sci. Transl. Med.* 3, 84ra43 (2011); Yu et al., *Sci. Transl. Med.* 25 May 2011:Vol. 3, Issue 84, p. 84ra44).

Таблица 8

Одновалентный SPR анализ 15G11.v5 (TfR<sup>1</sup>) и 15G11.W92A (LC92A, TfR<sup>2</sup>)

	HuTfR			CynoTfR			Отношение cyno/human
	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
Hu15G11.v5 Fab	6,74E+05	4,74E-03	7,03E-09	4,51E+05	1,27E-02	2,82E-08	4,0
Биспецифичные Hu15G11.W92A	1,28E+05	3,77E-02	2,95E-07	8,36E+04	5,20E-02	6,22E-07	2,1

В дополнение к этому сродство связывания анти-TfR<sup>1</sup>, анти-TfR<sup>2</sup>, биспецифичных антител Hu15G11.N52A и Hu15G11.T53A измеряют по отношению к TfR человека и цино с помощью SPR, как описано ранее. Как показано в табл. 9 ниже, анти-TfR<sup>52A</sup> и анти-TfR<sup>53A</sup> имеют сродство связывания к TfR человека и цино в пределах между значениями для TfR<sup>1</sup><sup>Hu15G11.v5</sup> и TfR<sup>2</sup><sup>LC92A</sup>.

Антитела анти-TfR цино/человека (нМ)		
	TfR человека	TfR цино
TfR1 <sup>h15G11.v5</sup>	10	37
TfR2 <sup>LC92A</sup>	270	810
TfR2 <sup>52A</sup>	52	343
TfR2 <sup>53A</sup>	24	143

Пример 4. Воздействие содержащих эффекторы и не содержащих эффекторов моноспецифичных и биспецифичных антител на линию клеток эритролейкемии человека и на первичные мононуклеарные клетки костного мозга.

Преыдушие исследования на мышах определили, что антитела, связывающие TfR мышинных с эффекторной функцией и/или со способностями связывания комплемента, селективно обедняют TfR-экспрессирующие ретикулоциты. Чтобы убедиться, является ли обеднение, наблюдаемое при исследованиях на мышах, уникальным для системы мышинных, осуществляют дополнительные эксперименты с использованием анти-TfR, которые связываются с TfR человека.

Анализы ADCC осуществляют с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) от здоровых доноров людей в качестве эффекторных клеток. Линия клеток эритролейкемии человека (HEL, ATCC) и первичные мононуклеарные клетки костного мозга человека (AllCells, Inc.) используют в качестве целевых клеток. Для сведения к минимуму разброса среди доноров, который потенциально мог бы возникнуть, из-за аллотипических различий в остатке в 158 положении в FcγRIIIA, доноры крови ограничиваются теми, которые несут генотип гетерозиготного FcγRIIIA (F/V158) в первом наборе экспериментов (фиг. 8А-В). Для второго набора экспериментов (фиг. 9А-В) в качестве целевых клеток используют только клетки HEL, с PBMC от здоровых доноров людей, несущих либо генотип F/V158, либо генотип FcγRIIIA V/V158. Генотип V/V158 также включается в этот анализ из-за известной ассоциации с повышением активности ADCC, опосредуемой NK клетками, а также способности связывать антитела IgG4 (Bowles and Weiner, 2005; Bruhns et al. 2008). Клетки считают и жизнеспособность определяют с помощью Vi-CELL® (Beckman Coulter; Fullerton, CA), следуя инструкциям производителя.

PBMC изолируют с помощью центрифугирования в градиенте плотности с использованием пробирок для разделения крови Uni-Sep™ (Accurate Chemical & Scientific Corp.; Westbury, NY). Целевые клетки в 50 мкл среды для анализа (RPMI-1640 с 1% BSA и 100 единиц/мл пенициллина и стрептомицина) высевают в 96-луночный круглодонный планшет при  $4 \times 10^4$ /луночка. На планшеты, содержащие целевые клетки, добавляют последовательные разбавления исследуемых и контрольных антител (50 мкл/луночка), с последующим инкубированием при 37°C при 5% CO<sub>2</sub> в течение 30 мин, чтобы сделать возможной опсонизацию. Конечные концентрации антител находятся в пределах от 0,0051 до 10000 нг/мл после 5-кратных последовательных разбавлений в целом для 10 точек данных. После инкубирования  $1,0 \times 10^6$  эффекторных клеток PBMC в 100 мкл среды для анализа добавляют в каждую лунку с получением отношения эффекторные клетки:целевые клетки 25:1, и планшеты инкубируют в течение дополнительных 4 ч. По окончании инкубирования планшеты центрифугируют и супернатанты исследуют на активность лактатдегидрогеназы (LDH) с использованием Cytotoxicity Detection Kit™ (Roche Applied Science; Indianapolis, IN). Реакционную смесь LDH добавляют к супернатантам и планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин при постоянном встряхивании. Реакцию завершают с помощью 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> и измеряют коэффициент поглощения при 490 нМ (фон, измеренный при 650 нМ, вычитают для каждой лунки) с использованием считывающего устройства для микропланшетов SpectraMax Plus. Коэффициент поглощения лунок, содержащих только целевые клетки, служит в качестве контроля для фона (низкий контроль), при этом лунки, содержащие целевые клетки, лизированные с помощью Triton-X100, обеспечивают максимальный доступный сигнал (высокий контроль). Независимую от антител клеточную цитотоксичность (AICC) измеряют в лунках, содержащих целевые и эффекторные клетки без добавления антитела. Степень удельной ADCC вычисляют следующим образом:

$$\% \text{ ADCC} = 100 \times \frac{A_{490}(\text{образец}) - A_{490}(\text{AICC})}{A_{490}(\text{высокий контроль}) - A_{490}(\text{низкий контроль})}$$

Значения ADCC для разбавлений образца изображают в виде графика зависимости от концентрации антитела и кривые доза-реакция подгоняют с помощью четырехпараметрической модели с использованием SoftMax Pro.

В первом наборе экспериментов активность ADCC различных конструкторов TfR антилеков оценивают с использованием либо линии клеток эритролейкемии человека (клетки HEL), либо первичных мононуклеарных клеток костного мозга человека в качестве целевых клеток. Двухвалентное антитело анти-TfR 1 человека 15G11, компетентное относительно эффекторной функции IgG1, и биспецифичная форма этого антитела с плечом анти-BACE1 в формате IgG1 человека, содержащая мутации D265A и N297G для аннулирования эффекторной функции (см. пример 3), исследуются при различных концентрациях

при анализе ADCC, с использованием IgG1 анти-gD WT в качестве отрицательного контроля и антитела мышечных HLA человека (класс I) в качестве положительного контроля. Результаты показаны на фиг. 8А и 8В. Либо для клеток HEL в качестве мишеней (фиг. 8А), либо для моноклеарных клеток костного мозга в качестве мишеней (фиг. 8В), моноспецифичное эффектор-положительное антитело анти-TfR человека 15G11 демонстрирует значительную активность ADCC. Эта активность является сходной с активностью антител анти-HLA человека положительного контроля относительно клеток HEL и находится на устойчивом, но более низком уровне по отношению к положительному контролю на моноклеарных клетках костного мозга. Чуть более низкий уровень, наблюдаемый в эксперименте с моноклеарными клетками костного мозга, вероятно, связан с тем фактом, что только часть гетерогенной смеси миелоидной и эритроидной линий клеток PBMC, используемых в эксперименте, экспрессирует высокие уровни TfR, в то время как клетки HEL имеют consistently высокое экспрессирование TfR по популяции клональных клеток. Как резкий контраст, биспецифичное, не содержащее эффекторов антитело анти-TfR человека/BACE1 не демонстрирует никакой активности ADCC ни в клетках HEL, ни в моноклеарных клетках костного мозга, подобно отрицательному контролю.

Во втором наборе экспериментов оценивают влияние переключения изотипа антитела в этой системе анализа. Процедура анализ ADCC идентична той, которая описана выше, с тем исключением, что все целевые клетки представляют собой клетки HEL, а эффекторские клетки представляют собой PBMC от здоровых доноров людей, несущих либо гетерозиготный генотип FcγRIIIa-V/F158, либо гомозиготный генотип FcγRIIIa-V/V158. Все исследуемые антитела анти-TfR человека являются биспецифичными, с анти-gD на трех различных основных цепях Ig: IgG1 человека дикого типа, IgG1 человека с мутацией N297G и IgG4 человека.

Исследуют также антитело анти-Abeta с основной цепью IgG4 человека, и антитела мыши анти-HLA человека (класс I) служат в качестве положительного контроля. Результаты показаны на фиг. 9А и 9В. Как ожидалось на основе известной ассоциации между активированием эффекторной клетки и генотипом V/V158 (Bowles and Weiner 2005), активность ADCC более устойчиво демонстрируется донором PBMC V/V158 (оказывается влияние ~45% целевых клеток) по сравнению с донорами FA/158 (оказывается влияние ~25% целевых клеток) (сравните фиг. 9А и фиг. 9В). Антитела анти-TfR/gD с IgG1 дикого типа индуцируют устойчивую ADCC в клетках HEL, в то время как анти-TfR/gD с не содержащим эффекторов IgG1 не показывают никакой активности ADCC в клетках HEL, воспроизводя результаты из первого набора экспериментов. Отметим, что при концентрациях 100 нг/мл или выше, антитела анти-TfR/gD изотипа IgG4 показывают умеренную активность ADCC. Эта активность не наблюдается в результатах для IgG4 анти-Abeta, показывая, что для ADCC активности требуется связывание TfR. Эти данные коррелируют с предыдущими сообщениями, что IgG4 имеет минимальную, но измеримую эффекторную функцию (Adolfsson et al., J. Neurosci. 32(28):9677-9689 (2012); van der Zee et al. Clin Exp. Immunol. 64:415-422 (1986)); Tao et al., J. Exp. Med. 173:1025-1028 (1991)).

Пример 5. Оценка *in vivo* биспецифичных антител анти-TfR человека/BACE1.

А. Фармакокинетические, фармакодинамические исследования и исследования безопасности.

Для оценки концентраций лекарственных средств, эффектов фармакодинамики и безопасности биспецифичных антител анти-TfR человека *in vivo*, обезьяны циномогус (*Macaca fascicularis*) дозируются биспецифичными антителами с использованием клона 15G11 антитела анти-TfR, спаренного с таким же плечом анти-BACE1, как используется в предыдущих примерах (анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1), или клоном 15G11.LC92A, спаренным с таким же плечом анти-BACE1, как используется в предыдущих примерах (анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1) или Hu15G11.N52A (анти-TfR<sup>52A</sup>/BACE1) и Hu15G11.T<sup>53A</sup> (анти-TfR<sup>53A</sup>/BACE1). Эти биспецифичные антитела имеют формат IgG1 человека с мутациями N297G или D265A и N297G, аннулирующими эффекторную функцию, как описано ранее. В качестве контроля используют молекулу анти-gD на IgG1 человека. Это исследование осуществляют на приматах, отличных от человека, поскольку кросс-реактивность этих антител анти-TfR ограничивается приматами, отличными от человека, и людьми. В дополнение к этому исследования показали, что механизмы переноса лекарственных средств между отделами спинно-мозговой жидкости (CSF) и плазмы могут быть сходными между людьми и приматами (Porlack et al., 1977). Антитела вводятся с помощью однократной внутривенной (IV) инъекции болюса в сафенную вену в дозе 30 мг/кг здоровым обезьянам циномогус со стационарно установленными катетерами в мозжечково-мозговой цистерне. В различные моменты времени до 60 дней после дозирования отбирают образцы плазмы, сыворотки и (CSF). Анализ образцов включает гематологию (цельной крови), клиническую химию (сыворотки), концентрацию антитела (сыворотки и CSF) и фармакодинамическую реакцию на антитело (плазма и CSF). См. фиг. 10 относительно подробной схемы отбора образцов.

Концентрации дозируемых антител в сыворотке и CSF обезьян циномогус измеряют с помощью анализа ELISA с использованием покрытия из антител овцы анти-IgG человека, абсорбированного обезьяной, с последующим добавлением образцов сыворотки, начиная от разбавления 1:100 и заканчивая посредством добавления антитела козы анти-IgG человека, конъюгированного с пероксидазой хрена, абсорбированного обезьяной, для детектирования. Анализ имеет стандартный диапазон кривой 0,78-50

нг/мл и предел детектирования 0,08 мкг/мл. Результаты ниже этого предела детектирования сообщаются как не регистрируемые (LTR).

Фиг. 11А-В показывают результаты фармакокинетического анализа для антител анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1 и анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1. Фармакокинетический профиль для антитела анти-gD является таким, как ожидается для типичного антитела IgG1 человека в обезьянах циномогус со средним выведением 3,98 мл/день/кг. Оба антитела анти-TfR/BACE1 выводятся быстрее чем анти-gD, вероятно, благодаря периферическому выведению, опосредуемому мишенью. Анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1 имеет более быстрое выведение в соответствии с тем, что оно имеет самое высокое сродство связывания с TfR, в то время как анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1 показывает улучшенный фармакокинетический профиль (т.е. более длительное экспонирование в сыворотке) по сравнению с анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1, вероятно, благодаря его пониженному сродству к TfR. Выведение для анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1 и анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1 составляет 18,9 мл/день/кг и 8,14 мл/день/кг соответственно. Все антитела детектируются в CSF приблизительно при одной тысячной от концентрации в сыворотке. Однако имеется высокий разброс и, в целом, детектируемых различий в концентрации антител в CSF между молекулами нет.

Таблица 10

Средние ( $\pm$ SD) оценки параметра PK для всех исследуемых антител после однократного внутривенного введения дозы болуса при 30 мг/кг обезьянам циномогус (n=5)

Антитело	AUC <sub>all</sub> (день * мкг/мл)	AUC <sub>inf</sub> (день * мкг/мл)	C <sub>max</sub> (мкг/мл)	CL (мл/день/кг)	V <sub>ss</sub> (мл/кг)
анти-gD	7640 $\pm$ 1790	7930 $\pm$ 1910	912 $\pm$ 141	3,98 $\pm$ 1,05	51,3 $\pm$ 10,2
анти-TfR <sup>1</sup> /BACE1	1610 $\pm$ 240	1610 $\pm$ 237	809 $\pm$ 132	18,9 $\pm$ 2,54	41,0 $\pm$ 8,18
анти-TfR <sup>2</sup> /BACE1	3750 $\pm$ 528	3750 $\pm$ 530	850 $\pm$ 69,2	8,14 $\pm$ 1,21	41,2 $\pm$ 6,06

SD = стандартное отклонение; IV = внутривенно; AUC<sub>all</sub> = площадь под кривой концентрация-время от времени 0 до времени последней измеряемой концентрации; AUC<sub>inf</sub> = площадь под кривой концентрация-время, экстраполированной до бесконечности; C<sub>max</sub> = наблюдаемая максимальная концентрация в сыворотке; CL = выведение; V<sub>ss</sub> = объем распределения в стационарном состоянии; min = минимум, max = максимум.

