

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039366**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2022.01.19

(21) Номер заявки

201890130

(22) Дата подачи заявки

2016.06.24

(51) Int.Cl. *C12N 15/09* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 14/475* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 21/02 (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) *C12N 9/16* (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01) *C12N 9/24* (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01) *C12N 9/64* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
A61P 31/04 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛО К РЕЦЕПТОРУ ТРАНСФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА, ПРОНИКАЮЩЕЕ ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР**(31) **2015-144379**(32) **2015.06.24**(33) **JP**(43) **2018.05.31**(86) **PCT/JP2016/068738**(87) **WO 2016/208695 2016.12.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**Джей Си Ар ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
КО., ЛТД. (JP)**

(72) Изобретатель:

**Сонода Хироюки, Такахаси Кенити
(JP)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **JP-A-05500944****JP-A-2014514313****WO-A2-2013177062**

SADE H. et al. A Human Blood-Brain Barrier Transcytosis Assay Reveals Antibody Transcytosis Influenced by pH-Dependent Receptor Binding., PLoS One. [online], 2014, Vol. 9, No. 4, e96340 particularly, fig. 6, E-H, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4005765/pdf/pone.0096340.pdf>> [retrieved on 2016-08-18]

FRIDEN P.M. et al. Characterization, receptor mapping and blood-brain barrier transcytosis of antibodies to the human transferrin receptor., J Pharmacol Exp Ther., 1996, Vol. 278, No. 3, p. 1491-1498 particularly, abstract

PARDRIDGE W.M., Blood-brain barrier drug delivery of IgG fusion proteins with a transferrin receptor monoclonal antibody., Expert Opin Drug Deliv., 2015.02, Vol. 12, No. 2, p. 207-222 particularly, abstract, page 208, right column

WO-A1-2015009961**WO-A1-2015098989**

(57) Раскрыты средства для того, чтобы превращать соединения, обладающие физиологической или фармакологической активностью и неспособные проходить через гематоэнцефалический барьер, в форму, которая позволяет им проходить через гематоэнцефалический барьер, и соединения, превращенные таким образом. Средством является антитело к рецептору трансферрина человека, и превращенными соединениями являются молекулярные конъюгаты между физиологически активным белком или фармакологически активными низкомолекулярными соединениями и антителом к рецептору трансферрина человека.

B1**039366****039366****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителу к рецептору трансферрина человека, используемому для конъюгации с соединением, которое должно проявлять свою функцию в центральной нервной системе при парентеральном введении (белок или низкомолекулярное соединение и т.п.), чтобы делать это соединение способным проходить через гематоэнцефалический барьер после парентерального введения, а также к способу его получения и способу его использования.

Уровень техники

В отличие от капилляров в других тканях, таких как мышцы, капилляры, которые снабжают кровью большинство тканей головного мозга, за исключением некоторых областей, включая околожелудочковые органы (шишковидная железа, гипофиз, самое заднее поле и т.д.), отличаются тем, что клетки эндотелия, формирующие их эндотелий, соединены друг с другом посредством плотных межклеточных соединений. Пассивный перенос веществ из капилляров в головной мозг, тем самым, ограничен, и несмотря на то, что имеют место некоторые исключения, вещества с малой вероятностью перемещаются в головной мозг из крови, за исключением таких соединений, которые являются жирорастворимыми или низкомолекулярными (меньше 200-500 Да) и электрически нейтральными при приблизительно физиологическом pH. Эту систему, ограничивающую обмен веществами между кровью и тканевой жидкостью головного мозга через эндотелий капилляров в головном мозге, называют гематоэнцефалическим барьером или BBB. Гематоэнцефалический барьер не только ограничивает обмен веществами между кровью и головным мозгом, но также между тканевой жидкостью центральной нервной системы, включая головной мозг и спинной мозг, и кровью.

Благодаря гематоэнцефалическому барьеру большинство клеток центральной нервной системы не подвержены эффектам колебания концентраций веществ, таких как гормоны и лимфокины, в крови, что, таким образом, сохраняет их биохимический гомеостаз.

Однако гематоэнцефалический барьер создает проблемы при разработке фармацевтических средств. Для мукополисахаридоза I типа (синдром Гурлера), наследственного метаболического заболевания, обусловленного дефицитом α -L-идуронидазы, например, несмотря на то, что ферментную заместительную терапию осуществляют посредством внутривенного восполнения с использованием рекомбинантной α -L-идуронидазы в качестве терапии, терапия не эффективна при значительном отклонении от нормы, наблюдаемом в центральной нервной системе (ЦНС) при синдроме Гурлера, поскольку фермент не проходит через гематоэнцефалический барьер.

Предприняты попытки к разработке различных способов, чтобы заставлять эти макромолекулярные вещества, такие как белки или тому подобное, которые должны функционировать в центральной нервной системе, проходить через гематоэнцефалический барьер. В случае фактора роста нервов, например, хотя предприняты попытки создания способа для того, чтобы заставлять этот фактор проходить через гематоэнцефалический барьер, посредством предоставления липосомам, инкапсулирующим этот фактор, возможности сливаться с клеточной мембраной клеток эндотелия в капиллярах головного мозга, они не были воплощены (непатентная литература 1). В случае α -L-идуронидазы, предпринята попытка к усилению пассивного переноса фермента через гематоэнцефалический барьер посредством повышения его концентрации в крови через увеличенную однократную дозу фермента, и, таким образом, продемонстрировано, с использованием животной модели синдрома Гурлера, что с помощью этого способа происходит улучшение отклонения от нормы в центральной нервной системе (ЦНС) (непатентная литература 2).

Кроме того, обходя гематоэнцефалический барьер, также предпринята попытка вводить макромолекулярное вещество непосредственно в медуллярную полость или в головной мозг. Например, сообщалось о способе, в котором α -L-идуронидазу человека вводили в медуллярную полость пациента с синдромом Гурлера (мукополисахаридоз I типа) (патентная литература 1), способе, в котором кислую сфингомиелиназу человека вводили в желудочки головного мозга пациента с болезнью Ниманна-Пика (патентная литература 2), и способе, в котором идуронат-2-сульфатазу (I2S) вводили в желудочки головного мозга модельным животным с синдромом Хантера (патентная литература 3). Хотя кажется возможным, с помощью одного из таких способов, определенно позволять фармацевтическому средству действовать в центральной нервной системе, они имеют проблемы, поскольку являются высоко инвазивными.

Сообщалось о различных способах для того, чтобы позволять макромолекулярному веществу попадать в головной мозг через гематоэнцефалический барьер, где макромолекулярное вещество модифицируют, чтобы придавать ему аффинность к мембранным белкам, встречающимся на клетках эндотелия капилляров головного мозга. Примеры этих мембранных белков, которые встречаются на клетках эндотелия капилляров головного мозга, включают рецепторы для таких соединений, как инсулин, трансферрин, инсулиноподобный фактор роста (IGF-I, IGF-II), LDL и лептин.

Например, сообщалось о способе, в котором фактор роста нервов (NGF) синтезировали в форме белка, слитого с инсулином, и этот слитый белок мог проходить через гематоэнцефалический барьер через его связывание с рецептором инсулина (патентная литература 4-6). Кроме того, сообщалось о способе, в котором фактор роста нервов (NGF) синтезировали в форме белка, слитого с антителом к рецептору инсулина, и этот слитый белок мог проходить через гематоэнцефалический барьер через его связывание

с рецептором инсулина (патентная литература 4 и 7). Кроме того, сообщалось о способе, в котором фактор роста нервов (NGF) синтезировали в форме белка, слитого с трансферрином, и этот слитый белок мог проходить через гематоэнцефалический барьер через его связывание с рецептором трансферрина (TfR) (патентная литература 8). Кроме того, сообщалось о способе, в котором фактор роста нервов (NGF) синтезировали в форме белка, слитого с антителом к рецептору трансферрина (антителом к TfR), и этот слитый белок мог проходить через гематоэнцефалический барьер через его связывание с TfR (патентная литература 4 и 9).

В ходе дальнейшего поиска способов, в которых используют антитело к рецептору трансферрина, сообщалось, что в области этого способа для того, чтобы заставлять фармацевтическое средство проходить через гематоэнцефалический барьер посредством его связывания с антителом к TfR, можно использовать одноцепочечное антитело (непатентная литература 3). Кроме того, сообщалось о том, что антитела к hTfR, демонстрирующие относительно высокие константы диссоциации с hTfR (низкоаффинное антитело к hTfR) можно благоприятно использовать в способе для того, чтобы заставлять фармацевтические средства проходить через гематоэнцефалический барьер (патентная литература 10 и 11 и непатентная литература 4). Кроме того, также сообщалось, что антитела к TfR, у которых аффинность к hTfR варьирует в зависимости от pH, можно использовать в качестве носителя, чтобы заставлять фармацевтические средства проходить через гематоэнцефалический барьер (патентная литература 12 и непатентная литература 5).

Список цитируемой литературы

Патентная литература.

Патентная литература 1: JP2007-504166 A1.

Патентная литература 2: JP2009-525963 A1.

Патентная литература 3: JP2012-62312 A1.

Патентная литература 4: US5154924 B1.

Патентная литература 5: JP2011-144178 A1.

Патентная литература 6: US2004/0101904 A1.

Патентная литература 7: JP2006-511516 A1.

Патентная литература 8: JPH06-228199 A1.

Патентная литература 9: US5977307 B1.

Патентная литература 10: WO 2012/075037.

Патентная литература 11: WO 2013/177062.

Патентная литература 12: WO 2012/143379.

Непатентная литература.

Непатентная литература 1: Xie Y. et al., J. Control Release. 105. 106-19 (2005).

Непатентная литература 2: Ou L. et al., Mol Genet Metab. 111. 116-22 (2014).

Непатентная литература 3: Li JY. Protein Engineering. 12. 787-96 (1999).

Непатентная литература 4: Bien-Ly N. et al., J Exp Med. 211. 233-44 (2014).

Непатентная литература 5: Sada H. PLoS ONE. 9. E96340 (2014).

Сущность изобретения

Проблемы, подлежащие решению с помощью изобретения

Исходя из вышеизложенных предпосылок, цель настоящего изобретения состоит в том, чтобы предоставить антитело к TfR, которое можно использовать для конъюгации с соединением, которое должно проявлять свою функцию в центральной нервной системе при парентеральном введении (белок или низкомолекулярное соединение и т.п.) для того, чтобы делать это соединение способным проходить через гематоэнцефалический барьер, а также способ его получения и способ его использования.

Средства решения проблем

В результате интенсивных исследований, направленных на вышеуказанную цель, авторы настоящего изобретения обнаружили, что антитела к рецептору трансферрина человека (антитела к hTfR), которые распознают внеклеточную область hTfR, которые получают с помощью способа получения антител, изложенного подробно в описании, эффективно проходят через гематоэнцефалический барьер при введении в организм, и вследствие этого выполнили настоящее изобретение. Таким образом настоящее изобретение предусматривает следующее.

1. Антитело к рецептору трансферрина человека, в котором аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи антитела выбирают из группы, состоящей из следующих с (1) до (14):

(1) аминокислотная последовательность, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7, в CDR1, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность Trp-Thr-Ser в CDR2 и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10, в CDR3;

(2) аминокислотная последовательность, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, в CDR1, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14, или аминокислотную последовательность Tyr-Ala-Ser в CDR2 и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15, в CDR3;

ляют или добавляют относительно соответствующих аминокислотных последовательностей вариabельной области легкой цепи и вариabельной области тяжелой цепи антитела к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с 19 до 23.

32. Антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с от 1 до 31, где антитело имеет аффинность как к внеклеточной области рецептора трансферрина человека, так и ко внеклеточной области рецептора трансферрина обезьяны.

33. Антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с приведенным выше 32, где константа диссоциации его комплекса со внеклеточной областью рецептора трансферрина человека не превышает 1×10^{-8} M, и константа диссоциации его комплекса со внеклеточной областью рецептора трансферрина обезьяны не превышает 5×10^{-8} M.

34. Антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с от 1 до 33, где антитело представляет собой Fab антитело, $F(ab')_2$ антитело или $F(ab')$ антитело.

35. Антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с от 1 до 33, где антитело представляет собой одноцепочечное антитело, выбранное из группы, состоящей из scFab, scF(ab'), scF(ab')₂ и scFv.

36. Антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с приведенным выше 35, в котором его легкую цепь и тяжелую цепь соединяют через линкерную последовательность.

37. Антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с приведенным выше 35, в котором тяжелую цепь соединяют, через линкерную последовательность, с легкой цепью на ее С-концевой стороне.

38. Антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с приведенным выше 35, в котором легкую цепь соединяют, через линкерную последовательность, с тяжелой цепью на ее С-концевой стороне.

39. Антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с 36 до 38, в котором линкерная последовательность состоит из от 8 до 50 аминокислотных остатков.

40. Антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с приведенным выше 39, в котором линкерную последовательность выбирают из группы, состоящей из аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly, аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, и аминокислотной последовательности, состоящей из трех последовательно соединенных аминокислотных последовательностей, каждая приведена в SEQ ID NO: 3.

41. Слитый белок, содержащий антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с от 1 до 40 и аминокислотную последовательность другого белка (А), соединенную с легкой цепью антитела на ее С-концевой стороне или N-концевой стороне.

42. Слитый белок, содержащий антитело к рецептору трансферрина человека и другой белок (А), в котором антитело к рецептору трансферрина человека представляет собой антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с от 1 до 40, и в котором другой белок (А) соединяют с легкой цепью антитела к рецептору трансферрина человека на С-концевой стороне или N-концевой стороне.

43. Слитый белок в соответствии с приведенными выше 41 или 42, в котором другой белок (А) соединяют, через линкерную последовательность, с легкой цепью на С-концевой стороне или N-концевой стороне.

44. Слитый белок в соответствии с приведенным выше 43, в котором линкерная последовательность состоит из от 1 до 50 аминокислотных остатков.

45. Слитый белок в соответствии с приведенным выше 44, в котором линкерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из от 1 до 10 их, которые последовательно соединены.

46. Слитый белок, содержащий антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с от 1 до 40 и аминокислотную последовательность другого белка (А), соединенную с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне или N-концевой стороне.

47. Слитый белок антитела к рецептору трансферрина человека и другого белка (А), в котором антитело к рецептору трансферрина человека представляет собой антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с от 1 до 40, и в котором другой белок (А) соединяют с тяжелой цепью антитела к рецептору трансферрина человека на С-концевой стороне или N-концевой стороне.

48. Слитый белок в соответствии с приведенными выше 46 или 47, в котором другой белок (А) соединяют, через линкерную последовательность, с тяжелой цепью на С-концевой стороне или N-концевой

стороне.

49. Слитый белок в соответствии с приведенным выше 48, в котором линкерная последовательность состоит из от 1 до 50 аминокислотных остатков.

50. Слитый белок в соответствии с приведенным выше 48, в котором линкерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из от 1 до 10 их, которые последовательно соединены.

51. Слитый белок в соответствии с одним из приведенных выше с 41 до 50, в котором другой белок (А) представляет собой белок, происходящий от человека.

52. Слитый белок в соответствии с одним из приведенных выше с 41 до 51, в котором другой белок (А) выбирают из группы, состоящей из фактора роста нервов (NGF), лизосомальных ферментов, цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), нейротрофического фактора глиальной клеточной линии (GDNF), нейротрофина-3, нейротрофина-4/5, нейротрофина-6, нейрегулина-1, эритропоэтина, дарбэпоэтина, активина, основного фактора роста фибробластов (bFGF), фактора роста фибробластов 2 (FGF2), эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), интерферона α , интерферона β , интерферона γ , интерлейкина 6, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), цитокинов, рецептора фактора некроза опухоли α (рецептора TNF- α), лигандов PD-1, ферментов, обладающих разрушающей β -амилоид активностью, антитела к β -амилоиду, антитела к BACE, антитела к EGFR, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к HER2, антитела к TNF- α и других лекарственных антител.

53. Слитый белок в соответствии с одним из приведенных выше с 41 до 51, в котором другой белок (А) представляет собой лизосомальный фермент, где лизосомальный фермент выбирают из группы, состоящей из α -L-идуронидазы, идуронат-2-сульфатазы, глюкоцереброзидазы, β -галактозидазы, активаторного белка GM2, β -гексозаминидазы А, β -гексозаминидазы В, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы, α -маннозидазы, β -маннозидазы, галактозилцерамидазы, сапозина С, арилсульфатазы А, α -L-фукозидазы, аспартилглюкозаминидазы, α -N-ацетилгалактозаминидазы, кислой сфингомиелиназы, α -галактозидазы А, β -глюкуронидазы, гепаран-N-сульфатазы, α -N-ацетилглюкозаминидазы, ацетил КоА: α -глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, N-ацетилглюкозамин-6-сульфатсульфатазы, кислой церамидазы, амило-1,6-глюкозидазы, сиалидазы, пальмитоил-протеин-тиоэстеразы 1, трипептидилпептидазы 1, гиалуронидазы 1, CLN1 и CLN2.

54. Слитый белок в соответствии с одним из приведенных выше с 41 до 51, в котором другой белок (А) представляет собой идуронат-2-сульфатазу.

55. Слитый белок в соответствии с приведенным выше 50, в котором другой белок (А) представляет собой идуронат-2-сульфатазу человека и где слитый белок выбирают из следующих с (1) до (3):

(1) слитый белок, в котором легкая цепь гуманизированного антитела к hTfR имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 164, и в котором тяжелую цепь гуманизированного антитела к hTfR соединяют, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с идуронат-2-сульфатазой человека, и полноразмерная соединенная тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 247.

(2) слитый белок, в котором легкая цепь гуманизированного антитела к hTfR имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 180, и в котором тяжелую цепь гуманизированного антитела к hTfR соединяют, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с идуронат-2-сульфатазой человека, и полноразмерная соединенная тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 249, и

(3) слитый белок, в котором легкая цепь гуманизированного антитела к hTfR имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 196, и в котором тяжелую цепь гуманизированного антитела к hTfR соединяют, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с идуронат-2-сульфатазой человека, и полноразмерная соединенная тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 251.

56. Слитый белок в соответствии с приведенным выше 50, в которой другой белок (А) представляет собой идуронат-2-сульфатазу человека и где слитый белок выбирают из следующих с (1) до (3):

(1) слитый белок, содержащий: легкую цепь гуманизированного антитела к hTfR, которая имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 164; и тяжелую цепь гуманизированного антитела к hTfR, которая имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 172, которую соединяют, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с идуронат-2-сульфатазой человека, приведенной в SEQ ID NO: 246;

(2) слитый белок, содержащий: легкую цепь гуманизированного антитела к hTfR, которая имеет

аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 180; и тяжелую цепь гуманизованного антитела к hTfR, которая имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 188, которую соединяют, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с идуронат-2-сульфатазой человека, приведенной в SEQ ID NO: 246;

(3) слитый белок, содержащий: легкую цепь гуманизованного антитела к hTfR, которая имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 196; и тяжелую цепь гуманизованного антитела к hTfR, которая имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, которую соединяют, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с идуронат-2-сульфатазой человека, приведенной в SEQ ID NO: 246.

57. Слитый белок в соответствии с приведенным выше 50, в котором другой белок (А) представляет собой идуронат-2-сульфатазу человека и где слитый белок выбирают из следующих с (1) до (3):

(1) слитый белок, содержащий: идуронат-2-сульфатазу человека, соединенную через линкерную последовательность Gly-Ser с тяжелой цепью на ее С-концевой стороне; и легкую цепь, где аминокислотная последовательность из первой приведена в SEQ ID NO: 247 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 164,

(2) слитый белок, содержащий: идуронат-2-сульфатазу человека, соединенную через линкерную последовательность Gly-Ser с тяжелой цепью на ее С-концевой стороне; и легкую цепь, где аминокислотная последовательность из первой приведена в SEQ ID NO: 249 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 180, и

(3) слитый белок, содержащий: идуронат-2-сульфатазу человека, соединенную через линкерную последовательность Gly-Ser с тяжелой цепью на ее С-концевой стороне; и легкую цепь, где аминокислотная последовательность из первой приведена в SEQ ID NO: 251 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

58. Фрагмент ДНК, который кодирует аминокислотную последовательность антитела к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с от 1 до 40.

59. Фрагмент ДНК, который кодирует аминокислотную последовательность слитого белка в соответствии с одним из приведенных выше 41 до 57.

60. Экспрессирующий вектор, содержащий фрагмент ДНК в соответствии с приведенными выше 58 или 59, который встроено в него.

61. Клетка млекопитающего, трансформированная экспрессирующим вектором в соответствии с приведенным выше 60.

62. Комплекс антитела к рецептору трансферрина человека и фармакологически активного соединения, в котором легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с от 1 до 40 соединяют с низкомолекулярным фармакологически активным соединением, которому нужно позволять проходить через гематоэнцефалический барьер и проявлять свою функцию в головном мозге.

63. Антитело к рецептору трансферрина человека в соответствии с приведенным выше 62, где фармакологически активное соединение представляет собой какое-либо одно, выбранное из группы, состоящей из лекарственного средства против злокачественной опухоли, терапевтического средства для болезни Альцгеймера, терапевтического средства для болезни Паркинсона, терапевтического средства для хореи Гентингтона, терапевтического средства для шизофрении, антидепрессанта, терапевтического средства для рассеянного склероза, терапевтического средства для амиотрофического бокового склероза, терапевтического средства для опухолей центральной нервной системы, включая опухоль головного мозга, терапевтического средства для лизосомальной болезни накопления с сопутствующей энцефалопатией, терапевтического средства для гликогеноза, терапевтического средства для мышечной дистрофии, терапевтического средства для ишемии головного мозга, терапевтического средства для прионных заболеваний, терапевтического средства для травматических нарушений центральной нервной системы, терапевтического средства для вирусных и бактериальных заболеваний центральной нервной системы, фармацевтического средства, используемого для восстановления после хирургического вмешательства в головной мозг, фармацевтического средства, используемого для восстановления после хирургического вмешательства в спинной мозг, мРНК, антисмысловой ДНК и пептида.

64. Использование антитела к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с от 1 до 40, чтобы позволять другому белку (А) или низкомолекулярному фармакологически активному соединению проходить через гематоэнцефалический барьер и проявлять свою функцию в головном мозге.

65. Использование антитела к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с от 1 до 40 для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения состояния заболевания центральной нервной системы, соединяя его с молекулой физиологически активного белка или фармакологически активным низкомолекулярным соединением для состояния заболевания.

66. Способ лечения состояния заболевания центральной нервной системы, включающий парентеральное введение пациенту с нарушением терапевтически эффективного количества физиологически

активного белка или фармакологически активного низкомолекулярного соединения, для нарушения, в форме конъюгата с молекулой антитела к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с от 1 до 40.

67. Использование антитела к рецептору трансферрина человека в соответствии с одним из приведенных выше с 54 до 57, чтобы заставлять идуронат-2-сульфатазу человека проходить через гематоэнцефалический барьер и проявлять ее функцию в головном мозге.