Фиг. 19 показывает результаты фармакокинетического анализа для антител анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1, анти-TfR<sup>52A</sup>/BACE1 и анти-TfR<sup>53A</sup>/BACE1. Все антитела анти-TfR/BACE1 выводятся быстрее, чем анти-gD, вероятно, благодаря периферическому выведению, опосредуемому мишенью. Анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1 показывает самое быстрое выведение, соответствующее тому, что оно имеет самое высокое сродство связывания с TfR, в то время как анти-TfR<sup>52A</sup>/BACE1 и анти-TfR<sup>53A</sup>/BACE1 показывают улучшенный фармакокинетический профиль (т.е. более длительное экспонирование в сыворотке) по сравнению с анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1, вероятно, благодаря пониженному сродству к TfR у анти-TfR<sup>52A</sup>/BACE1 и анти-TfR<sup>53A</sup>/BACE1.

Чтобы увидеть фармакодинамическое воздействие в ответ на дозирование анти-TfR/BACE1, авторы измеряли уровни A $\beta$ <sub>1-40</sub> и sAPP $\alpha$  и A $\beta$ PP $\beta$  в плазме и CSF обезьян циномогус. A $\beta$ <sub>1-40</sub> измеряют с помощью ELISA с использованием специфичного поликлонального покрытия из антител анти-A $\beta$ <sub>1-40</sub>, с последующим добавлением образцов и заканчивают добавлением моноклонального антитела мыши анти-A $\beta$ <sub>1-40</sub> человека, конъюгированного с пероксидазой хрена, для детектирования. Анализ имеет предел детектирования 60 пг/мл для плазмы и 140 пг/мл для CSF. Результаты ниже этой концентрации считаются не детектируемыми (LTR). Концентрации в CSF sAPP $\alpha$  и sAPP $\beta$  определяют с использованием мультиспотового анализа sAPP $\alpha$ /sAPP $\beta$  (Mesoscale Discovery (Gaithersburg, MD)). CSF оттаивают на льду, затем разбавляют 1:10 в 1% BSA в TBS-T (10 mM Tris буфера, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20). Анализ осуществляют согласно протоколу производителя. Анализ имеет нижний предел значений количественного определения 0,05 нг/мл для sAPP $\alpha$  и 0,03 нг/мл для sAPP $\beta$ .

Фиг. 12А-Е приводят сводку фармакодинамического поведения антител. На периферии уровни A $\beta$ <sub>1-40</sub> в плазме остаются неизменными после введения анти-gD, но транзитивно уменьшаются после введения анти-TfR/BACE1. Оба варианта понижают уровни A $\beta$ <sub>1-40</sub> в плазме при максимальном ингибировании 50%, достигаемом через 1 день после дозирования.

Уровни A $\beta$ <sub>1-40</sub> в плазме постепенно восстанавливаются, при этом животные, получающие анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1, возвращаются к фоновым уровням A $\beta$ <sub>1-40</sub> примерно через 14 дней после дозирования. Уровни A $\beta$ <sub>1-40</sub> возвращаются к фоновым уровням в пределах между 21 и 30 днями после дозирования у животных, которых лечат анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1. Оба антитела анти-TfR/BACE1 понижают уровни A $\beta$ <sub>1-40</sub> в CSF, при этом изменений не наблюдается у животных, которым дозируют анти-gD. Введение анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1 дает в результате более значительное уменьшение уровней A $\beta$ <sub>1-40</sub> в CSF (среднее максимальное ингибирование 50% от фонового), чем для анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1 (среднее максимальное ингибирование 20% от фонового). Продукция sAPP $\beta$  ингибируется у животных, леченых анти-TfR/BACE1,

но не у животных, которые получали анти-gD. Подобно результатам для A $\beta$ <sub>40</sub> анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1 имеет более сильное ингибиторное воздействие на продуцирование sAPP $\beta$ , чем анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1, продуцирование sAPP $\alpha$  стимулируется во время ингибирования BACE1 как анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1, так и анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1, и реакция имеет обратную корреляцию с уровнем ингибирования, наблюдаемым для sAPP $\beta$  и A $\beta$ <sub>1-40</sub>. sAPP $\alpha$  и sAPP $\beta$  представляют собой первичные продукты процессирования белка предшественника амилоида (APP), и их уровни сильно скоррелированы. Отношение sAPP $\beta$ /sAPP $\alpha$  нормирует результаты на потенциальные изменения в фоновом экспрессировании APP или потенциальные преданалитические различия при сборе CSF и манипуляциях с ней в ходе исследований. Отношение sAPP $\beta$ /sAPP $\alpha$  в CSF с анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1 демонстрирует более устойчивый эффект PD, чем анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1. Таким образом, эти результаты поддерживают вовлеченность мишени (т.е. BACE1) для антител анти-TfR/BACE1.

Реакция PD для антител анти-TfR<sup>52A</sup>/BACE1 и анти-TfR<sup>53A</sup>/BACE1 также коррелирует с продолжительностью экспонирования антитела и понижением сродства плеча к TfR показывает увеличение уменьшения A $\beta$ <sub>40</sub> (данные не показаны). Эти данные также поддерживают вовлеченность мишени в этих биспецифичных антителах.

В целом, эти результаты говорят, что биспецифичное антитело анти-TfR/BACE1 со сродством к TfR человека в пределах между сродством анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1 и анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1, вероятно, имело бы желаемый фармакокинетический/фармакодинамический баланс.

В настоящем исследовании не наблюдается никаких сигналов относительно безопасности. Нет никаких доказанных воздействий на любые параметры гематологии или клинической химии для обезьян, получающих 30 мг/кг любого введенного биспецифичного антитела, до 60 дней после дозирования. Важно, что уровни ретикулоцитов остаются неизменными при лечении либо анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1, либо анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1 (фиг. 13), как и ожидалось, поскольку эти антитела имеют ослабленную эффекторную функцию, и средний уровень циркулирующих ранних ретикулоцитов с высокими уровнями TfR у нормальных приматов является очень низким (см. пример 4).

Пример 6. Оценка биспецифичных антител анти-TfR/BACE1 человека *in vivo*.

Для исследования соотношения между фармакодинамикой антитела в CSF и фармакокинетикой в головном мозге обезьянам циномоглус (Macaca fascicularis) дозируют биспецифичные антитела анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1 или анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1, как в предыдущем примере. Эти биспецифичные антитела имеют формат IgG1 человека с мутациями D265A и N297G, аннулирующими эффекторную функцию. В качестве контроля используют молекулу анти-gD на IgG1 человека. Для сравнения авторы также дозируют двухвалентное антитело анти-BACE1, которое представляет собой такой же клон, как используется для биспецифичных антител. Антитела вводятся посредством однократной внутривенной (IV) инъекции болюса в сафенную вену в дозе 30 мг/кг здоровым обезьянам циномоглус со стационарно установленными катетерами в мозжечково-мозговой цистерне. Фоновые образцы CSF собирают за 24 и 48 ч перед дозированием, и другой образец CSF собирают через 24 ч после дозирования (как показано схематически на фиг. 14). После сбора CSF через 24 ч после дозирования осуществляют вливание солевого раствора животным, и головной мозг собирают для анализа концентрации антитела. Различные области головного мозга гомогенизируют в 1% NP-40 (Cal-Biochem) в PBS, содержащем таблетки полного мини-коктейля ингибиторов протеаз, не содержащего EDTA (Roche Diagnostics). Гомогенизированные образцы головного мозга вращают при 4°C в течение 1 ч перед центрифугированием при 14000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант изолируют для измерения уровней антитела в головном мозге с использованием способа ELISA, описанного в предыдущем примере. Кровь также собирают для подтверждения периферического экспонирования и реакций фармакодинамики, которые являются сходными с наблюдениями авторов в примере 5.

Фармакодинамические воздействия анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1 и анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1, как оценивается, в CSF также являются сходными с эффектами, наблюдаемыми в предыдущем примере. Фиг. 15 демонстрирует, что отношение sAPP $\beta$ /sAPP $\alpha$  в CSF устойчиво уменьшается после дозирования анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1. Анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1 не показывает явного уменьшения через 24 ч после дозирования при этих исследованиях. Анти-BACE1 также не показывает воздействия. Анализ концентраций антитела в головном мозге показывает, что как контрольный IgG, так и антитело анти-BACE1 имеют ограниченное потребление в головном мозге при уровнях, которые чуть превышают предел детектирования в анализе авторов (в среднем ~670 пМ). Анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1 имеет в ~3 раза улучшенное потребление в головном мозге по сравнению с контрольным IgG (в среднем ~2 нМ), и анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1 имеет наилучшее потребление в головном мозге, в ~15 раз больше, чем контрольный IgG (в среднем ~10 нМ). Концентрации антитела в головном мозге для различных антител коррелируют с реакцией фармакодинамики, наблюдаемой в CSF в исследованиях авторов, при этом анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1 имеет наилучшее потребление в головном мозге и наиболее устойчивое воздействие фармакодинамики, и анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1 имеет меньшее потребление в головном мозге и более умеренное воздействие.

Эти результаты расширяют предыдущие данные авторов, демонстрируя, что биспецифичные антитела, связывающие TfR, улучшают потребление в головном мозге приматов, отличных от человека. У приматов, как и мышей, вероятно, имеется оптимальное сродство к TfR, которое лучше всего балансирует

ет потребление в головном мозге и выведение, опосредуемое TfR. В примере авторов, анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1 с более высоким сродством демонстрирует хорошее потребление в головном мозге, и на него влияет периферическое выведение, опосредуемое мишенью. TfR<sup>2</sup>/BACE1 с уменьшенным сродством имеет улучшенные свойства при выведении, но, видимо, имеет настолько низкое связывание с TfR, что не может эффективно переноситься с помощью TfR (в основном таким же путем, когда имеющее низкое сродство антитело анти-TfR TfR<sup>E</sup> в патенте США US 2012/0171120 переходит через некоторый порог сродства, за которым сродство является слишком низким, чтобы сделать возможным достаточное взаимодействие между антителом и TfR так, что антитело оставалось бы ассоциированным с TfR, когда TfR начинает процесс транслокации). По результатам этого эксперимента биспецифичное антитело анти-TfR/BACE1 человека/цино, имеющее сродство к TfR в пределах между TfR<sup>1</sup> и TfR<sup>2</sup>, согласно предсказаниям, должно иметь улучшенные свойства потребления и выведения по сравнению либо с анти-TfR<sup>1</sup>/BACE1, либо с анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1 в этой системе.

Пример 7. Создание дополнительных не содержащих эффекторов мутаций в контексте биспецифичного антитела рецептора трансферрина.

Другие мутации в Fc области, которые аннулируют эффекторную функцию, в дополнение к N297G и D26A, исследуются на их способность уменьшать или предотвращать обеднение TfR-экспрессирующих ретикулоцитов. Конкретно, Fc мутации L234A, L235A и P329G ("LALAPG"), которые описаны в публикации заявки на патент США № 2012/021531, которая включается в настоящий документ в качестве ссылки, вводятся в антитело анти-TfR<sup>D</sup>/BACE1 (которое описано в публикации международной заявки на патент № 2013/177062, и которая включается в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте).

Фармакокинетический анализ и количество ретикулоцитов после однократного введения антитела мышам осуществляют следующим образом.

Самки мышей C57B/6 дикого типа в возрасте 6-8 недель используются для всех исследований. Уход за животными осуществляется в соответствии с официальными инструкциями. Мышам дозируют внутривенно однократную дозу 50 мг/кг либо антитела анти-gD (IgG2a мышиных) с мутациями LALAPG, антитела анти-TfR<sup>D</sup>/BACE1 (химера крысы/мышиных) с мутациями LALAPG. Общий объем инъекции не превышает 250 мкл и антитела разбавляют в D-PBS, при необходимости (Invitrogen). Через 24 ч цельную кровь собирают перед вливанием в пробирки микроконтейнеры с EDTA (BD Diagnostics), дают возможность для оседания в течение 30 мин при комнатной температуре и центрифугируют при 5000xg в течение 10 мин. Верхний слой плазмы переносят в новые пробирки для измерений антитела.

Общие концентрации антитела в плазме мышей измеряют с использованием для ELISA антитела анти-IgG2a мыши (аллотип а)/антитела анти-IgG2a мыши (аллотип а). 384-луночные иммуопланшеты Maxisorp NUNC (Neptune, NJ) покрывают антителом мыши анти-IgG2a мыши, аллотип А, антителом, специфичным к аллотипу А (BD/Pharmingen San Jose, CA), в течение ночи при 4°C. Планшеты блокируются с помощью PBS, 0,5% BSA в течение 1 ч при 25°C. Каждое антитело (анти-gD и биспецифичные варианты анти-TfR/BACE1) используют в качестве стандарта для количественного определения концентрации антитела. Планшеты промывают PBS, 0,05% Tween-20 с использованием устройства для промывки для микропланшетов (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT), и стандарты и образцы, разбавленные в PBS, содержащем 0,5% BSA, 0,35M NaCl, 0,25% CHAPS, 5 mM EDTA, 0,2% BgG, 0,05% Tween-20 и 15 м.д. Proclin® (Sigma-Aldrich), добавляют в течение 2 ч при 25°C. Связанное антитело детектируют с помощью биотин-конъюгированного антитела мыши анти-IgG2a мыши, аллотип А, антитела специфичного к аллотипу А (BD/Pharmingen San Jose, CA). Связанное антитело, конъюгированное с биотином, детектируют с помощью стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). Образцы проявляют с использованием 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) (KPL, Inc., Gaithersburg, MD) и коэффициент поглощения измеряют на 450 нМ с помощью устройства для считывания Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Hudson, NH). Концентрации определяют из стандартной кривой с использованием программы четырехпараметрической нелинейной регрессии. Анализ имеет нижний предел значения количественного определения (LLOQ) 78,13 нг/мл в плазме. Статистический анализ различий между экспериментальными группами осуществляют с использованием двуххвостного непарного t-теста.

При введении антител анти-TfR<sup>D</sup>/BACE1, содержащих мутации Fc LALAPG, мыши не демонстрируют клинических симптомов, как наблюдалось ранее с использованием антител с полной эффекторной функцией. См. Couch et al., *Sci. Trans. Med.* 5:183ra57 (2013). Фиг. 20 показывает результаты фармакокинетического анализа.

В дополнение к этому количество незрелых ретикулоцитов и ретикулоцитов в целом определяют с использованием Sysmex XT2000iV (Sysmex, Kobe, Japan) в соответствии с инструкциями производителей. Через 24 ч после дозирования не наблюдается различий в доле незрелых ретикулоцитов или в общем количестве ретикулоцитов по сравнению с любым исследуемым антителом, как видно на фиг. 21. Эти результаты говорят о том, что мутация LALAPG не только аннулирует эффекторную функцию антитела, но также уменьшает связывание комплемента и опосредуемое комплементом выведение ретикулоцитов, видное даже для не содержащего эффектора каркаса антитела (Couch et al. 2013). Это соответствует дру-

гому сообщению о том, что включение мутации LALA в IgG1 человека может ограничивать связывание комплемента (Hessell et al. Nature 449:101-104 (2007)).

Пример 8. Получение биспецифичных вариантов FcRn<sup>HIGH</sup>.

Для увеличения времени полужизни биспецифичных антител и, тем самым, потенциального увеличения концентрации антитела в головном мозге получают биспецифичные варианты, содержащие мутации в постоянном домене IgG, а конкретно, в домене, связывающемся с Fc рецептором новорожденных (FcRn) (мутации FcRn<sup>HIGH</sup>). Домен связывания FcRn участвует в переносе антител от матери к плоду. См. Story et al., J. Exp. Med., 180:2377-2381, 1994. Замещения аминокислот в домене связывания FcRn увеличивает сродство постоянного домена к FcRn, увеличивая тем самым время полужизни антитела.

Мутации домена связывания FcRn M252Y, S254T и T256E (YTE), как описано, увеличивают связывание FcRn и, таким образом, увеличивают время полужизни антител. См. опубликованную заявку на патент США № 2003/0190311 и Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281:23514-23524 (2006). В дополнение к этому мутации домена связывания FcRn N434A и Y436I (AI), как описано, также увеличивают связывание FcRn. См. Yeung et al., J. Immunol. 182:7663-7671 (2009). Мутации YTE (M252Y/S254T/T256E) и AI (N434A/Y436I) включены в биспецифичные антитела, как анти-TfR<sup>S2A</sup>/BACE1, так и анти-TfR<sup>2</sup>/BACE1, содержащие либо WT IgG1 человека, либо не содержащие эффекторов мутации LALAPG или N297G. В дополнение к этому мутации FcRn<sup>HIGH</sup> осуществляют в антителе hIgG1 анти-gD в качестве контроля. Мутации конструируют с использованием мутагенеза по Кункелю, антитела экспрессируются транзитивно в клетках CHO, и белки очищаются с использованием хроматографии на белке А с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC).

Связывание вариантов антител FcRn<sup>HIGH</sup> с FcRn измеряется с использованием BIAcore. Белки FcRn человека и обезьяны циномоглус экспрессируются в CHO и очищаются с использованием аффинной хроматографии на IgG. Данные получают на инструменте BIAcore T200. Сенсорный чип серии S CM5 (GE Healthcare, Cat. BR100530) активируют с помощью реагентов EDC и NHS в соответствии с инструкциями поставщика, и антитело анти-Fab (Human Fab capture kit, GE Health care Bio-science. AB SE-7 184, Uppsala, Sweden) связывают с получением приблизительно 10000 единиц отклика (RU), с последующей блокировкой непрореагировавших групп с помощью 1 метаноламина. Для измерений сродства сначала осуществляют инъекцию антител при скорости потока 10 мкл/мин, для захвата приблизительно 1000 RU на 3 различных проточных ячейках (FC), за исключением FC1 (для сравнения), а затем инъецируют 2-кратные последовательные разбавления FcRn человека (или FcRn цино) в буфере pH6 (0,1M фосфат натрия), от низких концентраций (1 нМ) до высоких (25 мкМ) (скорость потока: 30 мкл/мин), одно за другим, в одном и том же цикле без регенерации между инъекциями. Регистрируют сенсограммы и осуществляют вычитание для сравнения и буфера перед оценкой с использованием BIAcore T200 Evaluation Software (version 2,0). Сродство определяют посредством анализа уровня связывания в стационарном состоянии на основании модели связывания 1:1. Сродство связывания для вариантов LALAPG, N297G, LALAPG.YTE и LALAPG.AI антитела анти-TfR<sup>S2A</sup>/BACE1 показаны в табл. 11 ниже. Данные показывают, что варианты FcRn<sup>HIGH</sup> увеличивают сродство при эндосомальных условиях (pH 6) к FcRn как человека, так и цино.

Таблица 11

Антитело	Эффекторная функция	FcRn High	FcRn человека	FcRn цино
			KD при pH6 (мкМ)	KD при pH6 (мкМ)
Анти-TfR.52A/BACE1.hlgG1	WT	WT		
Анти-TfR.52A/BACE1.hlgG1.N297G	N297G	WT	1,3	2,1
Анти-TfR.52A/BACE1.hlgG1.LALAPG	LALAPG	WT	0,8	1,2
Анти-TfR.52A/BACE1.hlgG1.N297G.YTE	N297G	YTE		
Анти-TfR.52A/BACE1.hlgG1.LALAPG.YTE	LALAPG	YTE	0,2	0,2
Анти-TfR.52A/BACE1.hlgG1.N297G.AI	N297G	N434A/Y436I		
Анти-TfR.52A/BACE1.hlgG1.LALAPG.AI	LALAPG	N434A/Y436I	0,6	0,4
Анти-TfR.52A/BACE1.hlgG1.N297G.A	N297G	N434A		
Анти-TfR2/BACE1.hlgG1.N297G	N297G	WT	1,7	2,1
Анти-TfR2/BACE1.hlgG1.LALAPG	LALAPG	WT	1,1	1,2
Анти-TfR2/RAP.E1.hlgG1.LALAPG.YTE	LALAPG	YTE	0,3	0,2
Анти-gG.hlgG1	WT	WT	0,7	0,9
Анти-gG.hlgG1.YTE	WT	YTE		
Анти-gG.hlgG1.AI	WT	N434A/Y436I	0,3	0,4
Анти-gG.hlgG1.A	WT	N434A	0,1	0,7

Выбранные варианты FcRn<sup>HIGH</sup> будут исследоваться на обезьянах циномоглус для определения то-

го, может ли повышение сродства к FcRn улучшить фармакокинетические свойства и/или увеличить экспонирование для головного мозга антитела анти-TfR/BACE1.

Для оценки безопасности мутаций, не имеющих эффекторов, и мутаций FcRn<sup>HIGH</sup>, определенные биспецифичные антитела вводятся мышам, нокаутированным рецептором трансферрина человека, которые экспрессируют рецептор трансферрина человека. Мыши, нокаутированные huTfR, генерируются следующим образом.

Конструкт для нацеливания cDNA TfR человека на locus C57BL/6 Tfrс в клетках ES получают с использованием сочетания методик рекомбинирования (Warming et al. *Molecular and Cellular Biology* vol. 26 (18), pp. 6913-22 2006; Liu et al. *Genome Research* (2003) vol. 13 (3), pp. 476-84) и стандартных методик молекулярного клонирования.

Вкратце, кассета (cDNA TfR человека, SV40 pA и frt-PGK-em7-Neo-BGHpA-frt), фланкированная с помощью коротких гомологических групп с геном Tfrс мыши, используется для модификации Tfrс C57BL/6J BAC (библиотека RP23 BAC) посредством рекомбинирования. Кассета cDNA TfR человека вставляется в эндогенную ATG, и остаток экзона 2 Tfrс плюс начала интрона 2 удаляется. Целевая область в BAC затем возвращается в pBlight-TK (Warming et al. *Molecular and Cellular Biology* vol. 26 (18), pp. 6913-22 2006) вместе с фланкирующими геномными последовательностями Tfrс в качестве гомологичных плечей для нацеливания на клетки ES. Конкретно, 5' гомологичное плечо, 2950 bp, соответствует (сборке NCBI37/mm9): chr.16:32,610,333-32,613,282 и 3' гомологичное плечо, 2599 bp, соответствует chr.16:32, 613, 320-32, 615, 918. Конечный вектор подтверждается посредством секвенирования ДНК.

Вектор Tfrс/TFRC KI линейризуется с помощью NotI и C57BL/6N C2 и нацеливается на клетки ES с использованием стандартных способов (6418-положительная и ганцикловир-отрицательная селекция). Положительные клоны идентифицируются с использованием PCR и анализа TaqMan и подтверждаются посредством секвенирования модифицированного локуса. Правильно нацеленные клетки ES трансфицируются плазмидой F1ре для удаления Neo, и затем клетки ES вводятся как инъекция в бластоцисты с использованием стандартных методик. Зародышевую передачу получают после скрещивания полученных в результате химер с самками C57BL/6N.

Конкретно, антитела, перечисленные в таблице, ниже, вводят мышам, нокаутированным huTfR, в виде однократной дозы 50 мг/кг и через 24 ч извлекают кровь и исследуют ретикулоциты, huIg1, N297G.

Таблица 12

Антитело	Изотип	Количество мышей
Анти-gD	hulg1, N297G	6
анти-TfR <sup>52A</sup> /BACE1	hulgG1, N297G	6
<b>ант-TfR<sup>52A</sup>/BACE1</b>	hulgG1, LALAPG	6
<b>анти-TfR<sup>52A</sup>/BACE1</b>	hulgG1, LALAPG/YTE	6
<b>анти-TfR<sup>52A</sup>/BACE1</b>	hulgG1, LALAPG/AI	6

После введения антител анти-TfR<sup>52A</sup>/BACE1 LALAPG, LALAPG/YTE или LALAPG/AI (группы 3-5 в табл. 12), мыши, нокаутированные TfR человека, не проявляют клинических симптомов или потери ретикулоцитов (фиг. 22), как наблюдалось ранее с использованием антител анти-TfR с полной эффекторной функцией (Couch et al. 2013). Эти результаты показывают, что включение мутаций LALAPG в каркас IgG1 человека также аннулирует эффекторную функцию и, кроме того, говорит, что добавление мутаций либо YTE, либо AIFcRn<sup>HIGH</sup> не влияет отрицательно на желаемые свойства мутаций LALAPG, чтобы сделать антитело не содержащим эффекторов.

Осуществляют также анализы ADCC для подтверждения не содержащего эффекторов статуса сочетаний мутаций LALAPG, LALAPG/YTE и LALAPG/AI в линии клеток, полученных от человека. Как и ранее, линия клеток эритролейкемии человека (HEL, ATCC) используется в качестве клеток мишени с PBMC от здоровых доноров людей, несущих либо генотип F/V158, либо генотип FcγRIIIA V/V158. Генотип V/V158 также включается в настоящий анализ из-за известной ассоциации с увеличением активности ADCC, опосредуемой NK клетками, а также способности связывать антитела IgG4 (Bowles and Weiner, 2005; Bruhns et al. 2008). Клетки считают, и их жизнеспособность определяется с помощью Vi-CELL® (Beckman Coulter; Fullerton, CA), следуя инструкциям производителя.

PBMC изолируют с помощью центрифугирования в градиенте плотности с использованием пробирок для разделения крови Uni-Sep™ (Accurate Chemical & Scientific Corp.; Westbury, NY). Целевые клетки в 50 мкл среды для анализа (RPMI-1640 с 1% BSA и 100 единиц/мл пенициллина и стрептомицина) высевают в 96-луночный круглодонный планшет при 4×10<sup>4</sup>/лунка. Последовательные разбавления исследуемых и контрольных антител (50 мкл/лунка) добавляют в планшеты, содержащие целевые клетки, с последующим инкубированием при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 30 мин, чтобы сделать возможной опсонизацию. Конечные концентрации антител в пределах от 0,0051 до 10000 нг/мл измеряют после 5-кратных последовательных разбавлений в целом для 10 моментов времени. После инкубирования 1,0×10<sup>6</sup> эффекторных клеток PBMC в 100 мкл среды для анализа добавляют в каждую лунку для получения отношения

эффекторные клетки : целевые клетки 25:1, и планшеты инкубируют в течение дополнительных 4 ч. Планшеты центрифугируют в конце инкубирования и супернатанты исследуют на активность лактатдегидрогеназы (LDH) с использованием Cytotoxicity Detection Kit™ (Roche Applied Science; Indianapolis, В). Реакционную смесь с LDH добавляют к супернатантам, и планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин при постоянном встряхивании. Реакцию завершают с помощью 1М Н<sub>3</sub>Р<sub>4</sub>, и коэффициент поглощения измеряют при 490 нМ (фон, измеренный при 650 нМ, вычитают для каждой лунки) с использованием считывающего устройства для микропланшетов SpectraMax Plus. Коэффициент поглощения лунок, содержащих только целевые клетки, служит в качестве контроля для фона (низкий контроль), в то время как лунки, содержащие целевые клетки, лизированные с помощью Triton-X100, обеспечивают максимальный доступный сигнал (высокий контроль). Независимую от антитела клеточную цитотоксичность (АІСС) измеряют в лунках, содержащих целевые и эффекторные клетки без добавления антитела. Доля конкретных АDCC вычисляется следующим образом:

$$\% \text{ ADCC} = 100 \times \frac{A_{490} (\text{образец}) - A_{490} (\text{АІСС})}{A_{490} (\text{высокий контроль}) - A_{490} (\text{низкий контроль})}$$

Значения АDCC разбавлений образца изображают в виде графика зависимости от концентрации антитела, и кривые доза-реакция подгоняют к четырехпараметрической модели с использованием SoftMax Pro.

Результаты анализа АDCC показаны на фиг. 23. Как и ожидалось, эффектор-положительное антитело анти-TfR человека (анти-TfR<sup>1</sup>/gD IgG1 WT) демонстрирует значительную активность АDCC на клетках HEL. В противоположность этому варианты антитела анти-TfR<sup>52A</sup>/BACE1, содержащие мутации LALAPG, LALAPG/YTE или LALAPG/AI, не демонстрируют никакой активности АDCC на клетках HEL, подобно отрицательному контролю, антителу анти-TfR<sup>52A</sup>/gD N297G.

Хотя изложенное выше настоящее изобретение описано в некоторых подробностях в качестве иллюстрации и примера для целей ясности понимания, описания и примеры не должны рассматриваться как ограничивающие рамки настоящего изобретения. Описание всей патентной и научной литературы, цитируемой в настоящем документе, в явном виде включается во всей его полноте в качестве ссылок.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или фрагмент антитела, которое связывается с рецептором трансферрина человека (TfR), где антитело или фрагмент антитела содержит HVR-H1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, HVR-H2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 156, HVR-H3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 55, HVR-L1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 50, HVR-L2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51 и HVR-L3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52.

2. Антитело или фрагмент антитела по п.1, где антитело или фрагмент антитела связывается с TfR приматов.

3. Антитело или фрагмент антитела по п.1 или 2, где антитело или фрагмент антитела не ингибирует связывание трансферрина с TfR.

4. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-3, которое представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент.

5. Антитело или фрагмент антитела по п.4, которое представляет собой гуманизованное антитело или его фрагмент.

6. Антитело или фрагмент антитела по п.4, которое представляет собой химерное антитело или его фрагмент.

7. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-6, где антитело или фрагмент антитела содержит:

а) VH с последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153; или

б) VL с последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 105; или

с) VH с последовательностью, как указано в (а), и VL с последовательностью, как указано в (б); или

д) VH с последовательностью с SEQ ID NO: 153; или

е) VL с последовательностью с SEQ ID NO: 105; или

ф) VH с последовательностью, как указано в (д), и VL с последовательностью, как указано в (е).

8. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-6, содержащее VH с последовательностью SEQ ID NO: 153 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 105.