68. Использование слитого белка в соответствии с одним из с 54 до 57 для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения состояния заболевания центральной нервной системы, сопровождающего синдром Хантера.

69. Способ лечения заболевания центральной нервной системы, сопровождающего синдром Хантера, который включает парентеральное введение терапевтически эффективного количества слитого белка в соответствии с одним из приведенных выше с 54 до 57 пациенту с заболеванием.

Эффекты изобретения

С помощью настоящего изобретения различные соединения, такие как белки и низкомолекулярные соединения, которые, несмотря на то, что они физиологически или фармакологически активны, нельзя использовать при парентеральном введении в силу их небольшой или нулевой способности проходить через гематоэнцефалический барьер, можно предоставлять в форме, которая позволяет им проходить через гематоэнцефалический барьер, таким образом делая их новыми фармацевтическими средствами для парентерального введения для лечения состояния заболевания центральной нервной системы.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Заменяющие фотографии для рисунков, которые показывают результат иммуногистохимического окрашивания антител к hTfR в коре головного мозга макака-крабоеда после одного внутривенного введения антитела к hTfR. (a) Антитело к hTfR не вводили, (b) вводили антитело к hTfR № 1, (c) вводили антитело к hTfR № 2, (d) вводили антитело к hTfR № 3. Отрезок справа внизу на каждой фотографии представляет собой 50-мкм эталон.

Фиг. 2. На фигуре представлен результат иммуногистохимического окрашивания антител к hTfR в гиппокампе макака-крабоеда после одного внутривенного введения антитела к hTfR. (a) Антитело к hTfR не вводили, (b) вводили антитело к hTfR № 1, (c) вводили антитело к hTfR № 2, (d) вводили антитело к hTfR № 3. Отрезок справа внизу на каждой фотографии представляет собой 50-мкм эталон.

Фиг. 3. Заменяющие фотографии для рисунков, которые показывают результат иммуногистохимического окрашивания антител к hTfR в мозжечке макака-крабоеда после одного внутривенного введения антитела к hTfR. (a) Антитело к hTfR не вводили, (b) вводили антитело к hTfR № 1, (c) вводили антитело к hTfR № 2, (d) вводили антитело к hTfR № 3. Отрезок справа внизу на каждой фотографии представляет собой 50-мкм эталон.

Фиг. 4. На фигуре представлено количество гуманизованного антитела к hTfR, накопленного в различных органах, отличных от головного мозга макака-крабоеда, после одного внутривенного введения. Вертикальная ось показывает количество гуманизованного антитела к hTfR (мкг/г влажной массы) на влажную массу каждого органа. Белые столбцы представляют, слева, количество, накопленное в каждом органе обезьяны после введения гуманизованного антитела к hTfR № 3, гуманизованного антитела к hTfR № 3-2, гуманизованного антитела к hTfR № 3 (IgG4) и гуманизованного антитела к hTfR № 3-2 (IgG4), соответственно, и черные столбцы представляют количество, накопленное в соответствующих органах обезьяны, после введения трастузумаба (герцептин™). "ND" означает "не обнаружено".

Фиг. 5. Заменяющие фотографии для рисунков, которые показывают результат иммуногистохимического окрашивания гуманизованного антитела к hTfR в коре головного мозга макака-крабоеда после одного внутривенного введения. (a) Вводили герцептин, (b) вводили гуманизованное антитело к hTfR № 3, (c) вводили гуманизованное антитело к hTfR № 3-2, (d) вводили гуманизованное антитело к hTfR № 3 (IgG4), (e) вводили гуманизованное антитело к hTfR № 3-2 (IgG4). Отрезок справа внизу на каждой фотографии представляет собой 20-мкм эталон.

Фиг. 6. Заменяющие фотографии для рисунка, которые показывают результат иммуногистохимического окрашивания гуманизованного антитела к hTfR в гиппокампе макака-крабоеда после одного внутривенного введения, (a) Вводили герцептин, (b) вводили гуманизованное антитело к hTfR № 3, (c) вводили гуманизованное антитело к hTfR № 3-2, (d) вводили гуманизованное антитело к hTfR № 3 (IgG4), (e) вводили гуманизованное антитело к hTfR № 3-2 (IgG4). Отрезок справа внизу на каждой фотографии представляет собой 20-мкм эталон.

Фиг. 7. На фигуре представлен результат иммуногистохимического окрашивания гуманизованного антитела к hTfR в мозжечке макака-крабоеда после одного внутривенного введения. (a) Вводили герцептин, (b) вводили гуманизованное антитело к hTfR № 3, (c) вводили гуманизованное антитело к hTfR № 3-2, (d) вводили гуманизованное антитело к hTfR № 3 (IgG4), (e) вводили гуманизованное антитело к hTfR № 3-2 (IgG4). Отрезок справа внизу на каждой фотографии представляет собой 20-мкм эталон.

Фиг. 8. На фигуре представлен результат иммуногистохимического окрашивания гуманизованно-

го антитела к hTfR в продолговатом мозге макака-крабоеда после одного внутривенного введения. (a) Вводили герцептин, (b) вводили гуманизированное антитело к hTfR № 3, (c) вводили гуманизированное антитело к hTfR № 3-2, (d) вводили гуманизированное антитело к hTfR № 3 (IgG4), (e) вводили гуманизированное антитело к hTfR № 3-2 (IgG4). Отрезок справа внизу на каждой фотографии представляет собой 20-мкм эталон.

Фиг. 9. На фигуре представлено количество I2S-антитела к hTfR и rhI2S, накопленных в тканях головного мозга макака-крабоеда после одного внутривенного введения. Вертикальная ось показывает количество I2S-антитела к hTfR и rhI2S на влажную массу тканей головного мозга (мкг/г влажной массы). Столбцы в точку представляют количество rhI2S, накопленной в тканях головного мозга макака-крабоеда. Столбцы в полоску представляют количество I2S-антитела к hTfR, накопленного в тканях головного мозга макака-крабоеда. Сегмент вертикальной линии показывает стандартное отклонение.

Фиг. 10. На диаграммах показано количество гликозаминогликана (GAG) в различных органах мышей с нокаутом гена I2S (I2S-KO мыши), которым внутривенно вводили гуманизированное антитело к hTfR или rhI2S. (a) Головной мозг, (b) печень, (c) легкое, (d) сердце. Для каждого графика столбцы представляют, слева, мышь дикого типа (WT), контрольную группу (группу без введения), группу введения 0,5 мг/кг, группу введения 1,0 мг/кг и группу введения 2,0 мг/кг. Вертикальная ось показывает количество GAG на сухую массу каждого органа (мкг/г сухой массы). Сегменты вертикальных линий показывают стандартное отклонение и "***" означает $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой в соответствии с критерием Дуннетта.

Варианты осуществления изобретения

В настоящем изобретении термин "антитело" относится преимущественно к антителу человека, антителу мыши, гуманизированному антителу, а также химерному антителу из антитела человека и антителу млекопитающего, не относящегося к человеку, и химерному антителу из антитела мыши и антителу млекопитающего, не относящегося к мыши, но значение термина не ограничено ими до такой степени, что вещество, представляющее интерес, обладает свойством специфически связываться с определенным антигеном, а также нет конкретного ограничения в отношении биологического вида животного, от которого происходит антитело.

В настоящем изобретении термин "антитело человека" относится к антителу, полноразмерный белок которого кодирует ген, происходящий от человека. Однако термин "антитело человека" также включает антитело, кодируемое геном, получаемым посредством введения мутации в исходный ген человека с целью усиления эффекта экспрессии гена, например, без модификации исходной аминокислотной последовательности. Термин "антитело человека" также включает антитело, которое можно получать через комбинацию двух или больше генов, кодирующих антитела человека, посредством замены определенной части антитела человека на часть другого антитела человека. Антитело человека содержит три определяющих комплементарности области (сокр. CDR) в легкой цепи иммуноглобулина и три определяющих комплементарности области (CDR) в тяжелой цепи иммуноглобулина. Три CDR в легкой цепи иммуноглобулина называют, с N-концевой стороны, CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно. Три CDR в тяжелой цепи иммуноглобулина также называют, с N-концевой стороны, CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно. Термин "антитело человека" также включает антитело человека, получаемое посредством замены CDR антитела человека на CDR другого антитела человека для того, чтобы модифицировать такие свойства, как антигенная специфичность и аффинность исходных антител человека, и т.д.

В настоящем изобретении термин "антитело человека" также включает антитело, которое получают через модификацию гена исходного антитела человека посредством введения мутации, такой как замена, делеция, добавление, в аминокислотную последовательность исходного антитела. При замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности исходного антитела на другие аминокислоты, число заменяемых аминокислот может составлять предпочтительно 1-20, более предпочтительно 1-5 и еще более предпочтительно 1-3. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности исходного антитела, число удаляемых аминокислот может составлять предпочтительно 1-20, более предпочтительно 1-5 и еще более предпочтительно 1-3. Антитело, получаемое посредством комбинированной мутации этих замены и делеции аминокислот, также представляет собой "антитело человека". В некоторых случаях, одну или несколько аминокислот, предпочтительно 1-20, более предпочтительно 1-5 и еще более предпочтительно 1-3 аминокислот можно добавлять внутрь аминокислотной последовательности исходного антитела или на ее N- или C-концевую сторону. Антитело, получаемое посредством комбинированной мутации из добавления, замены и делеции аминокислот, также представляет собой "антитело человека". Аминокислотная последовательность такого мутированного антитела обладает гомологией предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, еще более предпочтительно не ниже 95 и даже более предпочтительно не ниже 98% с аминокислотной последовательностью исходного антитела. Таким образом, в настоящем изобретении термин "ген, происходящий от человека" включает не только не мутированный ген, происходящий от человека, но также ген, получаемый посредством его модификации.

Гомологию между аминокислотной последовательностью не мутированного антитела и аминокислотной последовательностью антитела, получаемого посредством введения мутации в него, легко можно

вычислять с использованием общеизвестных алгоритмов вычисления гомологии. Примерами таких алгоритмов могут быть BLAST (Altschul SF. J Mol. Biol. 215. 403-10 (1990)), поиск сходства Пирсона и Липмана (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85. 2444 (1988)), и алгоритм локальной гомологии Смита и Вотермана (Adv. Appl. Math. 2. 482-9 (1981)) и т.п.

Термин "антитело мыши" относится к антителу, полноразмерный белок которого состоит из аминокислотной последовательности, которая является такой же, как антитело, кодируемое геном, происходящим от мыши. Следовательно, термин "антитело мыши" также включает антитело, которое кодирует ген, получаемый посредством введения мутации в исходный ген мыши, не вызывая изменения в его аминокислотной последовательности, но, например, чтобы улучшить эффективность экспрессии гена. Кроме того, термин "антитело мыши" также включает антитело, получаемое через комбинацию двух или больше генов, кодирующих антитела мыши, посредством замены части антитела мыши на часть другого антитела мыши. Антитело мыши имеет три определяющие комплементарность области (CDR) в легкой цепи иммуноглобулина и три определяющие комплементарность области (CDR) в тяжелой цепи иммуноглобулина. Три CDR в легкой цепи иммуноглобулина называют, с N-концевой стороны, CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно. Три CDR в тяжелой цепи иммуноглобулина также называют, с N-концевой стороны, CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно. Термин "антитело мыши" также включает антитело, получаемое посредством замены CDR антитела мыши на CDR другого антитела мыши для того, чтобы модифицировать специфичность и аффинность исходных антител мыши.

В настоящем изобретении термин "антитело мыши" также включает антитело, которое получают через модификацию гена исходного антитела мыши посредством введения мутации, такой как замена, делеция, добавление, в аминокислотную последовательность исходного антитела. При замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности исходного антитела на другие аминокислоты, число заменяемых аминокислот может составлять предпочтительно 1-20, более предпочтительно 1-5 и еще более предпочтительно 1-3. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности исходного антитела число удаляемых аминокислот может составлять предпочтительно 1-20, более предпочтительно 1-5 и еще более предпочтительно 1-3. Антитело, получаемое посредством комбинированной мутации этих замены и делеции аминокислот, также представляет собой "антитело мыши". При добавлении одной или нескольких аминокислот, которые можно добавлять в аминокислотную последовательность исходного антитела или на ее N- или C-концевую сторону, число составляет предпочтительно 1-20, более предпочтительно 1-5 и еще более предпочтительно 1-3. Антитело, получаемое посредством комбинированной мутации из добавления, замены и делеции аминокислот, также представляет собой "антитело мыши". Аминокислотная последовательность такого мутированного антитела имеет гомологию предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, еще более предпочтительно не ниже 95% и даже более предпочтительно не ниже 98%, с аминокислотной последовательностью исходного антитела. Таким образом, в настоящем изобретении термин "ген, происходящий от мыши" включает не только не мутированный ген, происходящий от мыши, но также ген, получаемый посредством его модификации.

В настоящем изобретении термин "гуманизованное антитело" относится к антителу, в котором часть аминокислотной последовательности его варибельной области (например, в частности, целиком или частично ее CDR) происходит от не относящегося к человеку млекопитающего, тогда как остальная часть происходит от человека. Примером гуманизованного антитела является антитело, получаемое посредством замены трех определяющих комплементарность областей (CDR) легкой цепи иммуноглобулина и трех определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи иммуноглобулина, образующих антитело человека, на CDR от млекопитающего, не относящегося к человеку. Поскольку они происходят от млекопитающего, не относящегося к человеку, нет конкретного ограничения в отношении биологического вида, от которого происходят эти CDR, которые трансплантируют в надлежащее положение в антителе человека, хотя предпочтительными являются мышь, крыса, кролик, лошадь или не являющийся человеком примат, более предпочтительными являются мышь и крыса, и, например, мышь.

В настоящем изобретении термин "химерное антитело" относится к антителу, получаемому посредством соединения фрагментов двух или больше различных антител, происходящих от двух или больше различных биологических видов.

Химерное антитело между антителом человека и антителом млекопитающего, не относящегося к человеку, представляет собой антитело, предоставленное посредством замены части антитела человека на часть антитела млекопитающего, не относящегося к человеку. Как изложено далее, антитело выполняют из Fc-области, Fab-области и шарнирной области. Конкретный пример таких химерных антител представляет собой химерное антитело, Fc-область которого происходит от антитела человека, тогда как его Fab-область происходит от антитела млекопитающего, не относящегося к человеку. Шарнирная область происходит или из антитела человека или из антитела млекопитающего, не относящегося к человеку. Напротив, термин химерное антитело также включает то, Fc-область которого происходит от антитела млекопитающего, не относящегося к человеку, тогда как его Fab-область происходит от антитела человека. В таком случае шарнирная область также может происходить или из антитела человека или из антитела млекопитающего, не относящегося к человеку. Напротив, также включено, например, химерное

антитело, Fc-область которого происходит от антитела млекопитающего, не относящегося к человеку, тогда как его Fab-область происходит от антитела человека. В этом случае шарнирная область также может происходить или из антитела человека или из антитела млекопитающего, не относящегося к человеку.

Антитело можно рассматривать как состоящее из переменной области и константной области. Дополнительные примеры химерных антител включают антитело, в котором константная область тяжелой цепи (CH) и константная область легкой цепи (CL) происходят из антитела человека, тогда как переменная область тяжелой цепи (VH) и переменная область легкой цепи (VL) происходят из антитела млекопитающего, не относящегося к человеку, и, наоборот, антитело, в котором константная область тяжелой цепи (CH) и константная область легкой цепи (CL) происходят из антитела млекопитающего, не относящегося к человеку, тогда как переменная область тяжелой цепи (VH) и переменная область легкой цепи (VL) происходят из антитела человека. Для них нет конкретного ограничения в отношении биологического вида млекопитающего, не относящегося к человеку, до тех пор, пока он представляет собой млекопитающее, не относящееся к человеку, хотя предпочтительными являются мышь, крыса, кролик, лошадь или не являющийся человеком примат, и более предпочтительным является мышь.

Химерное антитело из антитела мыши и антитела млекопитающего, не относящегося к мыши, представляет собой антитело, предоставляемое посредством замены части антитела мыши на часть антитела млекопитающего, не относящегося к мыши. Конкретные примеры таких химерных антител включают химерное антитело, Fc-область которого происходит из антитела мыши, тогда как его Fab-область происходит из антитела млекопитающего, не относящегося к мыши, и наоборот, химерное антитело, Fc-область которого происходит от млекопитающего, не относящегося к мыши, тогда как его Fab-область происходит из антитела мыши. Для них нет конкретного ограничения в отношении биологического вида млекопитающего, не относящегося к мыши, до тех пор, пока она является млекопитающим, отличным от мыши, хотя предпочтительными являются крыса, кролик, лошадь или не являющийся человеком примат, и более предпочтительным является человек.

Химерное антитело из антитела человека и антитела мыши обозначают, в частности, "химерное антитело человека/мыши". Примеры химерных антител человека/мыши включают химерное антитело, в котором Fc-область происходит от антитела человека, тогда как Fab-область происходит из антитела мыши, и, наоборот, химерное антитело, Fc-область которого происходит от антитела мыши, тогда как его Fab-область происходит от антитела человека. Шарнирная область происходит или из антитела человека или из антитела мыши. Дополнительные конкретные примеры химерных антител человека/мыши включают те, константная область тяжелой цепи (CH) которых и константная область легкой цепи (CL) которых происходят из антитела человека, тогда как их переменная область тяжелой цепи (VH) и переменная область легкой цепи (VL) происходят из антитела мыши, и, наоборот, те, константная область тяжелой цепи (CH) и константная область легкой цепи (CL) которых происходят из антитела мыши, тогда как их переменная область тяжелой цепи (VH) и переменная область легкой цепи (VL) происходят из антитела человека.

Исходно антитело имеет базовую структуру, содержащую всего четыре полипептидные цепи, которые состоят из двух легких цепей иммуноглобулинов и двух тяжелых цепей иммуноглобулинов. Однако в настоящем изобретении термин "антитело" относится, помимо антитела, имеющего эту базовую структуру, также к:

(1) тому, которое состоит из двух полипептидных цепей: одна легкая цепь иммуноглобулина и одна тяжелая цепь иммуноглобулина, и также как изложено далее,

(2) одноцепочечному антителу, которое состоит из легкой цепи иммуноглобулина, которую соединяют, на ее C-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которую в свою очередь соединяют, на ее C-концевой стороне, с тяжелой цепью иммуноглобулина,

(3) одноцепочечным антителам, которые состоят из тяжелой цепи иммуноглобулина, которую соединяют, на ее C-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которую в свою очередь соединяют, на ее C-концевой стороне, с легкой цепью иммуноглобулина, и

(4) тому, которое состоит из Fab-области, т.е. структуры, остающейся после удаления Fc-области из антитела, имеющего базовую структуру, в исходном значении, и тому, которое состоит из Fab-области и целой или частичной шарнирной области (включая Fab, F(ab') и F(ab')₂), которые также включены в термин "антитело" в настоящем изобретении.

Термин "Fab" относится к молекуле, состоящей из одной легкой цепи, содержащей переменную область, и CL-область (константную область легкой цепи) и одной тяжелой цепи, содержащей переменную область и C_H1-область (часть 1 константной области тяжелой цепи), которые объединяют дисульфидной связью между их соответствующими остатками цистеина. Хотя тяжелая цепь в Fab может содержать часть шарнирной области в дополнение к переменной области и C_H1-области (часть 1 константной области тяжелой цепи), шарнирная область в таком случае не содержит остаток цистеина, который в ином случае присутствует в шарнирной области и служит для связи двух тяжелых цепей антитела вместе. В Fab легкую цепь и тяжелую цепь соединяют с помощью дисульфидной связи, образуемой между остатком цистеина, присутствующим в константной области легкой цепи (CL-области), и остат-

ком цистеина, расположенным в константной области тяжелой цепи (C_{H1} -область) или шарнирной области. Поскольку он не содержит остаток цистеина в шарнирной области, который служит для связывания двух тяжелых цепей антитела, Fab состоит из одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Легкая цепь, образующая Fab, содержит переменную область и CL-область. Тяжелая цепь в качестве компонента Fab может состоять или из переменной области и C_{H1} -область или также из части шарнирной области в дополнение к переменной области и C_{H1} -области. Однако в последнем случае шарнирную область выбирают так, что она не содержит остаток цистеина, который может связывать две тяжелые цепи, во избежание формирования дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями в их шарнирных областях. В $F(ab')$ тяжелая цепь содержит, в дополнение к переменной области и C_{H1} -области, целую или частичную шарнирную область, содержащую остаток цистеина, который может связывать две тяжелые цепи. $F(ab')_2$ представляет собой молекулу, состоящую из двух $F(ab')$, связанных вместе через дисульфидную связь, образованную между остатками цистеина, присутствующими в соответствующих им шарнирных областях. Кроме того, полимер, такой как димер и тример, который состоит из двух или больше антител, соединенных друг с другом, непосредственно или через линкер, также включен в термин "антитело". Кроме того, в дополнение к указанному выше, какая-либо молекула, которая содержит часть молекулы иммуноглобулина и обладает свойством специфического связывания с антигеном, также включена в термин "антитело" в настоящем изобретении. Таким образом, в настоящем изобретении термин "легкая цепь иммуноглобулина" включает молекулу, которую извлекают из исходной легкой цепи иммуноглобулина и которая имеет аминокислотную последовательность целой его переменной области или ее части. Аналогичным образом, термин "тяжелая цепь иммуноглобулина" включает молекулу, которую извлекают из исходной тяжелой цепи иммуноглобулина и которая имеет аминокислотную последовательность целой его переменной области или ее части. Следовательно, до тех пор, пока содержится целая аминокислотная последовательность переменной области или ее часть, молекула включена в термин "тяжелая цепь иммуноглобулина", даже если она не содержит, например, ее Fc-область.

В приведенном выше термин "Fc" или "Fc-область" относится к области, которая содержит фрагмент, состоящий из CH2-области (части 2 константной области тяжелой цепи) и CH3-области (части 3 константной области тяжелой цепи) в молекуле антитела.

Кроме того, в настоящем изобретении термин "антитело" также включает:

(5) scFab, scF(ab') и scF(ab')₂, которые представляют собой одноцепочечные антитела, получаемые посредством связывания легкой цепи с тяжелой цепью, которые формируют, соответственно, Fab, F(ab') и F(ab')₂, упомянутые выше в (4), через линкерную последовательность. Такие scFab, scF(ab') и scF(ab')₂ могут представлять собой молекулу, в которой или легкую цепь соединяют, на ее C-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которую в свою очередь соединяют, на ее C-концевой стороне, с тяжелой цепью, или тяжелую цепь соединяют, на ее C-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которую в свою очередь соединяют, на ее C-концевой стороне, с легкой цепью. Кроме того, scFv, которое представляет собой одноцепочечное антитело, предоставляемое посредством связывания переменной области легкой цепи с переменной областью тяжелой цепи, через линкерную последовательность между ними, также включено в термин "антитело" в настоящем изобретении. Такое scFv может представлять собой молекулу, в которой или переменную область легкой цепи соединяют, на ее C-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которую в свою очередь соединяют, на ее C-концевой стороне, с переменной областью тяжелой цепи, или переменную область тяжелой цепи соединяют, на ее C-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которую в свою очередь соединяют, на ее C-концевой стороне, с переменной областью легкой цепи.