9. Антитело или фрагмент антитела по п.1, где одно или несколько свойств антитела или фрагмента антитела изменено, что приводит к уменьшению или прекращению воздействия антитела или фрагмента антитела на ретикулоциты и/или к снижению тяжести или исчезновению острых клинических симптомов у индивида, получившего терапию антителом или фрагментом антитела, где одно или несколько свойств

выбраны из эффекторной функции Fc-области антитела и функции активации комплемента антитела, где эффекторная функция и функция активации комплемента снижена или прекращена по сравнению с антителом дикого типа того же изотипа.

10. Антитело или фрагмент антитела по п.9, где антитело или фрагмент антитела связывается с TtR приматов.

11. Антитело или фрагмент антитела по п.9 или 10, где антитело или фрагмент антитела не ингибирует связывание трансферрина с TtR.

12. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.9-11, которое представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент.

13. Антитело или фрагмент антитела по п.12, которое представляет собой гуманизованное антитело или его фрагмент.

14. Антитело или фрагмент антитела по п.13, которое представляет собой химерное антитело или его фрагмент.

15. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.9-14, где антитело или фрагмент антитела содержит:

(a) VH с последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153; или

(b) VL с последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 105, или

(c) VH с последовательностью, как указано в (a), и VL с последовательностью, как указано в (b); или

(d) VH с последовательностью SEQ ID NO: 153; или

(e) VL с последовательностью SEQ ID NO: 105; или

(f) VH с последовательностью, как указано в (d), и VL с последовательностью, как указано в (e).

16. Антитело по любому из пп.9-14, содержащее VH с последовательностью SEQ ID NO: 153 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 105.

17. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.9-16, где эффекторная функция уменьшается или исчезает благодаря способу, выбранному из уменьшения гликозилирования антитела или фрагмента антитела, модификации изотипа антитела до изотипа, который естественным образом обладает пониженной эффекторной функцией или у которого эта функция отсутствует, и модификации Fc-области.

18. Антитело или фрагмент антитела по п.17, где гликозилирование антитела или фрагмента антитела уменьшается благодаря способу, выбранному из получения антитела или фрагмента антитела в условиях, которые препятствуют природному гликозилированию; удаления углеводных групп, уже присутствующих на антителе или фрагменте антитела; и модификации антитела или фрагмента антитела таким образом, что природное гликозилирование не происходило.

19. Антитело или фрагмент антитела по п.18, где Fc-область антитела или фрагмента антитела содержит мутацию в положении 297, такую как замена природного аспарагинового остатка на другую аминокислоту, которая мешает гликозилированию в этом положении.

20. Антитело или фрагмент антитела по п.19, где эффекторная функция уменьшается или исчезает из-за делеции всей или части Fc-области или за счет конструирования антитела или фрагмента антитела, которое не содержит Fc-области или области, отличающейся от Fc-области, отвечающей за эффекторную функцию или функцию активации комплемента.

21. Антитело или фрагмент антитела по п.20, где модификация выбрана из точечной мутации Fc-области для ослабления связывания с одним или несколькими рецепторами Fc, выбранной из следующих положений: 234, 235, 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 и 439; из точечной мутации Fc-области для ослабления связывания с C1q, выбранной из следующих положений: 270, 322, 329 и 321; из удаления части или всей Fc-области и из точечной мутации в положении 132 домена CH1.

22. Антитело или фрагмент антитела по п.21, где модификация представляет собой N297G; D265A и N297A; или D265A и N297G; или L234A, L235A и P329G.

23. Антитело или фрагмент антитела по п.22, где модификация представляет собой L234A, L235A и P329G.

24. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.9-23, где время полужизни антитела повышается посредством модификации в FcRn-связывающемся домене антитела в положении, выбранном из 252, 254, 256, 434 и 436.

25. Антитело или фрагмент антитела по п.24, где модификация представляет собой M252Y, S254T и T256E или N434A и Y436I.

26. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-25, где антитело или фрагмент антитела связано с терапевтическим соединением, где терапевтическое соединение представляет собой лекарственное средство против неврологического расстройства.

27. Мультиспецифическое антитело или фрагмент мультиспецифического антитела, которое связы-

вается с рецептором трансферрина человека (TfR), содержащее первый антиген-связывающий сайт и второй антиген-связывающий сайт, где первый антиген-связывающий сайт содержит HVR-H1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53, HVR-H2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 156, HVR-H3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 55, HVR-L1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 50, HVR-L2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51 и HVR-L3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52, и второй антиген-связывающий сайт мультиспецифического антитела связывается с антигеном головного мозга.

28. Мультиспецифическое антитело или фрагмент мультиспецифического антитела по п.27, где антиген головного мозга выбран из группы, состоящей из  $\beta$ -секретазы 1 (BACE1), A $\beta$ , рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора эпидермального фактора роста человека 2 (HER2), тау, апо-липпротеина E (ApoE),  $\alpha$ -синуклеина, CD20, хантингтина, прионного белка (PrP), обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2), паркина, презенилина 1, презенилина 2,  $\gamma$ -секретазы, рецептора гибели 6 (DR6), белка предшественника амилоида (APP), рецептора p75 нейротрофин (p75NTR) и каспазы 6.

29. Мультиспецифическое антитело или фрагмент мультиспецифического антитела по п.28, где мультиспецифичное антитело или фрагмент мультиспецифического антитела связывается как с TfR, так и с BACE1, или где мультиспецифичное антитело или фрагмент мультиспецифического антитела связывается как с TfR, так и с A $\beta$ .

30. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-26.

31. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая мультиспецифическое антитело или фрагмент мультиспецифического антитела по любому из пп.27-29.

32. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.30 или 31, для продукции антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-29.

33. Способ получения антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-26, включающий культивирование клетки-хозяина по п.32 и восстановление антитела или фрагмента антитела из клетки-хозяина.

34. Способ получения мультиспецифического антитела или фрагмента мультиспецифического антитела по любому из пп.27-29, включающий культивирование клетки-хозяина по п.32 и восстановление мультиспецифического антитела или фрагмента мультиспецифического антитела из клетки-хозяина.

35. Фармацевтический состав для лечения неврологического расстройства, содержащий антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-29 и фармацевтически приемлемый носитель.

36. Применение антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-26 для получения лекарственного препарата для лечения неврологического расстройства, выбранного из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, злокачественного новообразования, глазной болезни, эпилептического расстройства, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления центральной нервной системы (ЦНС).

37. Применение мультиспецифического антитела или фрагмента мультиспецифического антитела по любому из пп.27-29 для получения лекарственного препарата для лечения неврологического расстройства, выбранного из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, злокачественного новообразования, глазной болезни, эпилептического расстройства, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления центральной нервной системы (ЦНС).

38. Применение антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-26 для лечения неврологического расстройства, выбранного из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, злокачественного новообразования, глазной болезни, эпилептического расстройства, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления центральной нервной системы (ЦНС).

39. Применение мультиспецифического антитела или фрагмента мультиспецифического антитела по любому из пп.27-29 для получения лекарственного препарата для лечения неврологического расстройства, выбранного из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, злокачественного новообразования, глазной болезни, эпилептического расстройства, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, расстройства поведения и воспаления центральной нервной системы (ЦНС).

40. Применение антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-26 для переноса одного или нескольких соединений через гематоэнцефалический барьер (BBB).

41. Применение мультиспецифического антитела или фрагмента мультиспецифического антитела по любому из пп.27-29 для переноса одного или нескольких соединений через гематоэнцефалический барьер (BBB).

42. Способ переноса соединения через гематоэнцефалический барьер (BBB) индивида, включаю-

щий введение антитела или фрагмента антитела по любому из пп.26-29, связанного с соединением.

43. Способ повышения воздействия соединения на ЦНС индивида, включающий введение антитела или фрагмента антитела по любому из пп.26-29, связанного с соединением, где антитело или фрагмент антитела усиливает действие соединения на ЦНС.

44. Способ повышения удерживания соединения в ЦНС, включающий введение антитела или фрагмента антитела по любому из пп.26-29 индивиду и, таким образом, повышение удержания соединения в ЦНС индивида.

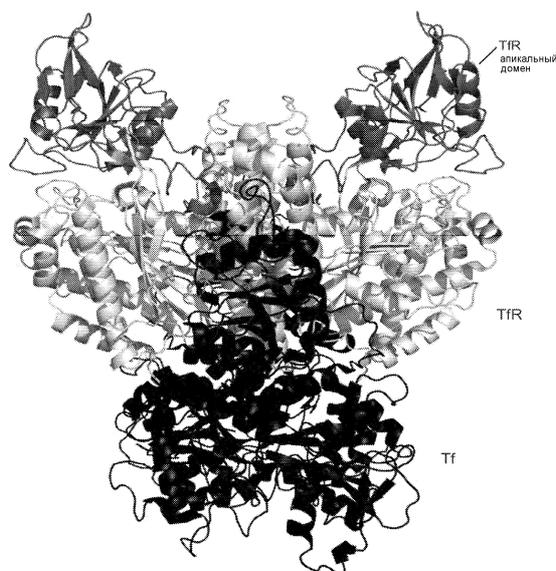
45. Способ лечения неврологического расстройства, выбранного из группы, состоящей из невропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, эпилептического расстройства, расстройства поведения, воспаления и злокачественного новообразования ЦНС, глазной болезни, лизосомной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания или ишемии, связанной с неврологическими симптомами, у млекопитающего, включающий введение антитела или фрагмента антитела по любому из пп.26-29 млекопитающему.

46. Способ по п.45, в котором неврологическим расстройством страдает человек, и величина дозы и/или частота введения индивиду изменяют для уменьшения концентрации антитела или фрагмента антитела, которое влияет на эритроциты индивида.

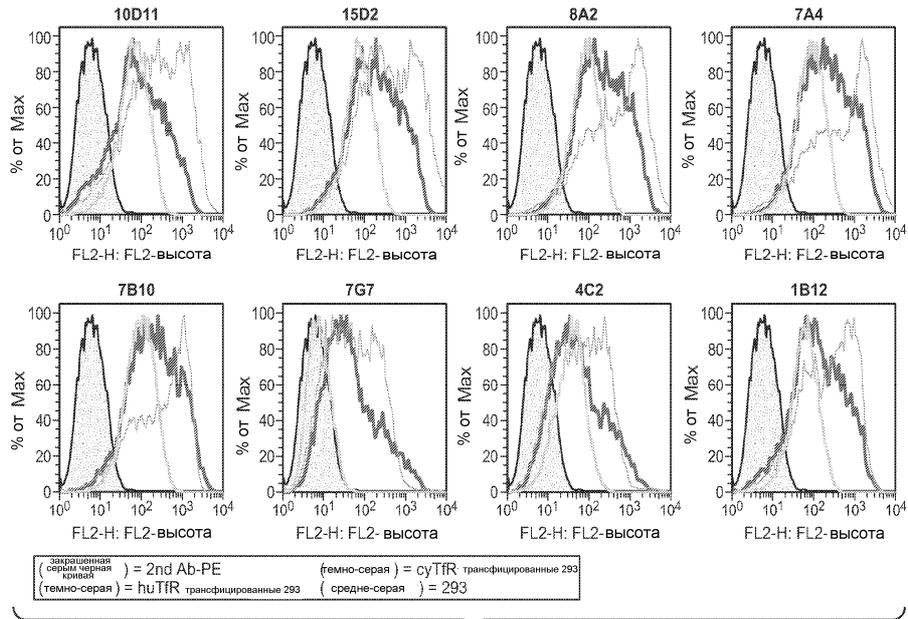
47. Способ по п.46, дополнительно включающий стадию мониторинга уменьшения количества эритроцитов у индивида.

48. Способ по п.46 или 47, в котором антитело или фрагмент антитела, связанные с соединением, вводят в терапевтической дозе, где терапевтическая доза является TfR-насыщающей.

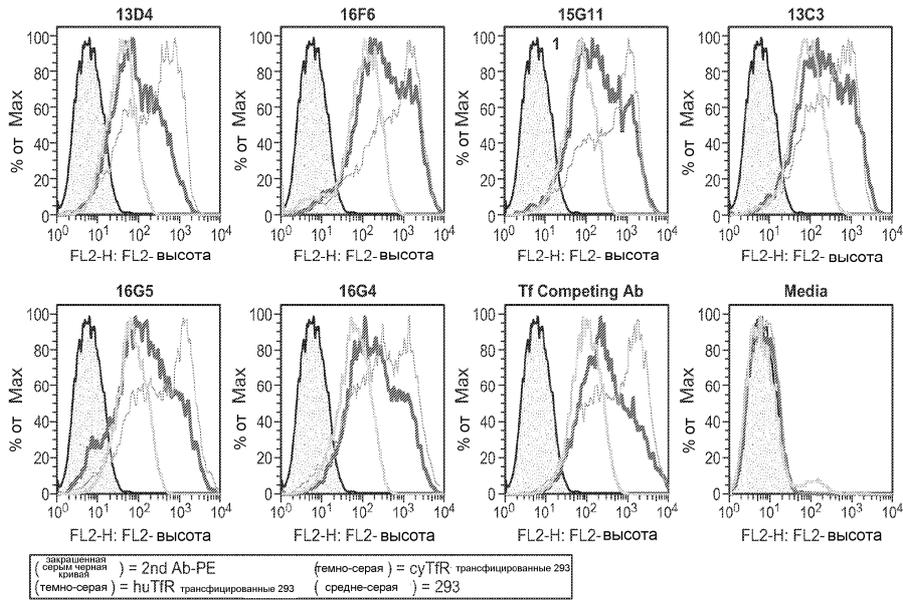
49. Способ по любому из пп.46-48, в котором введение антитела или фрагмента антитела осуществляется в дозе и с частотой введения, калибруемыми для максимального уменьшения острых клинических симптомов, возникающих при введении антитела или фрагмента антитела.