Кроме того, в дополнение к полноразмерному антителу и тем, которые описаны выше в с (1) до (5), термин "антитело" в настоящем описании включает какую-либо форму антигенсвязывающего фрагмента, который не содержит часть полноразмерного антитела (фрагмент антитела), более широкую идею, которая включает приведенные выше (4) и (5).

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, который сохраняет по меньшей мере часть специфической связывающей активности со своим антигеном. В дополнение к тем, которые описаны выше в (4) и (5), примеры связывающих фрагментов включают Fab, Fab', F(ab')₂, переменную область (Fv): одноцепочечное антитело (scFv), получаемое посредством соединения переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL), через надлежащий линкер между ними; диатело, которое представляет собой димер полипептида, который содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL): миниантитело, которое представляет собой димер молекулы, в которой тяжелую цепь (H-цепь) в scFv соединяют с частью константной области (CH3), и другие низкомолекулярные антитела. Однако до тех пор, пока оно обладает антигенсвязывающей способностью, термин не ограничен этими молекулами. Такие связывающие фрагменты включают не только те, которые получают посредством обработки полноразмерной молекулы белка антитела надлежащим ферментом, но также те, которые получают с помощью надлежащих клеток-хозяев, используя генетически сконструированный ген антитела.

В настоящем изобретении термин "одноцепочечное антитело" относится к белку, в котором аминокислотная последовательность, содержит целую или частичную переменную область легкой цепи им-

муноглобулина, соединенную, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которую в свою очередь соединяют, на ее С-концевой стороне, с аминокислотной последовательностью целой или частичной вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина, и обладает способностью к специфическому связыванию определенного антигена. Например, те, которые описаны в (2), (3) и (5), включены в "одноцепочечное антитело". Кроме того, белок, в котором аминокислотную последовательность, которая содержит целую или частичную вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, соединяют, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которую в свою очередь дополнительно соединяют, на ее С-концевой стороне, с аминокислотной последовательностью целой или частичной вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина, и который обладает способностью к специфическому связыванию с определенным антигеном, также включен в термин "одноцепочечное антитело" в настоящем изобретении. В одноцепочечном антителе, в котором тяжелую цепь иммуноглобулина соединяют, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность, с легкой цепью иммуноглобулина, тяжелая цепь иммуноглобулина в целом не содержит Fc-область. Вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит три определяющих комплементарности области (CDR), которые участвуют в определении антигенной специфичности антитела. Аналогичным образом, вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина также содержит три CDR. Эти CDR представляют собой основные области, которые определяют антигенную специфичность антитела.

Следовательно, одноцепочечное антитело предпочтительно содержит все три CDR тяжелой цепи иммуноглобулина и все три CDR легкой цепи иммуноглобулина. Однако, также возможно предусматривать одноцепочечное антитело, в котором одну или несколько из этих CDR удаляют, до тех пор, пока сохраняется антигенспецифическая аффинность антитела.

В одноцепочечном антителе линкерная последовательность, которую помещают между легкой цепью и тяжелой цепью иммуноглобулина, предпочтительно представляет собой пептидную цепь, состоящую предпочтительно из от 2 до 50, более предпочтительно от 8 до 50, еще более предпочтительно от 10 до 30, даже более предпочтительно от 12 до 18 или от 15 до 25, например 15 или 25 аминокислотных остатков. Хотя нет конкретного ограничения в отношении конкретной аминокислотной последовательности для такой линкерной последовательности до тех пор, пока антитело к hTfR, содержащее обе цепи, соединенные таким образом, сохраняет аффинность к hTfR, предпочтительно ее выполняют только из глицина или из глицина и серина: например, аминокислотная последовательность Gly-Ser, аминокислотная последовательность Gly-Gly-Ser, аминокислотная последовательность Gly-Gly-Gly, аминокислотная последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотная последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотная последовательность Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательность, которая содержит от 2 до 10 или от 2 до 5 повторов каких-либо из этих аминокислотных последовательностей. Например, при соединении аминокислотной последовательности всей вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность, с вариабельной областью легкой цепи иммуноглобулина, линкерная последовательность предпочтительно представляет собой линкерную последовательность, которая содержит 15 аминокислот, соответствующих трем аминокислотным последовательностям Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), соединенным последовательно.

В настоящем изобретении термин "рецептор трансферрина человека" или "hTfR" относится к мембранному белку, имеющему аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. Антитело к hTfR по настоящему изобретению, в одном из его вариантов осуществления, представляет собой то, которое специфически связывается с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, в ее части, начинающейся в остатка цистеина в положении 89 с N-концевой стороны до фенилаланина на С-конце (т.е. внеклеточной областью hTfR), хотя оно не ограничено этим вариантом осуществления. Кроме того, в настоящем изобретении термин "рецептор трансферрина обезьяны" или "TfR обезьяны" относится, в частности, к мембранному белку, имеющему аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, которая происходит от макака-крабоеда (*Macaca fascicularis*). Антитело к hTfR по настоящему изобретению, в одном из его вариантов осуществления, представляет собой то, которое связывается также с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2, в ее части, начинающейся с остатка цистеина в положении 89 с N-концевой стороны, до фенилаланина на С-конце (т.е. внеклеточной областью TfR обезьяны), хотя оно не ограничено этим вариантом осуществления.

Для получения антитела к hTfR известен основной способ, в соответствии с которым рекомбинантный рецептор трансферрина человека (rhTfR) получают с использованием клеток, которым введен экспрессирующий вектор, имеющий встроенный ген hTfR, и затем животных, таких как мыши, иммунизируют с использованием этого rhTfR. Собирая те клетки, которые продуцируют антитела к hTfR, у иммунизированных животных и сливая их с миеломными клетками, можно получать гибридомные клетки, обладающие способностью продуцировать антитело.

Кроме того, клетки, продуцирующие антитело к hTfR, также можно получать, собирая иммунокомпетентные клетки у животного, такого как мышь, и иммунизируя их с использованием rhTfR посредством иммунизации *in vitro*. При проведении иммунизации *in vitro* нет конкретного ограничения в отношении биологического вида животного, у которого получают иммунокомпетентные клетки, хотя предпоч-

тельными являются мышь, крыса, кролик, морская свинка, собака, кошка, лошадь и приматы, включая человека, и более предпочтительными являются мышь, крыса и человек, и еще более предпочтительно мышь и человек. В качестве иммунокомпетентных клеток мыши можно использовать, например, клетки селезенки, полученные из селезенки мыши. В качестве иммунокомпетентных клеток человека можно использовать такие клетки, как получают из периферической крови, костного мозга, селезенки человека и т.п. Посредством иммунизации иммунокомпетентных клеток человека в соответствии с иммунизацией *in vitro*, можно получать антитело человека к hTfR.

После иммунизации иммунокомпетентных клеток в соответствии с иммунизацией *in vitro*, клетки можно сливать с миеломными клетками для того, чтобы получать гибридные клетки, обладающие способностью продуцировать антитело. Кроме того, также возможно извлекать мРНК из иммунизированных клеток, синтезировать кДНК, проводить реакцию ПЦР с использованием кДНК в качестве матрицы, чтобы амплифицировать фрагмент ДНК, содержащий ген, кодирующий легкую цепь и тяжелую цепь иммуноглобулина, и искусственно реконструировать ген антитела, используя их.

Гибридные клетки, свежеполученные выше, также включают такие клетки, которые продуцируют антитела, которые распознают другие белки, нежели hTfR. Кроме того, не все гибридные клетки, продуцирующие антитело к hTfR, обязательно продуцируют антитело к hTfR, которое проявляет высокие аффинности к hTfR.

Аналогичным образом, искусственно реконструированные гены антител включают такие гены, которые кодируют антитела, распознающие другие белки, нежели hTfR, в качестве антигенов. Кроме того, не все гены, кодирующие антитела к hTfR, обязательно обладают желаемыми свойствами, такими как кодирование антитела к hTfR, проявляющего высокую аффинность к hTfR.

Следовательно, необходима стадия отбора для того, чтобы отбирать гибридные клетки, продуцирующие антитело, обладающее желаемыми свойствами (такими как высокая аффинность к hTfR), из гибридных клеток, свежеполученных выше. Кроме того, в случае, когда гены антител реконструируют искусственно, стадия отбора необходима для того, чтобы среди генов антител отбирать ген, кодирующий антитело, обладающее желаемыми свойствами (такими как высокие аффинности к hTfR). Для отбора гибридных клеток, которые продуцируют антитела, демонстрирующие высокие аффинности к hTfR (высокоаффинные антитела), или для отбора генов, кодирующих высокоаффинные антитела, эффективны следующие способы, которые объяснены подробно далее. Помимо того, антитела, демонстрирующие высокую аффинность к hTfR, представляют собой те, у которых константа диссоциации (K_D) с hTfR, как измеряют способом, описанным в примере 7, предпочтительно не превышает 1×10^{-8} М, более предпочтительно не превышает 1×10^{-9} М, еще более предпочтительно не превышает 1×10^{-10} М и даже более предпочтительно не превышает 1×10^{-11} М. Например, предпочтительными являются те, которые имеют константу диссоциации от 1×10^{-13} до 1×10^{-9} М или от 1×10^{-13} до 1×10^{-10} М.

Например, для отбора гибридных клеток, которые продуцируют высокоаффинные антитела, для антитела к hTfR, используют способ, в котором рекомбинантный hTfR добавляют в планшет и удерживают в нем, затем добавляют культуральный супернатант гибридных клеток, и после удаления антитела, не связанного с рекомбинантным hTfR, из планшета, измеряют количество антитела, удержанного планшетом. В соответствии с этим способом, чем выше аффинность к hTfR у антитела, содержащегося в культуральном супернатанте гибридных клеток, добавленном в планшет, тем выше становится количество антитела, удерживаемого планшетом. Следовательно, посредством измерения количества антитела, удерживаемого планшетом, возможно отбирать те гибридные клетки, которые соответствуют планшетам, где антитело удерживается в большем количестве, в виде клеточных линий, продуцирующих антитело к hTfR, обладающее относительно высокой аффинностью к hTfR. Также возможно выделять ген, кодирующий высокоаффинное антитело посредством извлечения мРНК из каждой клеточной линии, отобранной таким образом, синтеза кДНК и амплификации фрагмента ДНК, содержащего ген, кодирующий антитело к hTfR, посредством ПЦР с использованием кДНК в качестве матрицы.

Для того чтобы отбирать ген, кодирующий высокоаффинное антитело к hTfR, среди вышеуказанных искусственно реконструированных генов антител, искусственно реконструированные гены антител встраивают в экспрессирующий вектор и затем экспрессирующий вектор вводят в клетки-хозяева. Несмотря на то, что нет конкретного ограничения в отношении клеток, подлежащих использованию в качестве клеток-хозяев, даже будь они прокариотическими эукариотическими, до тех пор, пока они могут экспрессировать ген антитела после введения экспрессирующего вектора, имеющего встроенный искусственно реконструированный ген антитела, предпочтительными являются клетки, происходящие от млекопитающих, таких как человек, мышь, китайский хомяк и т.п., и особенно предпочтительными являются клетки СНО, происходящие от клеток яичника китайского хомяка, или клетки NS/0, происходящие от миеломы мыши. Кроме того, нет конкретного ограничения в отношении экспрессирующего вектора, подлежащего использованию для встраивания гена, кодирующего антитело, и его экспрессии, и можно использовать любой экспрессирующий вектор, до тех пор, пока он может экспрессировать ген при встраивании в клетки млекопитающих. Ген, встраиваемый в экспрессирующий вектор, располагают ниже по направлению считывания от последовательности ДНК, которая может регулировать частоту тран-

скрипции гена в клетках млекопитающих (участок регуляции экспрессии гена). Примеры участков регуляции экспрессии гена, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают цитомегаловирусный промотор, ранний промотор SV40, промотор фактора элонгации-1 α (EF-1 α) человека, промотор убиквитина С человека.