Фиг. 1



Фиг. 2А



Фиг. 2В

характеризация перекрестно-реактивных гибридом анти-TfR человека и обезьян циномолгус, которые не конкурируют с Tf за связывание с TfR

		конкурирует с перекрестно-реактивной с антигеном доменом	huTfR ELISA связывание	Сино TfR ELISA связывание	Висоге гибридомы или химерных IgG							
					huTfR			СиноTfR			Cy/hu KD отношение	
					Ка	Kd	KD	Ка	Kd	KD		
Класс I	7A4	+++	+++	+++	2.11E+06	4.34E-04	2.06E-10	1.06E+06	6.63E-04	6.27E-10	3.04	
	8A2	+++	+++	+++	1.22E+06	2.17E-04	1.79E-10	7.91E+05	7.15E-04	9.04E-10	5.06	
	7A4 HC/8A2 LC	+++	+++	+++	3.01E+06	3.35E-04	1.12E-10	1.32E+06	1.22E-03	9.25E-10	8.29	
	1502	+++	+++	+++								
	10D11	+++	+++	+++	1.66E+05	3.44E-04	2.08E-09	6.46E+04	5.81E-03	8.99E-08	43.32	
Класс II	7B10	+++	+++	+++								
	15G11	+++	+++	+++	8.90E+05	8.83E-04	9.92E-10	1.29E+06	3.35E-03	2.60E-09	2.62	
	13C3	+++	+++	+++								
	16G5	+++	+++	+++								
Класс III	16G4	+++	+++	+++	4.77E+05	1.62E-03	3.40E-09	2.33E+05	5.23E-03	2.24E-08	6.59	
	16F6	+++	+++	+++	1.36E+05	2.81E-04	2.07E-09	1.23E+05	9.13E-04	7.45E-09	3.6	
Класс IV	7G7	-	+++	+++	1.33E+05	6.08E-03	4.57E-08	4.63E+04	1.21E-02	2.62E-07	5.73E	
	4C2	-	+++	+++								
	1B12	-	+++	++	1.36E+05	2.76E-04	2.03E-09	1.34E+05	5.80E-03	4.34E-08	21.35	
	13D4	-	+++	++	9.99E+04	9.49E-04	9.50E-09	7.06E+04	5.98E-04	8.47E-09	0.89	

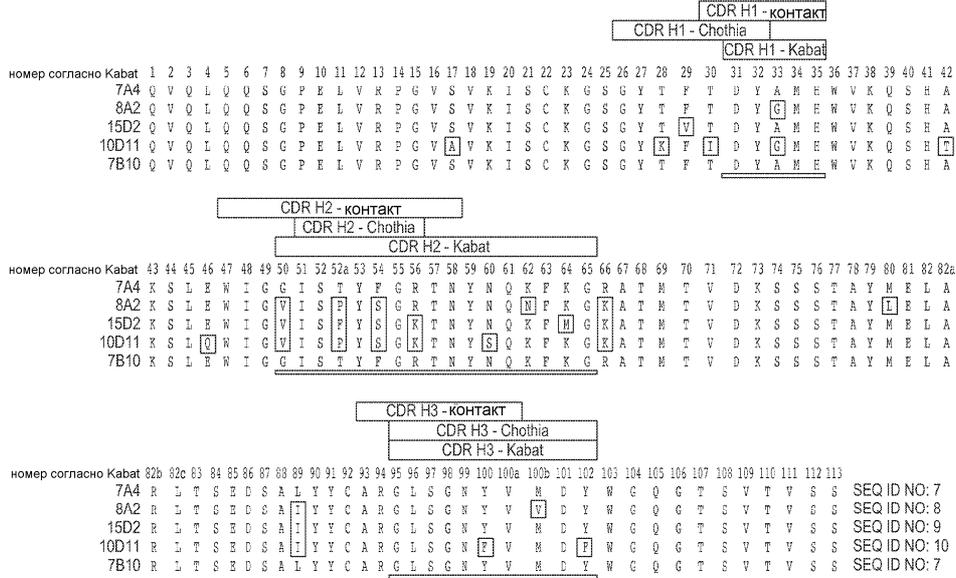
Фиг. 2С

варибельная область легкой цепи

		CDR L1 - контакт	
		CDR L1 - Chothia	
		CDR L1 - Kabat	
номер согласно Kabat	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 27a 27b 27c 27d 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38		
7A4	D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D D Y G N S F M H W Y Q Q		
8A2	D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D S Y G N S F M H W Y Q Q		
15D2	D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D S Y G N S F M H W Y Q Q		
10D11	D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D S Y G P S F M H W Y Q Q		
7B10	D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D D Y G N S F M H W Y Q Q		
		CDR L2 - контакт	
		CDR L2 - Chothia	
		CDR L2 - Kabat	
номер согласно Kabat	39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80		
7A4	K P G Q P P K L L I Y R A S N L E S G I P A R F S G S G S R T D F T L T I N P V E A		
8A2	K P G Q P P K L L I Y R A S N L E S G I P A R F S G S G S R T D F T L T I N P V E A		
15D2	K P G Q P P K L L I Y R A S N L E S G I P A R F S G S G S R T D F T L T I N P V E A		
10D11	K P G Q P P K L L I Y R A S N L E S G I P A R F S G S G S R T D F T L T I N P V E A		
7B10	K P G Q P P K L L I Y R A S N L E S G I P A R F S G S G S R T D F T L T I N P V E A		
		CDR L3 - контакт	
		CDR L3 - Chothia	
		CDR L3 - Kabat	
номер согласно Kabat	81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107		
7A4	D D V A T Y Y C Q Q S N E A P P T F G G G T K L E I R	SEQ ID NO: 4	
8A2	D D V A T Y Y C Q Q S N E G P P T F G G G T K L E I R	SEQ ID NO: 5	
15D2	D D V A T Y Y C Q Q S N E G P P T F G G G T K L E I R	SEQ ID NO: 5	
10D11	D D V A T Y Y C Q Q S N E D P P T F G G G T R L E I R	SEQ ID NO: 6	
7B10	D D V A T Y Y C Q Q S N E A P P T F G G G T K L E I R	SEQ ID NO: 4	

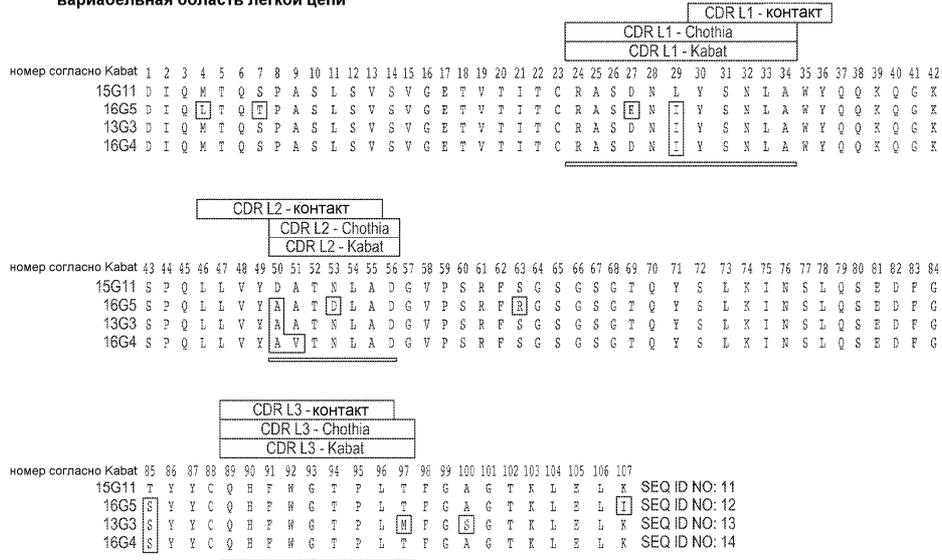
Фиг. 3А-1

вариабельная область тяжелой цепи



Фиг. 3A-2

вариабельная область легкой цепи



Фиг. 3B-1

вариабельная область тяжелой цепи

																														CDR H1 - контакт												
																														CDR H1 - Chothia												
																														CDR H1 - Kabat												
номер согласно Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
15G11	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	E	N	V	K	Q	R	P	G
16G5	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	E	N	V	K	Q	R	P	G
13G3	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	A	S	Y	W	M	E	N	V	K	Q	R	P	G
16G4	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	E	N	V	K	Q	R	P	G

																														CDR H2 - контакт												
																														CDR H2 - Chothia												
																														CDR H2 - Kabat												
номер согласно Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
15G11	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	N	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S
16G5	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	N	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S
13G3	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	N	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S
16G4	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	N	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S

																																																																																																																	CDR H3 - контакт	
																																																																																																																	CDR H3 - Chothia	
																																																																																																																	CDR H3 - Kabat	
номер согласно Kabat	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113																																																																																		
15G11	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 15																																																																																	
16G5	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 16																																																																																	
13G3	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 17																																																																																	
16G4	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 18																																																																																	

Фиг. 3B-2

вариабельная область легкой цепи

																																				CDR L1 - контакт						
																																				CDR L1 - Chothia						
																																				CDR L1 - Kabat						
номер согласно Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
16F6	D	V	Q	I	T	Q	S	P	S	Y	L	T	A	S	P	G	E	T	I	T	I	N	C	R	A	S	K	S	I	S	K	Y	L	A	W	Y	Q	E	K	P	G	K
																																				CDR L2 - контакт						
																																				CDR L2 - Chothia						
																																				CDR L2 - Kabat						
номер согласно Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
16F6	T	N	K	L	L	I	Y	S	G	S	T	L	Q	S	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	N	L	E	P	E	D	F	A
																																				CDR L3 - контакт						
																																				CDR L3 - Chothia						
																																				CDR L3 - Kabat						
номер согласно Kabat	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107																			
16F6	M	Y	Y	C	Q	Q	H	N	E	Y	P	H	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	SEQ ID NO: 19																		

Фиг. 3C-1

вариабельная область тяжелой цепи

																														CDR H1 - контакт												
																														CDR H1 - Chothia												
																														CDR H1 - Kabat												
номер согласно Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35a	36	37	38	39	40	41
16F6	D	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	S	L	S	L	T	C	T	V	T	G	N	S	I	T	S	E	Y	A	W	N	W	I	R	Q	P	P
																														CDR H2 - контакт												
																														CDR H2 - Chothia												
																														CDR H2 - Kabat												
номер согласно Kabat	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
16F6	G	N	K	L	E	W	M	G	Y	I	S	Y	S	G	T	T	S	Y	N	P	S	L	K	S	R	I	S	I	T	R	D	T	S	K	N	Q	L	P	L	Q	L	N
																														CDR H3 - контакт												
																														CDR H3 - Chothia												
																														CDR H3 - Kabat												
номер согласно Kabat	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	SEQ ID NO: 20			
16F6	S	V	T	T	E	D	T	A	T	Y	P	C	A	R	Y	G	Y	G	N	P	A	T	R	Y	P	D	V	W	G	A	G	T	T	V	T	V	S	S				

Фиг. 3C-2





038367

гуманизация 7G7 с генерированием hu7G7.v1

легкая цепь, каппа: антитело мыши, выравненное по зародышевым линиям человека

		CDR L1																																									
номер согласно Kabat		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	a	b	c	d	e	f	28	29	30	31	32	33	34	35	36
номер согласно Kabat	K4H1	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	K	N	Y	L	A	W	Y	
	7G7	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	R	Q	S	V	S	T	.	.	S	S	Y	S	F	M	H	W	Y
	hu7G7.v1	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	R	A	R	Q	S	V	S	T	.	.	S	S	Y	S	F	M	H	W	Y

		CDR L2																																						
номер согласно Kabat		37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71				
номер согласно Kabat	K4H1	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	N	A	S	T	R	.	.	.	.	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F
	7G7	Q	K	A	G	Q	P	P	K	L	L	I	K	Y	A	S	I	Q	.	.	.	.	E	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	
	hu7G7.v1	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	K	Y	A	S	I	Q	.	.	.	.	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F

		CDR L3																																			SEQ ID				
номер согласно Kabat		72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	NO:			
номер согласно Kabat	K4H1	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	C	Q	Q	Y	S	T	P	.	.	.	.	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	115	
	7G7	T	L	T	I	L	P	V	E	E	R	D	T	A	T	Y	C	Q	H	T	W	E	I	P	.	.	.	.	P	T	F	G	S	G	T	K	V	E	I	K	116
	hu7G7.v1	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	C	Q	H	T	W	E	I	P	.	.	.	.	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	117

Фиг. 4C-1

гуманизация 7G7 с генерированием hu7G7.v1

тяжелая цепь, каппа: антитело мыши, выравненное по зародышевым линиям человека

		CDR H1																																													
номер согласно Kabat		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44		
номер согласно Kabat	K4H1	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	I	H	.	.	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	
	7G7	Q	V	Q	L	L	Q	P	G	S	E	L	V	R	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	.	.	W	V	X	Q	R	H	Q	Q	G
	hu7G7.v1	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	.	.	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G

		CDR H2																																													
номер согласно Kabat		45	46	47	48	49	50	51	52	a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	83	84		
номер согласно Kabat	K4H1	L	E	N	I	G	W	I	N	P	.	.	G	S	G	N	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	Q	R	V	T	I	T	R	D	T	S	F	T	A	Y	L	E	L	S	S	L	R	S	
	7G7	L	E	N	I	G	N	I	Y	P	.	.	G	S	G	S	T	X	Y	D	E	R	F	K	S	X	G	T	L	I	V	D	T	S	S	T	A	Y	H	H	L	S	S	L	T	S	
	hu7G7.v1	L	E	N	I	G	N	I	Y	P	.	.	G	S	G	S	T	X	Y	D	E	R	F	K	S	R	V	T	I	T	V	D	T	S	T	S	T	A	Y	L	E	L	S	S	L	R	S

		CDR H3																																			SEQ ID				
номер согласно Kabat		85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	a	b	c	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	NO:							
номер согласно Kabat	K4H1	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	118
	7G7	E	D	S	A	V	Y	C	T	R	:	G	G	Y	D	S	R	A	N	.	.	.	.	.	.	.	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A	119
	hu7G7.v1	E	D	T	A	V	Y	C	T	R	:	G	G	Y	D	S	R	A	N	.	.	.	.	.	.	.	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	120

Фиг. 4C-2

гуманизация 16F6 с генерированием hu16F6.v4

легкая цепь, каппа: антитело мыши, выравненное по зародышевым линиям человека

		CDR L1																																							
номер согласно Kabat		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36				
номер согласно Kabat	IGKV4-9*01	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	F	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	G	T	S	Y	L	A	W	Y	
	16F6	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	Y	L	P	A	S	P	G	E	T	I	T	T	N	C	R	A	S	K	.	.	.	.	S	T	S	X	Y	L	A	W	Y
	hu16F6.v4	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	K	.	.	.	.	S	T	S	X	Y	L	A	W	Y

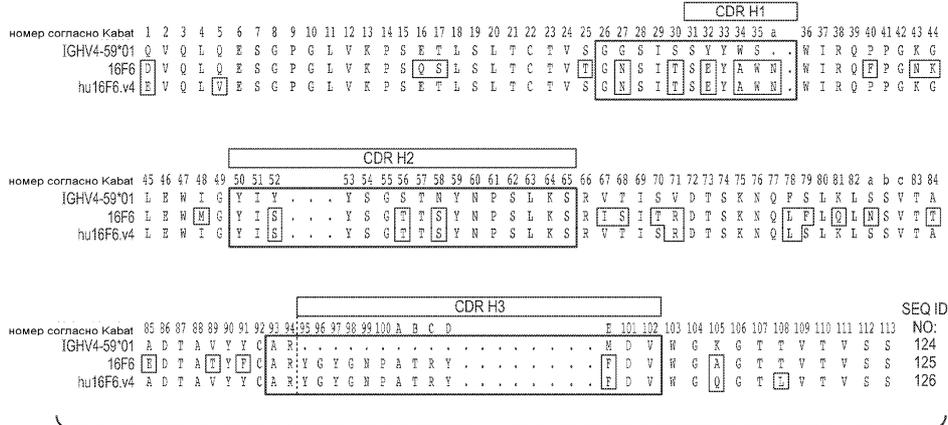
		CDR L2																																						
номер согласно Kabat		37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71				
номер согласно Kabat	IGKV4-9*01	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	T	L	.	.	.	.	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F
	16F6	Q	H	K	P	G	K	T	H	K	L	L	I	Y	S	G	S	T	L	.	.	.	.	Q	S	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F
	hu16F6.v4	Q	Q	K	P	G	K	T	H	K	L	L	I	Y	S	G	S	T	L	.	.	.	.	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F

		CDR L3																																			SEQ ID				
номер согласно Kabat		72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	NO:			
номер согласно Kabat	IGKV4-9*01	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	P	A	T	Y	C	Q	Q	L	N	S	Y	P	.	.	.	.	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	121
	16F6	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	P	A	M	Y	C	Q	Q	H	N	Z	Y	P	.	.	.	.	W	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	122
	hu16F6.v4	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	P	A	T	Y	C	Q	Q	H	N	Z	Y	P	.	.	.	.	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	123

Фиг. 4D-1

тяжелая цепь: антитело мыши, выравненное по зародышевым линиям человека



Фиг. 4D-2

ФИГ. 4E-1  
ФИГ. 4E-2

15G11, 7A4 и 16F6 варианты гуманизации

	LC				HC			huTfR			CynoTfR			Cy/hu отношение
	43	48	48	67	69	71	73	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
mu15G11	S	V	I	A	L	V	K	8.900E+05	8.826E-04	9.916E-10	1.288E+06	3.349E-03	2.600E-09	2.6
hu15G11.v1	A	L	M	V	I	R	T	6.240E+05	3.194E-03	5.119E-09	8.571E+05	8.670E-03	1.012E-08	2.0
hu15G11.v2	A	L	M	V	I	V	T	3.520E+05	3.290E-03	9.347E-09	4.554E+05	8.021E-03	1.761E-08	1.9
hu15G11.v3	S	V	M	V	I	R	T	5.703E+05	2.347E-03	4.115E-09	8.044E+05	4.292E-03	5.336E-09	1.3
hu15G11.v4	S	V	M	V	I	V	T	4.773E+05	1.855E-03	3.886E-09	5.732E+05	4.033E-03	7.036E-09	1.8
hu15G11.v5	S	V	I	A	L	V	K	6.46E+05	0.00215	3.33E-09	5.43E+05	0.00641	1.18E-08	3.5

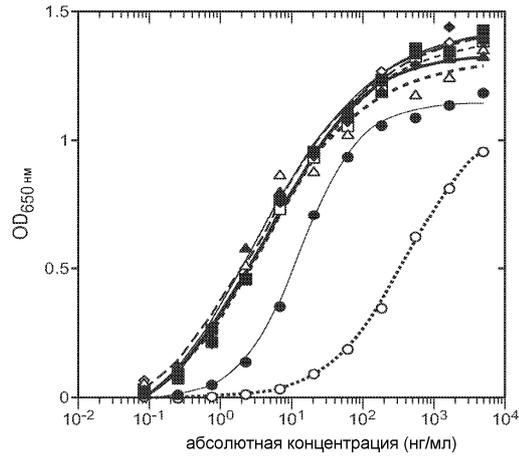
	LC					HC			huTfR			CynoTfR			Cy/hu отношение
	27d	58	68	94	24	71	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD			
ch 7A4	D	I	R	A	G	V	2.11E+06	4.34E-04	2.06E-10	1.06E+06	6.63E-04	6.27E-10	3.04		
ch7A4/8A2	S	I	R	G	G	V	3.007E+06	3.353E-04	1.115E-10	1.315E+06	1.216E-03	9.247E-10	8.3		
hu7A4.v1	S	V	G	G	A	R	1.41E+06	3.94E-04	2.79E-10	9.15E+05	1.53E-03	1.67E-09	6.0		
hu7A4.v2	S	V	G	G	G	R	1.60E+06	3.71E-04	2.32E-10	9.62E+05	1.17E-03	1.22E-09	5.3		
hu7A4.v3	S	V	G	G	A	V	6.24E+05	3.39E-04	5.43E-10	3.22E+05	9.34E-04	2.90E-09	5.3		
hu7A4.v4	S	V	G	G	G	V	4.82E+05	2.95E-04	6.12E-10	2.52E+05	9.66E-04	3.83E-09	6.3		
hu7A4.v5	S	I	G	G	A	R	1.748E+06	6.363 E-04	3.640E-10	1.461E+06	1.757E-03	1.203E-09	3.3		
hu7A4.v6	S	I	G	G	G	R	2.845E+06	7.396 E-04	2.600E-10	1.780E+06	1.883E-03	1.058E-09	4.1		

Фиг. 4E-1

hu7A4.v7	S	I	G	G	A	V	1.113E+06	5.735E-04	5.153E-10	2.428E+06	2.855E-03	1.176E-09	2.3
hu7A4.v8	S	I	G	G	G	V	8.326E+05	1.077E-03	1.294E-09	2.768E+05	3.411E-03	1.232E-08	9.5
hu7A4.v9	S	V	R	G	A	R	1.930E+06	2.304E-04	1.194E-10	1.280E+06	5.477E-04	4.279E-10	3.6
hu7A4.v10	S	V	R	G	G	R	1.684E+06	2.407E-04	1.429E-10	1.115E+06	5.632E-04	5.051E-10	3.5
hu7A4.v11	S	V	R	G	A	V	1.487E+06	2.323E-04	1.562E-10	8.049E+05	7.588E-04	9.427E-10	6.0
hu7A4.v12	S	V	R	G	G	V	9.159E+05	1.833E-04	2.001E-10	4.587E+05	9.580E-04	2.089E-09	10.4
hu7A4.v13	S	V	G	A	G	V	4.51E+05	6.14E-04	1.36E-09	2.13E+05	2.42E-03	1.14E-08	8.3
hu7A4.v14	S	I	G	A	G	V	6.14E+05	7.33E-04	1.19E-09	2.30E+05	3.61E-03	1.57E-08	13.2
hu7A4.v15	S	V	R	A	G	V	6.73E+05	3.77E-04	5.61E-10	2.90E+05	2.26E-03	7.80E-09	13.9

	LC				HC		huTfR			CynoTfR			Cy/hu отношение
	43	44	71	78	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD			
mu16F6	T	N	R	L	1.36E+05	2.81E-04	2.07E-09	1.23E+05	9.13E-04	7.45E-09	3.6		
hu16F6.v1	A	P	V	F	4.10E+04	7.67E-04	1.87E-08	4.64E+04	0.009242	1.99E-07	10.7		
hu16F6.v2	A	P	R	L	4.62E+04	1.97E-04	4.25E-09	4.38E+04	0.002981	6.81E-08	16.0		
hu16F6.v3	T	N	V	F	7.86E+04	3.23E-04	4.11E-09	7.26E+04	0.002503	3.45E-08	8.4		
hu16F6.v4	T	N	R	L	8.99E+04	7.94E-05	8.84E-10	8.30E+04	9.13E-04	1.10E-08	12.5		

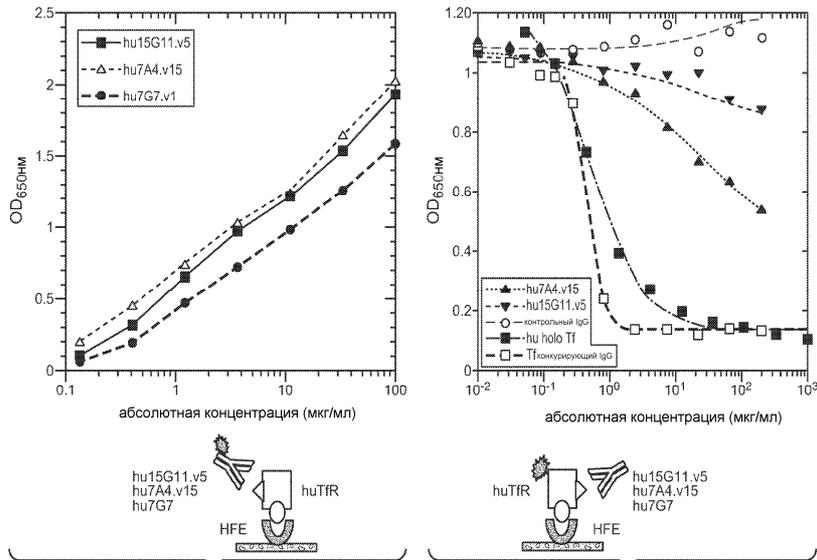
Фиг. 4E-2



связывание антитела в присутствии (белые значки, прерывистая линия) или в отсутствие (черные значки, сплошная линия) 6,3 мкМ holo-Tf

hu7A4.v15 - квадрат  
 hu15G11.v5 - ромб  
 hu7G7.v1 - треугольник  
 Tf конкурирующее антитело - кружок

Фиг. 5



Фиг. 6А, В

15G11 вариант IgG	ELIZA (EC50) с использованием IgG		подгонка (SCK) 1:1 fit (IgG)		подгонка стационарное состояние (IgG)		подгонка (Fab)	
	huTfR (нг/мл)	СуноTfR (нг/мл)	huTfR (нМ)	СуноTfR (нМ)	huTfR (нМ)	СуноTfR (нМ)	huTfR (нМ)	СуноTfR (нМ)
15G11.v5	16±1	20±2	3.3	12			4.7	16
CDR-H3	T96A	274	3378			433		
	V99A	16.1	21.8					
	H101A	14.2	21.6					
	V102A	15.7	22.3					
CDR-L3	Q89A	30	506	125	268	212	591	
	H90A	13	24					
	F91A	45.8	953.3	167 ± 69		228 ± 152		383
	W92A	11.8	44.1	31	32	123	327	280 370
	G93A	14.5	50.8	40	61	150	412	245 1300
	T94A	16.8	29.3					
	P95A	10.6	40.6	29	57	94	256	170 866
	L96A	9.9	18					
	T97A	13.4	15.7					

CDR L3								SEQ ID	CDR H3								SEQ ID	
89	90	91	92	93	94	95	96	97	NO:	95	96	97	98	99	100	101	102	NO:
Q	H	F	W	G	T	P	L	T	128	G	T	R	A	Y	H	Y	129	

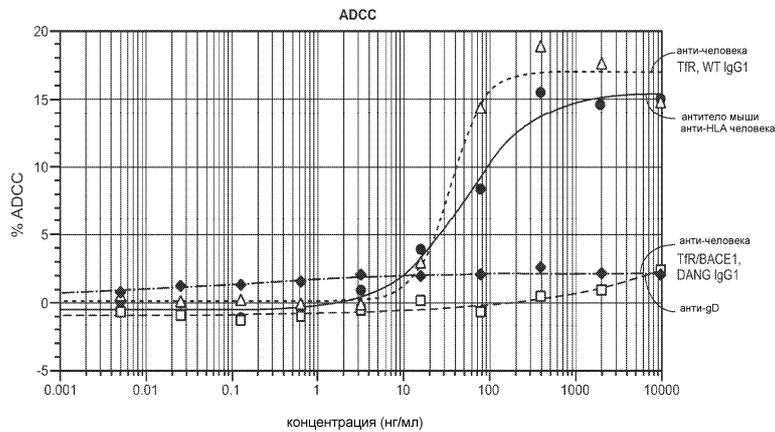
Фиг. 7А

7A4 вариант IgG	ELIZA (EC50) с использованием IgG		подгонка (SCK) 1:1 fit (IgG)		подгонка стационарное состояние (IgG)		подгонка (Fab)	
	huTfR (нг/мл)	СуноTfR (нг/мл)	huTfR (нМ)	СуноTfR (нМ)	huTfR (нМ)	СуноTfR (нМ)	huTfR (нМ)	СуноTfR (нМ)
7A4.v15	14.8	14.2	0.58	7.8			0.4	4.3
CDR-H3	G95A	13.5	41.8					
	L96A	15.5	28.7					
	S97A							
	G98A	19.4	24.7					
	N99A	17	82.2	11	22	19	77	
	Y100A	15.9	24					
	V100aA							
	M100bA	16.1	16.9					
CDR-L3	D101A	17.3	18.5					
	Y102A	12.6	17.8					
	Q89A	10.9	13.8	16	570	41	329	130 760
	Q90A	9.3	181					
	S91A	11.3	16.3					
	N92A	8.7	13.7					
	E93A	12.2	17.6					
	P95A	9.7	15.9					
P96A	10	16.2						
T97A	12	22.6						

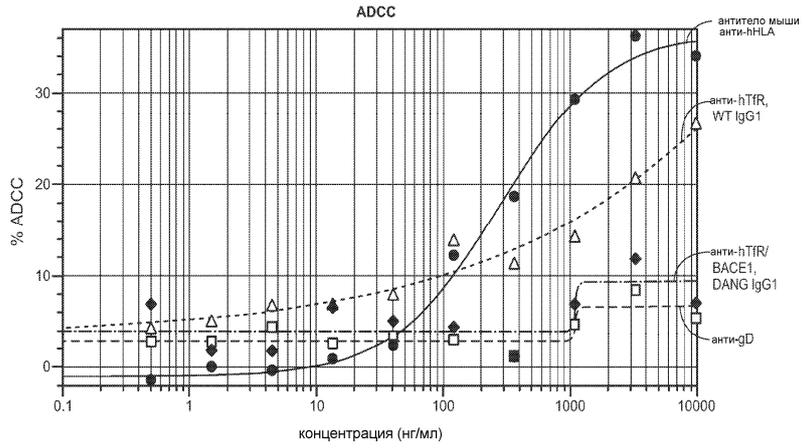
  

CDR L3								SEQ ID	CDR H3								SEQ ID	
89	90	91	92	93	94	95	96	97	NO:	95	96	97	98	99	100	100a	100b	NO:
Q	Q	S	N	E	A	P	P	T	130	G	L	S	G	N	Y	V	M	131