Клетки млекопитающих, имеющие такой введенный экспрессирующий вектор, экспрессируют искусственно реконструированное антитело, встроенное в экспрессирующий вектор. Для того чтобы отбирать те клетки, которые продуцируют высокоаффинное антитело, для антитела к hTfR из полученных выше клеток, экспрессирующих искусственно реконструированное антитело, используют способ, в котором рекомбинантный hTfR добавляют в планшет и удерживают с его помощью, затем рекомбинантный hTfR приводят в контакт с культуральным супернатантом клеток и после удаления антитела, не связанного с рекомбинантным hTfR, из планшета, измеряют количество антитела, удерживаемого планшетом. В соответствии с этим способом, чем выше аффинность к hTfR у антитела, содержащегося в культуральном супернатанте клеток, тем выше количество антитела, удерживаемого планшетом. Следовательно, посредством измерения количества антитела, удерживаемого планшетом, можно отбирать те клетки, которые соответствуют планшету, в котором антитело удерживают в большем количестве, в качестве клеточной линии, продуцирующей антитело к hTfR, имеющее относительно высокоаффинное антитело к hTfR, и в конечном итоге можно отбирать ген, кодирующий антитело к hTfR, имеющее антитело к hTfR с высокой аффинностью к hTfR. Используя клеточную линию, отобранную таким образом, можно выполнять ПЦР для того, чтобы амплифицировать фрагмент ДНК, содержащий ген, кодирующий антитело к hTfR, чтобы выделять ген, кодирующий высокоаффинное антитело.

Отбор гена, кодирующего высокоаффинное антитело к hTfR, среди вышеуказанных искусственно реконструированных генов антител, также можно осуществлять посредством встраивания искусственно реконструированных генов антител в экспрессирующий вектор, введения экспрессирующего вектора в клетки *E.coli*, культивирования клеток *E.coli* и отбора клеток *E.coli*, имеющих желаемый ген, аналогичным образом, как в приведенном выше отборе гибридных клеток, используя культуральный супернатант клеток *E.coli* или антителосодержащий раствор, полученный посредством лизирования клеток *E.coli*. Отобранные таким образом клетки *E.coli* экспрессируют ген, кодирующий антитело к hTfR, имеющее антитело к hTfR с относительно высокой аффинностью к hTfR. Из этой клеточной линии можно отбирать ген, кодирующий антитело к hTfR, содержащее относительно высокоаффинное антитело к hTfR. Для того чтобы допускать секрецию антитела в культуральный супернатант *E.coli*, ген антитела можно встраивать в экспрессирующий вектор с тем, чтобы прикреплять последовательность сигнала секреции на N-концевую сторону гена.

Другой способ отбора гена, кодирующего высокоаффинное антитело к hTfR, представляет собой способ, в котором антитело, кодируемое вышеуказанным искусственно реконструированным геном антитела, экспрессируют и сохраняют на фаговых частицах. Для этого ген антитела реконструируют в качестве гена, кодирующего одноцепочечное антитело. Способ сохранения фаговых частиц, чтобы сохранять антитело на их поверхности, раскрыт в международных публикациях WO1997/09436 и WO1995/11317 и т.п., и, таким образом, хорошо известен. Для того чтобы отбирать фаги, сохраняющие высокоаффинное антитело для антитела к hTfR, из фагов, сохраняющих антитела, кодируемые искусственно реконструированными генами антител, используют способ, в котором рекомбинантный hTfR из планшета добавляют в планшет и удерживают фагами и приводят в контакт с ними, и после удаления фагов, не связанных с рекомбинантным hTfR, измеряют количество фагов, удерживаемых планшетом. В соответствии с этим способом, чем выше аффинность к hTfR у антитела, сохраняемого на фаговых частицах, тем выше количество фага, удерживаемого планшетом. Следовательно, посредством измерения количества фага, удерживаемого планшетом, можно отбирать фаговые частицы, соответствующие планшету, в котором фаги удерживались в более высоком количестве, в качестве фаговых частиц, продуцирующих антитело к hTfR, имеющее антитело к hTfR с относительно высокой аффинностью к hTfR, и в конечном итоге можно отбирать ген, кодирующий антитело к hTfR с высокой аффинностью к hTfR. Используя фаговые частицы, отобранные таким образом, ПЦР можно осуществлять для того, чтобы амплифицировать фрагмент ДНК, содержащий ген, кодирующий антитело к hTfR, и выделять ген, кодирующий высокоаффинное антитело.

Возможно получать кДНК или фаговую ДНК из вышеуказанных клеток, таких как гибридные клетки, продуцирующие высокоаффинное антитело к hTfR, или из вышеуказанных фаговых частиц, сохраняющих высокоаффинное антитело к hTfR, и осуществлять ПЦР или тому подобное, используя ее в качестве матрицы для того, чтобы амплифицировать и выделять фрагмент ДНК, содержащий ген, кодирующий целиком или частично легкую цепь антитела к hTfR, тяжелую цепь антитела к hTfR или одноцепочечное антитело, в качестве антитела к hTfR. Аналогичным образом, также возможно осуществлять ПЦР или тому подобное для того, чтобы амплифицировать и выделять фрагмент ДНК, содержащий ген, кодирующий целиком или частично переменную область легкой цепи антитела к hTfR, или фрагмент ДНК, содержащий ген, кодирующий целиком или частично переменную область тяжелой цепи антитела к hTfR.

Высокоаффинное антитело к hTfR можно получать посредством встраивания целого или частично-

го гена, кодирующего легкую цепь и тяжелую цепь этого высокоаффинного антитела к hTfR, в экспрессирующем векторе, трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, этим экспрессирующим вектором и культивирования полученных трансформированных клеток. Используя нуклеотидную последовательность выделенного гена, кодирующего антитело к hTfR, также возможно транслировать аминокислотную последовательность антитела к hTfR и искусственно синтезировать фрагмент ДНК, который кодирует ту же аминокислотную последовательность. При искусственном синтезе фрагмента ДНК, уровень экспрессии антитела к hTfR в клетках-хозяевах можно увеличивать посредством надлежащего выбора кодонов.

Для того чтобы вводить мутацию, такую как замена, делеция, добавления и т.п., в аминокислотную последовательность исходного антитела к hTfR, мутацию можно вводить по желанию в ген, кодирующий антитело к hTfR, содержащийся в выделенном фрагменте ДНК. Хотя ген, кодирующий мутированное антитело к hTfR, обладает гомологией предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90% с исходным геном, нет конкретного ограничения в отношении уровня гомологии. Посредством введения мутации в аминокислотную последовательность с тем, чтобы модифицировать число или тип цепей сахаров, связанных с антителом к hTfR, также возможно увеличивать стабильность антитела к hTfR в организме.

При введении мутации в ген, кодирующий целиком или частично вариабельную область легкой цепи антитела к hTfR, мутированный таким образом ген имеет гомологию, которая предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90% с исходным геном, хотя нет конкретного ограничения в отношении уровня гомологии. При замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно от 1 до 5, еще более предпочтительно от 1 до 3 и даже более предпочтительно 1 или 2. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно от 1 до 5, еще более предпочтительно от 1 до 3, даже более предпочтительно 1 или 2. Также можно осуществлять комбинированную мутацию из этих замены и делеции аминокислот. При добавлении одной или нескольких аминокислот в вариабельную область легкой цепи, их можно добавлять внутрь или на N-концевой стороне или C-концевой стороне аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, и число добавляемых аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно от 1 до 5, еще более предпочтительно от 1 до 3 и даже более предпочтительно 1 или 2. Также можно осуществлять комбинированную мутацию из этих добавления, замены и делеции аминокислот. Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи, мутированная таким образом, имеет гомологию, которая предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходной вариабельной области легкой цепи. В частности, при замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности CDR на другие аминокислоты, число заменяемых аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 5, более предпочтительно от 1 до 3, еще более предпочтительно 1 или 2. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности CDR, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет от 1 до 5, более предпочтительно от 1 до 3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно осуществлять комбинированную мутацию этих замены и делеции аминокислот. При добавлении одной или нескольких аминокислот, их можно добавлять внутрь или на N-концевую сторону или C-концевую сторону аминокислотной последовательности, и число добавляемых аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 5, более предпочтительно от 1 до 3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно осуществлять комбинированную мутацию из этих добавления, замены и делеции аминокислот. Аминокислотная последовательность соответствующей мутированной CDR обладает гомологией, которая предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90% и еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходной CDR.

При введении мутации в ген, кодирующий целиком или частично вариабельную область тяжелой цепи антитела к hTfR, ген, мутированный таким образом, обладает гомологией, которая предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, с исходным геном, хотя нет конкретного ограничения в отношении уровня гомологии. При замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно от 1 до 5, еще более предпочтительно от 1 до 3 и даже более предпочтительно 1 или 2. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно от 1 до 5, еще более предпочтительно от 1 до 3, даже более предпочтительно 1 или 2. Также можно осуществлять комбинированную мутацию из этих замены и делеции аминокислот. При добавлении одной или нескольких аминокислот в вариабельную область тяжелой цепи, их можно добавлять внутрь или на N-концевую сторону или C-концевую сторону аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, и число добавляемых аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно

от 1 до 5, еще более предпочтительно от 1 до 3 и даже более предпочтительно 1 или 2. Также можно осуществлять комбинированную мутацию из этих добавления, замены и делеции аминокислот. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи, мутированная таким образом, обладает гомологией, которая предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходной варибельной области тяжелой цепи. В частности, при замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности CDR на другие аминокислоты, число заменяемых аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 5, более предпочтительно от 1 до 3, еще более предпочтительно 1 или 2. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности CDR, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет от 1 до 5, более предпочтительно от 1 до 3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно осуществлять комбинированную мутацию из этих замены и делеции аминокислот. При добавлении одной или нескольких аминокислот, их можно добавлять внутрь или на N-концевую сторону или C-концевую сторону аминокислотной последовательности, и число добавляемых аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 5, более предпочтительно от 1 до 3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно осуществлять комбинированную мутацию из этих добавления, замены и делеции аминокислот. Аминокислотная последовательность соответствующей мутированной CDR обладает гомологией, которая предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90% и еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходной CDR.

Мутацию можно вводить в варибельные области как легкой цепи, так и тяжелой цепи антитела к hTfR, посредством комбинирования вышеуказанной мутации в варибельной области легкой цепи антитела к hTfR и вышеуказанной мутации в варибельной области тяжелой цепи антитела к hTfR.

Примеры указанной выше замены одной или нескольких аминокислот в аминокислотной последовательности легкой цепи и тяжелой цепи антитела к hTfR включают замену между кислыми аминокислотами, т.е. аспарагиновой кислотой и глутаминовой кислотой, замену между аминокислотами амидного типа, т.е. аспарагином и глутамином, замену между основными аминокислотами, т.е. лизином и аргинином, замену между разветвленными аминокислотами, т.е. валином, лейцином и изолейцином, замену между алифатическими аминокислотами, т.е. глицином и аланином, замену между гидроксикаминокислотами, т.е. серином и треонином, и замену между ароматическими аминокислотами, т.е. фенилаланином и тирозином.

Помимо того, в случае, когда мутацию вводят в антитело к hTfR посредством добавления одной или нескольких аминокислот на C-конец или N-конец, если антитело к hTfR и другой белок (A) сливают, размещая добавляемые аминокислоты между ними, добавляемые аминокислоты составляют часть линкера. Далее приведено подробное объяснение относительно линкера, который помещают между антителом к hTfR и другим белком (A) в случае, когда антитело к hTfR сливают с другим белком (A).

Антитело к hTfR, получаемое посредством выращивания клеток, отобранных с помощью приведенных выше способов и т.п., в качестве продуцирующих антитело к hTfR, которое имеет антитело к hTfR с относительно высокой аффинностью к hTfR, и антитело к hTfR, получаемое посредством экспрессии гена, кодирующего высокоаффинное антитело к hTfR, можно модифицировать посредством введения мутации в любые аминокислотные последовательности, такой как замена, делеция, добавление, чтобы придавать им желаемые свойства. Введение мутации в аминокислотную последовательность антитела к hTfR можно осуществлять посредством введения мутации в ген, соответствующий аминокислотной последовательности.

Аффинность к hTfR у антитела к hTfR можно корректировать по желанию посредством введения мутации, такой как замена, делеция и добавление, в аминокислотную последовательность варибельной области антитела. Например, если антитело имеет такую высокую аффинность к своему антигену, которая ведет к очень низкой константе диссоциации в воде, существует возможность, что антитело, после введения в организм, не сможет диссоциировать от антигена, тем самым приводя к функциональному недостатку. В таком случае, наиболее предпочтительное антитело, подходящее для данной цели, можно получать посредством введения мутации в варибельную область антитела с тем, чтобы корректировать его константу диссоциации постепенно в 2-5 раз, 5-10 раз, 10-100 раз относительно исходного антитела и так далее. Наоборот, константу диссоциации можно корректировать постепенно в 1/2-1/5 раза, 1/5-1/10 раза, 1/10-1/100 раза относительно исходного антитела и так далее, посредством введения мутации.

Введение мутации, такой как замена, делеция и добавление, в аминокислотную последовательность антитела к hTfR можно осуществлять посредством введения мутации в определенные положения нуклеотидной последовательности гена, например, посредством ПЦР или тому подобного, используя ген, кодирующий антитело к hTfR в качестве матрицы, или посредством случайного введения мутации.

Введение мутации в аминокислотную последовательность антитела к hTfR для корректировки аффинности антитела к hTfR можно осуществлять, например, посредством встраивания гена, кодирующего антитело к hTfR в виде одноцепочечного антитела, в фагмиду, получения, с использованием этой фагмиды, фага с экспрессированным одноцепочечным антителом на поверхности его капсида, обеспечения размножения фага при введении мутации в ген, кодирующий одноцепочечное антитело, посредством применения мутагена или тому подобного, и отбора, из размноженного фага, фага, экспрессирующего

одноцепочечное антитело, обладающее желаемой константой диссоциации или способом, описанным выше, или с помощью очистки с использованием колонки с антигеном при определенных условиях.

Антитела, обладающие относительно высокой аффинностью к hTfR, получаемые посредством указанного выше способа отбора клеток, продуцирующих высокоаффинное антитело, представляют собой те, у которых константа диссоциации (K_D) с hTfR, как измеряют способом, описанным в примере 7, предпочтительно не превышает 1×10^{-8} М, более предпочтительно не превышает 1×10^{-9} М, еще более предпочтительно не превышает 1×10^{-10} М и даже более предпочтительно не превышает 1×10^{-11} М. Например, предпочтительными являются те, которые обладают константой диссоциации от 1×10^{-13} до 1×10^{-9} М или от 1×10^{-13} до 1×10^{-10} М. То же самое также применимо, если антитела представляют собой одноцепочечные антитела. Когда получают антитело, его можно модифицировать по желанию, например, посредством введения мутации, чтобы придавать ему желаемое свойство.

Антитело, обладающее аффинностью к TfR как человека, так и обезьяны, можно получать посредством отбора антител, обладающих аффинностью к TfR обезьяны, среди антител, обладающих относительно высокой аффинностью, которые получены описанным выше способом, включающим отбор клеток, продуцирующих высокоаффинное антитело. Отбор антител, обладающих аффинностью к TfR обезьяны, можно осуществлять посредством, например, ELISA с использованием рекомбинантного TfR обезьяны, который получают с использованием технологий рекомбинантной ДНК. В таком ELISA рекомбинантный TfR обезьяны добавляют в планшет, удерживают с его помощью и приводят в контакт с антителом к hTfR, и, после удаления антитела, не связанного с рекомбинантным TfR обезьяны, из планшета, измеряют количество антитела, удерживаемого планшетом. Чем выше его аффинность к рекомбинантному hTfR обезьяны, тем, следовательно, выше количество антитела, удерживаемого планшетом. Следовательно, антитело, соответствующее планшету, в котором удерживают более высокое количество антитела, можно отбирать в качестве антитела, обладающего аффинностью к TfR обезьяны. Здесь термин "обезьяна" предпочтительно относится к обезьянообразным, за исключением человека, более предпочтительно к Cercopithecidae, еще более предпочтительно к макакам и, например, к макаку-крабоеду или макаку-резусу, среди которых макак-крабоед удобен для использования в исследованиях.

Антитело, обладающее аффинностью к hTfR как человека, так и обезьяны, дает такое преимущество, что оно допускает наблюдение фармакокинетики антитела, вводимого в организм, с использованием обезьяны. Например, если разрабатывают медицинское лекарственное средство, используя такое антитело к hTfR по настоящему изобретению, прогресс его разработки можно существенно ускорить, поскольку его фармакокинетические исследования можно осуществлять с использованием обезьяны.

Антитело, обладающее относительно высокой аффинностью к hTfR и обладающее аффинностью к TfR как человека, так и обезьяны одновременно, демонстрирует константу диссоциации (K_D) с TfR обезьяны, как измеряют способом, описанным в примере 7, которая предпочтительно не превышает 5×10^{-8} М, более предпочтительно не превышает 2×10^{-8} М и еще более предпочтительно не превышает 1×10^{-8} М. Например, предпочтительно то, которое демонстрирует константу диссоциации от 1×10^{-13} до 2×10^{-8} М или от 1×10^{-13} до 2×10^{-8} М. То же самое также применимо, если антитело представляет собой одноцепочечное антитело.

Если антитело, обладающее относительно высокой аффинностью к hTfR и получаемое приведенным выше способом, в котором отбирали те клетки, которые продуцируют высокоаффинное антитело, представляет собой антитело животного, не относящегося к человеку, его можно превращать в гуманизованное антитело. Гуманизованное антитело представляет собой антитело, получаемое посредством замены надлежащей области антитела человека на аминокислотную последовательность части варибельной области (например, полностью или частично CDR) (которую пересаживают) антитела животного, не относящегося к человеку, при этом сохраняя специфичность к антигену. Примеры гуманизованных антител включают антитело, получаемое посредством замены трех определяющих комплементарность областей (CDR) в легкой цепи иммуноглобулина и трех определяющих комплементарность областей (CDR) в тяжелой цепи иммуноглобулина, обе они образуют антитело человека, с использованием CDR млекопитающего, не относящегося к человеку. Хотя нет конкретного ограничения в отношении биологического вида, от которого получают CDR, подлежащие встраиванию в антитело человека, при условии, что оно представляет собой млекопитающее, не относящееся к человеку, оно предпочтительно представляет собой мышь, крысу, кролика, лошадь и примата, не являющегося человеком, более предпочтительно мышь и крысу и еще более предпочтительно мышь.

Способы получения гуманизованного антитела хорошо известны в данной области и наиболее распространенным является способ, в котором аминокислотную последовательность определяющих комплементарность областей (CDR) в варибельной области антитела человека заменяют на CDR антитела млекопитающего, не относящегося к человеку, как разработали Winter et al. (Verhoeven M. Science. 239, 1534-1536 (1988)). Также хорошо известно, что в некоторых случаях соответствующая часть акцепторного антитела человека требует замены с использованием не только CDR антитела млекопитающего, не относящегося к человеку, но также аминокислотных последовательностей, встречающихся в областях за пределами CDR, которые играют роль или в поддержании структуры CDR или в связывании с антиге-

ном, чтобы воспроизводить активность, которой донорное антитело исходно обладает (Queen C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86. 10029-10033 (1989)). Здесь области за пределами CDR называют каркасными областями (FR).

Таким образом, получение гуманизованного антитела включает процессы пересадки CDR (и соседствующих с ними FR, в зависимости от случая) антитела млекопитающего, не относящегося к человеку, вместо CDR (и соседствующих с ними FR, в зависимости от случая) в варибельной области антитела человека. В таких процессах начальную каркасную область варибельной области антитела человека можно получать из публичной базы данных о ДНК и т.п., которая содержит гены антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии, а также аминокислотные последовательности варибельных областей тяжелой цепи и легкой цепи человека можно выбирать из базы данных о зародышевой линии человека "VBase" (доступна в интернете по адресу www.mrc-sre.cam.ac.uk/vbase). Помимо того, их можно выбирать из опубликованных последовательностей ДНК и аминокислотных последовательностей, описанных в литературе, такой как "Kabat EA. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., U.S. Department of Health and Human Services, публикация NIH № 91-3242 (1991)": "Tomlinson IM. J. fol. Biol. 227. 776-98 (1992)"; и "Cox JPL. Eur. J Immunol. 24:827-836 (1994)".

Как указано выше, в гуманизованном антителе области антитела животного млекопитающего, не относящегося к человеку, подлежащие пересадке в варибельные области исходного антитела человека, в целом включают сами CDR или CDR и соседствующую с ними часть FR. Однако такие FR, пересаженные вместе с CDR, также играют роль или в поддержании структуры CDR или в связывании с антигеном и, таким образом, обладают существенной функцией при определении комплементарности антитела, и термин "CDR" в настоящем изобретении, следовательно, относится к таким областям, которые берут или можно брать из антитела животного млекопитающего, не относящегося к человеку, и имплантируют в гуманизованное антитело, при получении гуманизованного антитела. Таким образом, область, которую обычно считают находящейся в FR-области, включена в CDR в настоящем изобретении, поскольку она участвует или в поддержании структуры CDR или в связывании с антигеном, и, таким образом, ее рассматривают как обладающую существенной функцией при определении комплементарности антигена.

Антитело к hTfR по настоящему изобретению, при введении в организм, например, посредством внутривенной инъекции, эффективно связывается с hTfR, встречающимся на клетках эндотелия капилляров в головном мозге. Антитело, связанное с hTfR, претерпевает захват в головной мозг через гематоэнцефалический барьер посредством таких механизмов, как эндоцитоз и трансцитоз. Следовательно, посредством их связывания с антителом к hTfR по настоящему изобретению, те белки, низкомолекулярные соединения и т.п., которые должны проявлять свою функцию в головном мозге, можно эффективно доставлять в головной мозг через гематоэнцефалический барьер. Кроме того, антитело к hTfR по настоящему изобретению, после прохождения через гематоэнцефалический барьер, может достигать церебральной паренхимы и нейроноподобных клеток в гиппокампе; клеток Пуркинье и т.п. мозжечка или по меньшей мере одного из них. Также ожидают, что оно достигает нейроноподобных клеток в полосатом теле большого мозга; и нейроноподобных клеток в черной субстанции среднего мозга. Следовательно, возможно заставлять одно из тех белков, низкомолекулярных соединений и т.п., которые могут действовать в таких тканях или клетках, достигать тканей или клеток посредством их связывания с антителом к hTfR по настоящему изобретению.