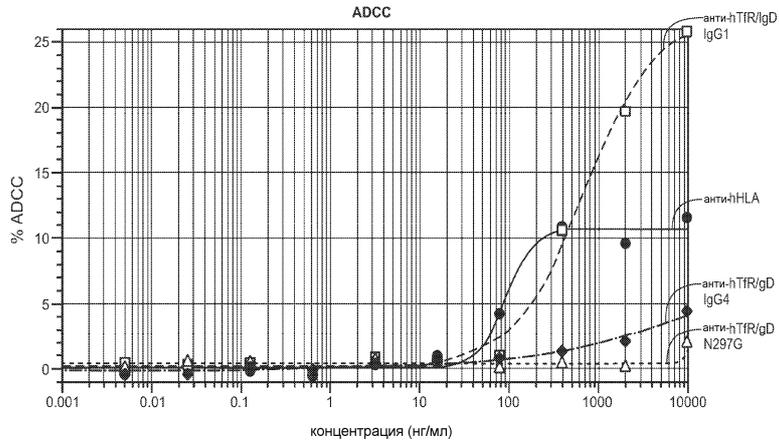
Фиг. 7В



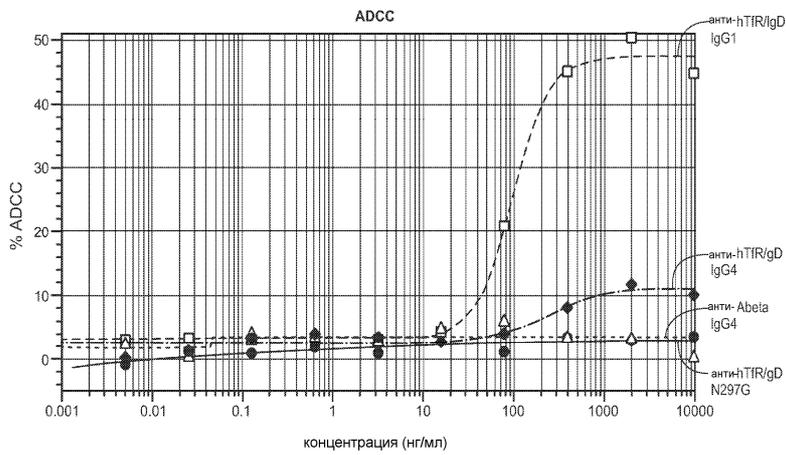
Фиг. 8А



Фиг. 8В

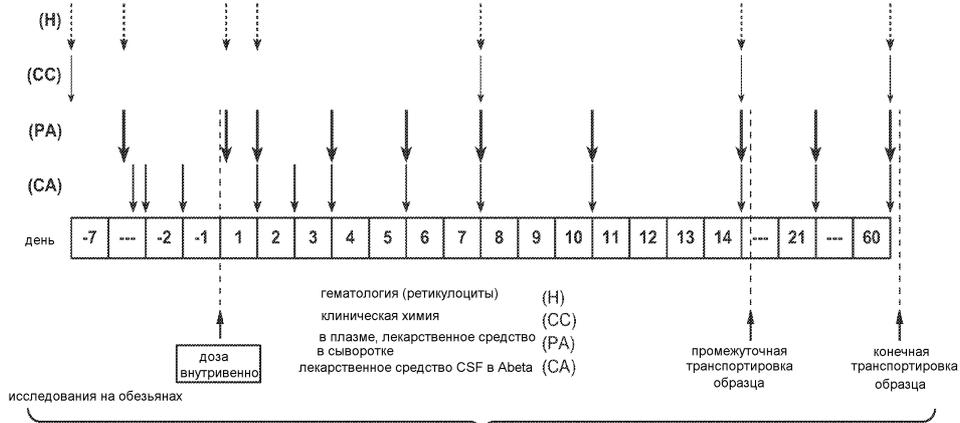


Фиг. 9А

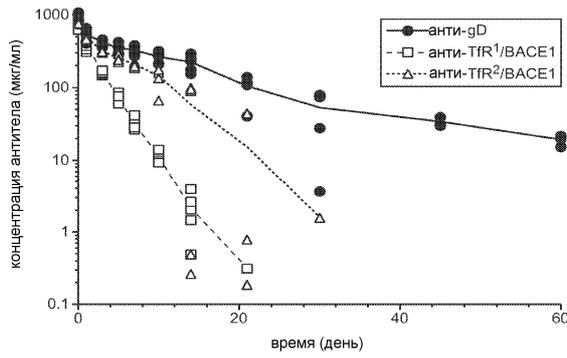


Фиг. 9В

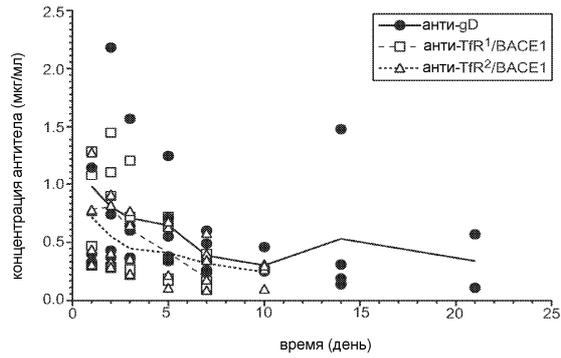
группа	кол-во	Tx	изотип	доза (мг/кг)	TfR вариант	Biacore huTfR (нМ, Fab)	Biacore CytoTfR (нМ, Fab)
1	5	анти-gD	hlgG1	30			
2	5	анти-TfR <sup>1</sup> /BACE1	hlgG1 DANG	30	hu15G11.v5	6 ± 2	19 ± 9
3	5	анти-TfR <sup>2</sup> /BACE1	hlgG1 DANG	30	hu15G11.LC92A	230 ± 140	440 ± 160



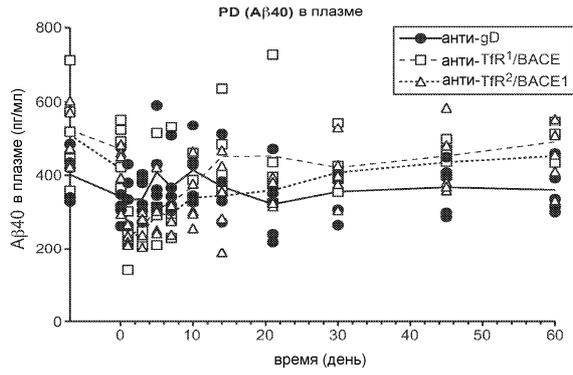
Фиг. 10



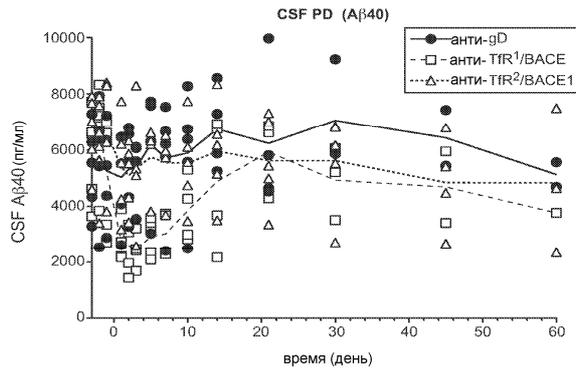
Фиг. 11А



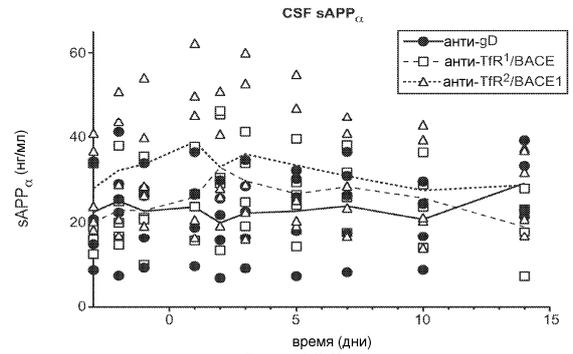
Фиг. 11В



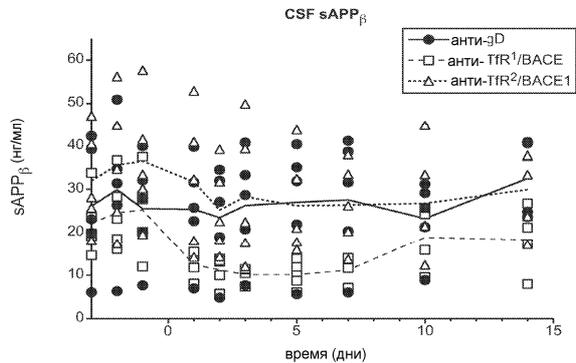
Фиг. 12А



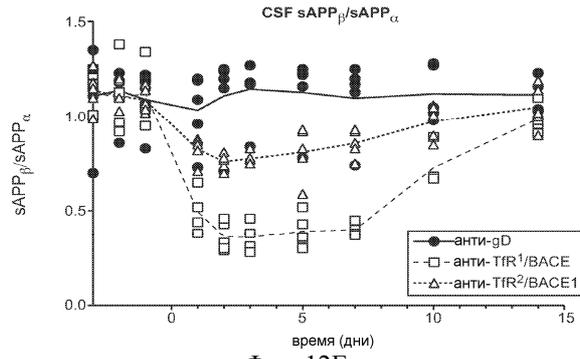
Фиг. 12В



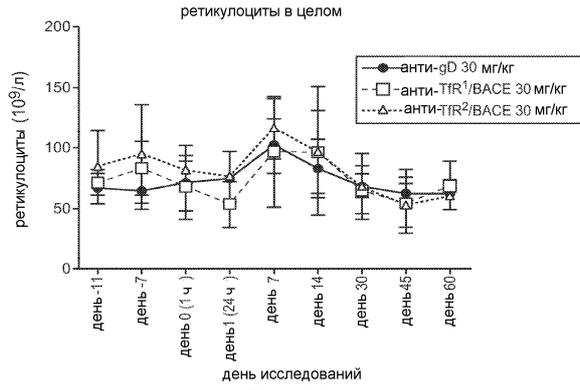
Фиг. 12С



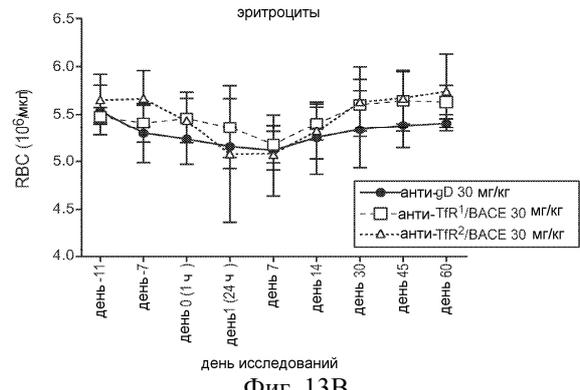
Фиг. 12D



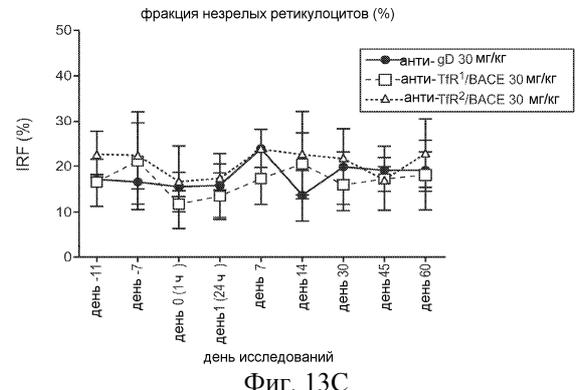
Фиг. 12Е



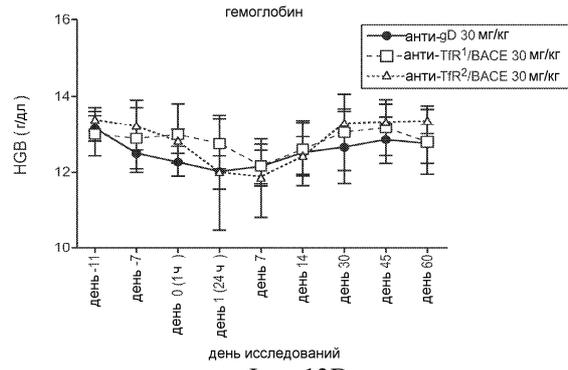
Фиг. 13А



Фиг. 13В

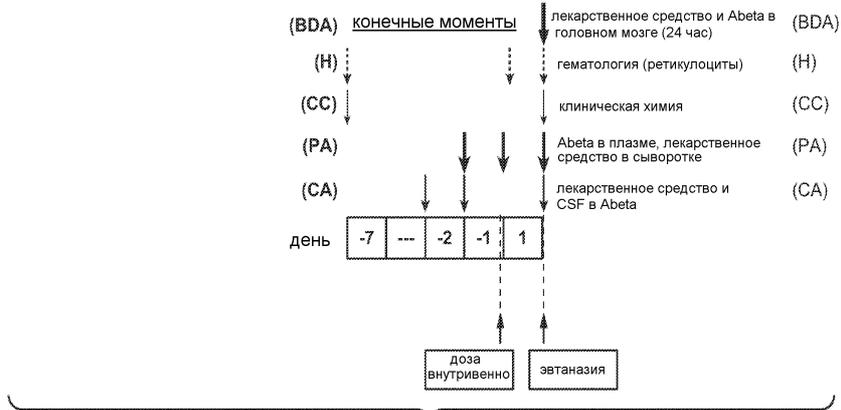


Фиг. 13С

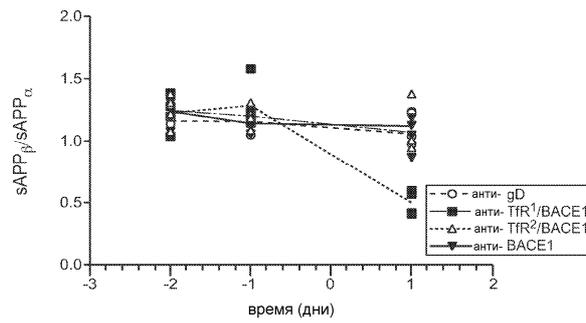


Фиг. 13D

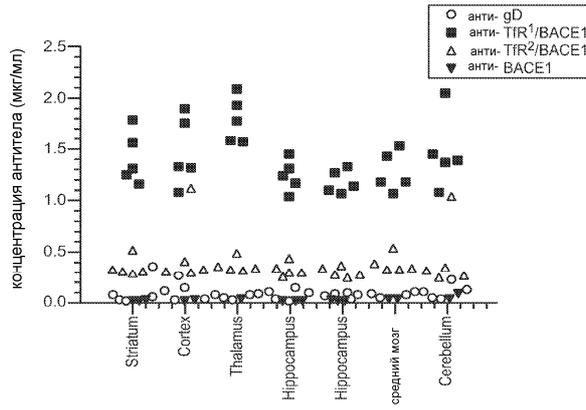
группа	кол-во	Tx	изотип	доза (мг/кг)	TfR вариант	Biacore huTfR (нМ, Fab)	Biacore СуноTfR (нМ, Fab)
1	5	анти-gD	hlgG1	30			
2	5	анти-TfR <sup>1</sup> /BACE1	hlgG1 DANG	30	hu15G11.v5	6 ± 2	19 ± 9
3	5	анти-TfR <sup>2</sup> /BACE1	hlgG1 DANG	30	hu15G11.LC92A	230 ± 140	440 ± 160
4	5	анти-BACE1	hlgG1	30	нет	-	-



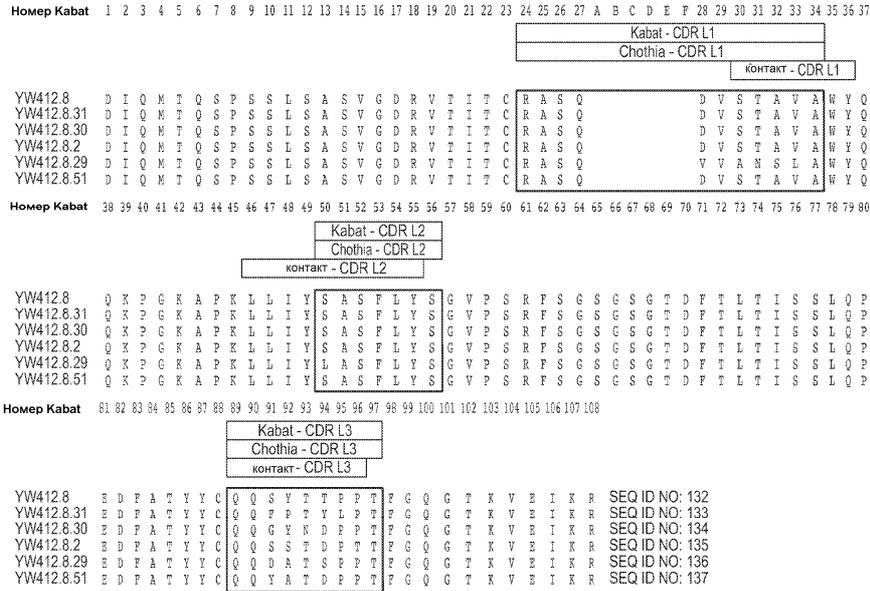
Фиг. 14



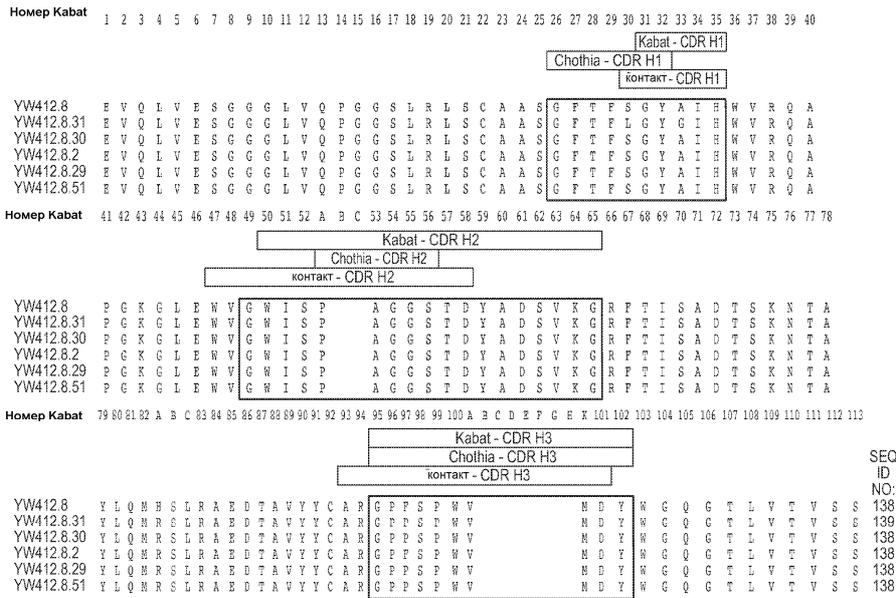
Фиг. 15A



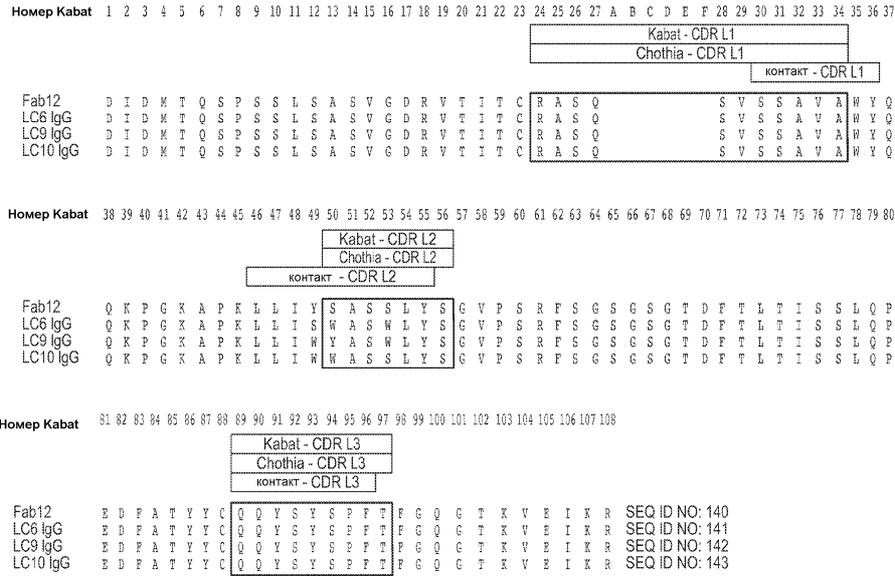
Фиг. 15B



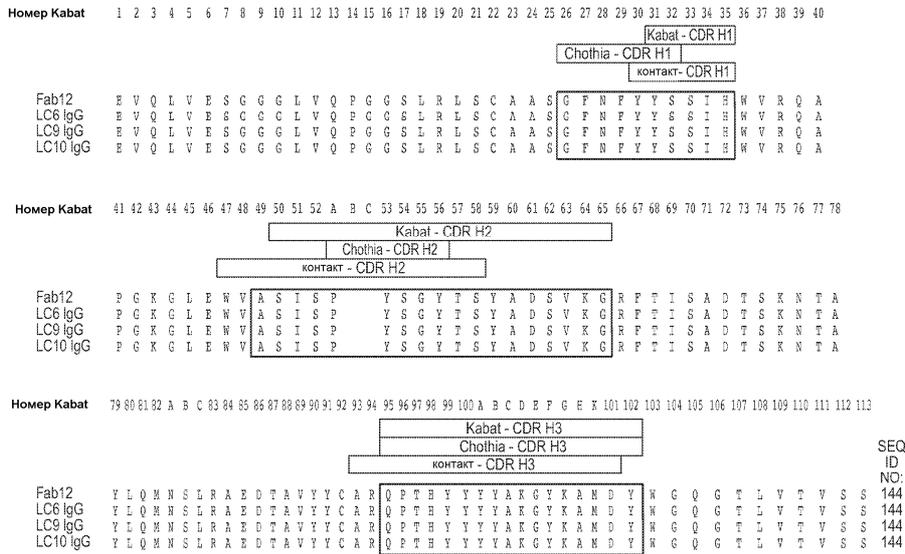
Фиг. 16A



Фиг. 16B



Фиг. 17А



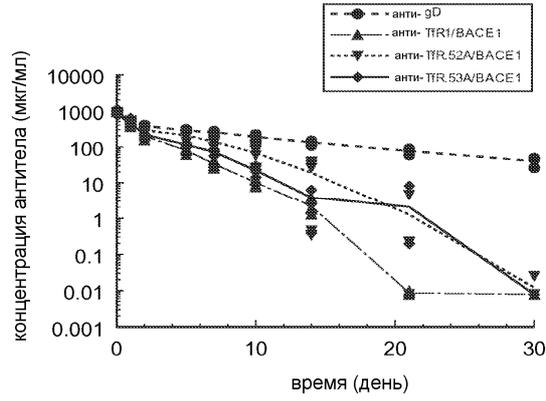
Фиг. 17В

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLELVAS  
 51 INSNGGSTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCASGD  
 101 YWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT  
 151 VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSSLGT KTYTCNVDPK  
 201 PENTKVDKRV ESKYPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE  
 251 VTCVVVDVSDQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV  
 301 LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTIK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM  
 351 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS  
 401 RLTVDKSRWQ EGNVFCSSVM HEALHNNHYTQ KSLSLSLG (SEQ 10 NO: 145)

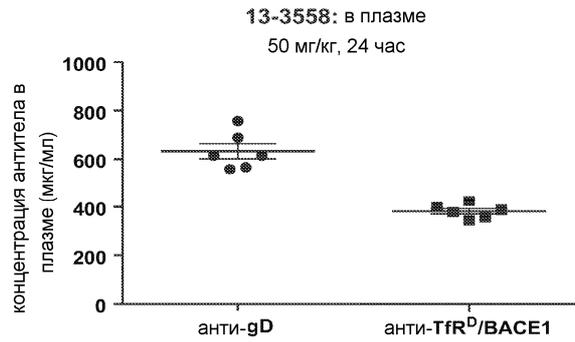
Фиг. 18А

1 DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV YSNGDTYLHW YLQKPGQSPQ  
 51 LLIIYKVSNR FSGVDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEVGV YYCSQSTHVP  
 101 WTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK  
 151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE  
 201 VTHQGLSSPV TKSFNREGC (SEQ 10 NO: 146)

Фиг. 18В

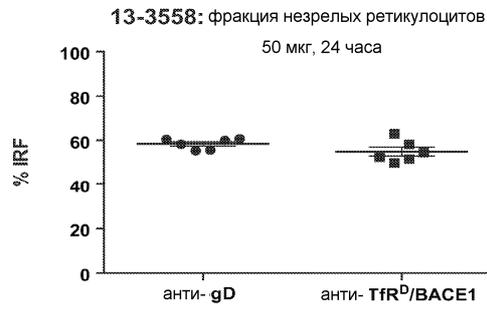


Фиг. 19



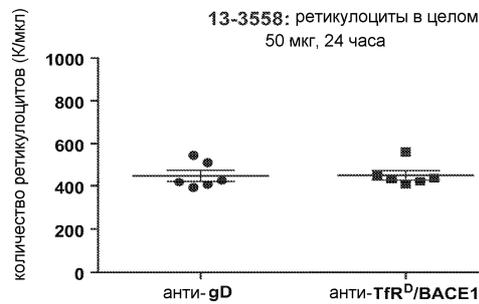
muIgG2a + LALA/PG

Фиг. 20



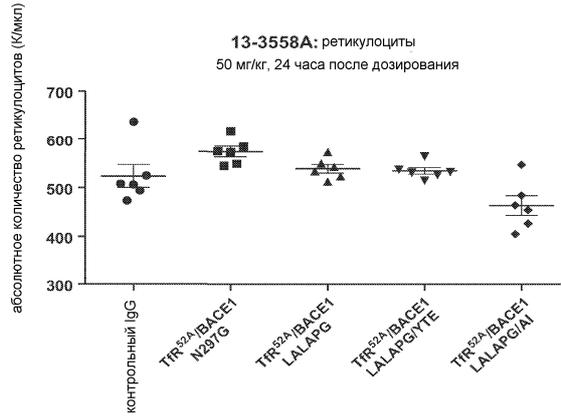
muIgG2a + LALA/PG

Фиг. 21A

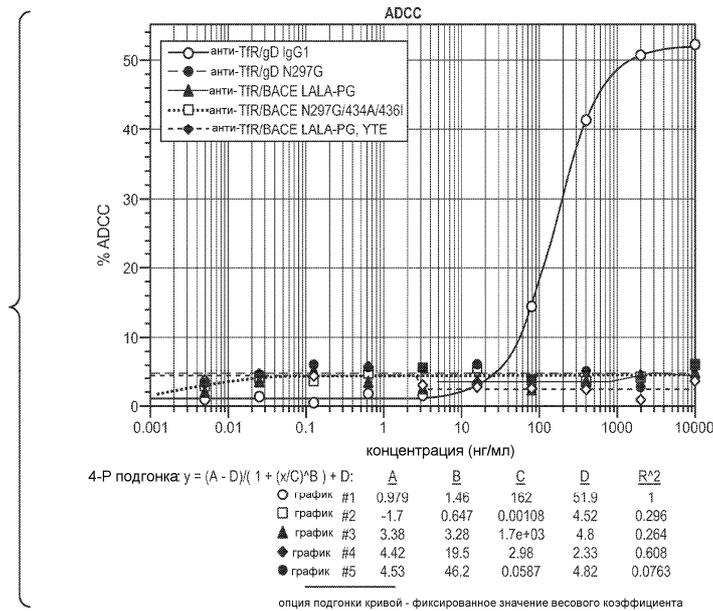


muIgG2a + LALA/PG

Фиг. 21B



Фиг. 22



Фиг. 23

вариабельная область легкой цепи

	CDR L1 - Contact																																									
	CDR L1 - Chothia																																									
	CDR L1 - Kabat																																									
Номер Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
hu15G11.v5 (TTR1)	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	L	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K
hu15G11.52A	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	L	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K
hu15G11.53A	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	L	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K
hu15G11.92A (TTR2)	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	L	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K

	CDR L2 - Contact																																									
	CDR L2 - Chothia																																									
	CDR L2 - Kabat																																									
Номер Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
hu15G11.v5 (TTR1)	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	P	A
hu15G11.52A	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	P	A
hu15G11.53A	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	P	A
hu15G11.92A (TTR2)	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	P	A

	CDR L3 - Contact																						
	CDR L3 - Chothia																						
	CDR L3 - Kabat																						
Номер Kabat	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
hu15G11.v5 (TTR1)	T	Y	Y	C	Q	H	P	W	G	T	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	X
hu15G11.52A	T	Y	Y	C	Q	H	P	W	G	T	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	X
hu15G11.53A	T	Y	Y	C	Q	H	P	W	G	T	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	X
hu15G11.92A (TTR2)	T	Y	Y	C	Q	H	P	<u>A</u>	G	T	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	X

Фиг. 24A

вариабельная область тяжелой цепи

		CDR H1 - Contact																																									
		CDR H1 - Chothia																																									
		CDR H1 - контакт																																									
номер Kabat		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
hu15G11.v5 (TIR1)		E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	H	V	R	Q	A	P	G
hu15G11.52A		E	V	Q	L	V	Q	G	G	A	E	V	K	K	D	G	A	G	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	H	V	R	Q	A	P	G
hu15G11.53A		E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	H	V	R	Q	A	P	G
hu15G11.92A (TIR2)		E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	H	V	R	Q	A	P	G

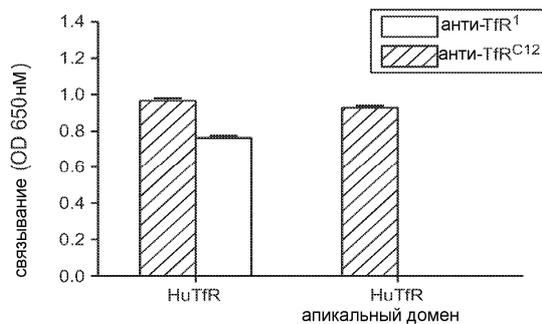
  

		CDR H2 - Contact																																									
		CDR H2 - Chothia																																									
		CDR H2 - контакт																																									
номер Kabat		43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
hu15G11.v5 (TIR1)		Q	R	L	E	W	I	G	E	I	N	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	R	A	T	L	T	V	D	K	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S
hu15G11.52A		Q	R	L	E	W	I	G	E	I	A	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	R	A	T	L	T	V	D	K	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S
hu15G11.53A		Q	R	L	E	W	I	G	E	I	N	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	R	A	T	L	T	V	D	K	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S
hu15G11.92A (TIR2)		Q	R	L	E	W	I	G	E	I	N	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	R	A	T	L	T	V	D	K	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S

		CDR H3 - Contact																															
		CDRH3 - Chothia																															
		CDR H3 - контакт																															
номер Kabat		82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
hu15G11.v5 (TIR1)		S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	G	T	R	A	I	E	Y	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S	
hu15G11.52A		S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	G	T	R	A	I	E	Y	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S	
hu15G11.53A		S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	G	T	R	A	I	E	Y	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S	
hu15G11.92A (TIR2)		S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	G	T	R	A	I	E	Y	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S	

Фиг. 24В



Фиг. 25