Антитело к hTfR по настоящему изобретению может представлять собой эффективное средство для того, чтобы обеспечивать перенос из крови в головной мозг и их функцию там для тех соединений (белков, низкомолекулярных соединений и т.п.), которые иначе не могут проходить через гематоэнцефалический барьер при внутривенном введении и, следовательно, не могут или с трудом могут проявлять свои физиологические или фармакологические функции в головном мозге. В частности, антитело к hTfR по настоящему изобретению, после прохождения через гематоэнцефалический барьер, может достигать церебральной паренхимы и нейроноподобных клеток в гиппокампе; клеток Пуркинье и т.п. в мозжечке или по меньшей мере одного из них. Также ожидают, что оно достигает нейроноподобных клеток в полосатом теле большого мозга; а также нейроноподобных клеток в черной субстанции среднего мозга. Следовательно, возможно заставлять эти соединения функционировать или усиливать их функцию в этих тканях или клетках в головном мозге посредством введения этих соединений в форме комбинации с молекулой антитела к hTfR парентерально, например, внутривенно.

Для связывания антитела к hTfR с такими соединениями (белками, низкомолекулярными соединениями и т.п.) доступен способ для того, чтобы связывать их вместе через непептидный линкер или пептидный линкер. В качестве непептидных линкеров можно использовать полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированный полиол, поливиниловый спирт, полисахариды, декстран, простой поливиниловый эфир, биоразрушаемый полимер, полимеризованный липид, хитины и гиалуроновую кислоту или их производные или их сочетания. Пептидный линкер представляет собой пептидную цепь, состоящую из от 1 до 50 аминокислот, соединенных пептидными связями или их производными, N-конец и C-конец которых подлежат образованию ковалентной связи или с антителом к hTfR или с соединением, таким как белок, низкомолекулярное соедине-

ние и т.п., соответственно, чтобы связывать антитело к hTfR с таким соединением, как белок, низкомолекулярное соединение.

В частности, конъюгат, которых формируют посредством связывания антитела к hTfR по настоящему изобретению с желаемым другим белком (А) через PEG в качестве непептидного линкера, обозначают "антитело к hTfR-PEG-белок". Антитело к hTfR-PEG-белок можно получать, сначала связывая антитело к hTfR с PEG для того, чтобы формировать антитело к hTfR-PEG, и затем связывая антитело к hTfR-PEG с другим белком (А). Альтернативно, антитело к hTfR-PEG-белок можно получать, сначала связывая другой белок (А) с PEG для того, чтобы формировать "белок-PEG", и затем связывая "белок-PEG" с антителом к hTfR. Для того чтобы связывать PEG с антителом к hTfR и другой белок (А), используют PEG, который модифицируют такими функциональными группами, как карбонат, карбонилимидазол, активный сложный эфир карбоновой кислоты, азлактон, циклический имидион, изоцианат, изотиоцианат, имидат, альдегид или тому подобное. Такие функциональные группы, вводимые в PEG, вступают в реакцию преимущественно с аминокруппами в антителе к hTfR и другом белке (А), чтобы ковалентно связывать PEG с антителом к hTfR и другой белок (А). Хотя нет конкретного ограничения в отношении молекулярной массы и конфигурации PEG, используемого здесь, его средняя молекулярная масса (MW) составляет следующее: предпочтительно MW от 500 до 60000, более предпочтительно MW от 500 до 20000. Например, такой PEG, молекулярная масса которого составляет приблизительно 300, приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 4000, приблизительно 10000, приблизительно 20000 и т.п.

Предпочтительно PEG используют в качестве непептидного линкера. Антитело к hTfR можно связывать с желаемым низкомолекулярным соединением аналогичным образом, как изложено выше.

Например, "антитело к hTfR-PEG" можно получать посредством смешивания антитела к hTfR с полиэтиленгликолем, имеющим альдегидные группы в качестве функциональных групп (ALD-PEG-ALD) с тем, чтобы молярное соотношение ALD-PEG-ALD и антитела составляло 11, 12,5, 15, 110, 120 и т.п., после чего в смесь добавляют восстанавливающее средство, такое как NaCNBH₃, чтобы позволить реакции протекать. Затем, посредством проведения реакции "антитела к hTfR-PEG" с другим белком (А) в присутствии восстанавливающего средства, такого как NaCNBH₃, получают "антитело к hTfR-PEG-белок". Напротив, также возможно получать "антитело к hTfR-PEG-белок", сначала связывая другой белок (А) с ALD-PEG-ALD для того, чтобы получать "белок-PEG" и затем связывая "белок-PEG" с антителом к hTfR.

Антитело к hTfR и другой белок (А) также можно связывать вместе через пептидные связи, соединяя тяжелую цепь или легкую цепь антитела к hTfR, на ее С-концевой стороне или N-концевой стороне, через линкерную последовательность или непосредственно, с N-концом или С-концом другого белка (А) соответственно. Таким образом, слитый белок между антителом к hTfR и другим белком (А) можно получать посредством встраивания в экспрессирующий вектор млекопитающих фрагмента ДНК, в который помещают кДНК, кодирующую другой белок (А), с совпадением рамки считывания непосредственно или через фрагмент ДНК, который кодирует линкерную последовательность, на стороне 3'-конца или 5'-конца кДНК, кодирующей тяжелую цепь или легкую цепь антитела к hTfR, и культивирования клеток млекопитающих, в которые введен вышеуказанный экспрессирующий вектор. Когда фрагмент ДНК, кодирующий другой белок (А), соединяют с тяжелой цепью, экспрессирующий вектор млекопитающих, в котором фрагмент кДНК кодирует легкую цепь антитела к hTfR, также вводят в те же клетки-хозяева, тогда как если фрагмент ДНК, который кодирует другой белок (А), соединяют с легкой цепью, экспрессирующий вектор млекопитающих, в котором фрагмент кДНК кодирует тяжелую цепь антитела к hTfR, также вводят в те же клетки-хозяева. В случае, когда антитело к hTfR представляет собой одноцепочечное антитело, слитый белок, содержащий комбинированное антитело к hTfR и другой белок (А), можно получать посредством встраивания, в экспрессирующий вектор (для эукариотических клеток, например, млекопитающих и дрожжей, или для прокариотических клеток, таких как *E.coli.*), фрагмента ДНК, который формируют, соединяя кДНК, кодирующую другой белок (А), на ее стороне 5'-конца или на стороне 3'-конца, непосредственно или через фрагмент ДНК, который кодирует линкерную последовательность, с кДНК, кодирующей одноцепочечное антитело к hTfR, и предоставления возможности экспрессии слитого белка в тех клетках, в которые введен экспрессирующий вектор.

В слитом белке того типа, в котором другой белок (А) соединяют с легкой цепью антитела к hTfR на С-концевой стороне, антитело к рецептору трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, содержащую целиком или частично вариабельную область легкой цепи, и аминокислотную последовательность, содержащую целиком или частично вариабельную область тяжелой цепи, и другой белок (А) соединяют с легкой цепью этого антитела к рецептору трансферрина человека на С-концевой стороне. Здесь легкую цепь антитела к hTfR и другой белок (А) можно соединять вместе, непосредственно или через линкер.

В слитом белке того типа, в котором другой белок (А) соединяют с тяжелой цепью антитела к hTfR на С-концевой стороне, антитело к рецептору трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, содержащую целиком или частично вариабельную область легкой цепи, и аминокислотную последовательность, содержащую целиком или частично вариабельную область тяжелой цепи, и

другой белок (А) соединяют с тяжелой цепью этого антитела к рецептору трансферрина человека на С-концевой стороне. Здесь тяжелую цепь антитела к hTfR и другой белок (А) можно соединять вместе, непосредственно или через линкер.

В слитом белке того типа, в котором другой белок (А) соединяют с легкой цепью антитела к hTfR на N-концевой стороне, антитело к рецептору трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, содержащую целиком или частично вариабельную область легкой цепи, и аминокислотную последовательность, содержащую целиком или частично вариабельную область тяжелой цепи, и другой белок (А) соединяют с легкой цепью этого антитела к рецептору трансферрина человека на N-концевой стороне. Здесь легкую цепь антитела к hTfR и другой белок (А) можно соединять вместе, непосредственно или через линкер.

В слитом белке того типа, в котором другой белок (А) соединяют с тяжелой цепью антитела к hTfR на N-концевой стороне, антитело к рецептору трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, содержащую целиком или частично вариабельную область легкой цепи, и аминокислотную последовательность, содержащую целиком или частично вариабельную область тяжелой цепи, и другой белок (А) соединяют с тяжелой цепью этого антитела к рецептору трансферрина человека на N-концевой стороне. Здесь тяжелую цепь антитела к hTfR и другой белок (А) можно соединять вместе, непосредственно или через линкер.

В приведенном выше линкерная последовательность, которую располагают между антителом к hTfR и другим белком (А), может представлять собой пептидную цепь, состоящую предпочтительно из от 1 до 50, более предпочтительно из от 1 до 17, еще более предпочтительно из от 1 до 10, даже более предпочтительно из от 1 до 5 аминокислот, и в соответствии с другим белком (А), подлежащим соединению с антителом к hTfR, число аминокислот линкерной последовательности по желанию можно корректировать до 1, 2, 3, 1-17, 1-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29, 27 и т.д. Хотя нет конкретного ограничения в отношении аминокислотной последовательности линкерной последовательности до тех пор, пока антитело к hTfR, соединенное им, сохраняет аффинность к hTfR и другой белок (А), соединенный линкерной последовательностью, также проявляет собственную физиологическую активность белка при физиологических условиях, линкер предпочтительно может состоять из глицина и серина. Примеры таких линкеров включают тот, который состоит из одной аминокислоты глицина или серина, аминокислотную последовательность Gly-Ser, аминокислотную последовательность Gly-Gly-Ser, аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотную последовательность Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательность, которая содержит 1-10 или 2-5 из каких-либо из этих аминокислотных последовательностей, соединенных последовательно. Они имеют последовательности, состоящие из 1-50, 2-17, 2-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29 или 27 аминокислот. Например, те, которые содержат аминокислотную последовательность Gly-Ser, предпочтительно можно использовать в качестве линкерных последовательностей. Кроме того, предпочтительно используют линкерную последовательность, содержащую 27 аминокислот, которая состоит из аминокислотной последовательности Gly-Ser, после которой следуют последовательно соединенные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

В слитом белке антитела к hTfR и другого белка (А), когда антитело к hTfR представляет собой одноцепочечное антитело, аминокислотную последовательность, содержащую целиком или частично вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, и аминокислотную последовательность, содержащую целиком или частично вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, соединяют обычно через линкерную последовательность. До тех пор, пока антитело к hTfR сохраняет аффинность к hTfR, аминокислотную последовательность, получаемую из легкой цепи, можно соединять, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая в свою очередь соединена, на ее С-концевой стороне, с аминокислотной последовательностью, получаемой из тяжелой цепи, или, наоборот, аминокислотную последовательность, получаемую из тяжелой цепи, можно соединять, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая в свою очередь соединена, на ее С-концевой стороне, с аминокислотной последовательностью, получаемой из легкой цепи.

Линкерная последовательность, которую помещают между легкой цепью и тяжелой цепью иммуноглобулина, представляет собой пептидную цепь, состоящую предпочтительно из 2-50, более предпочтительно из 8-50, еще более предпочтительно из 10-30, даже более предпочтительно из 12-18 или 15-25 и, например, из 15 или 25 аминокислот. Хотя нет конкретного ограничения в отношении линкерной последовательности до тех пор, пока антитело к hTfR, состоящее из обеих цепей, которые соединяют через линкер, сохраняет аффинность к hTfR, и другой белок (А), соединенный с антителом, также проявляет собственную физиологическую активность белка при физиологических условиях, линкер предпочтительно состоит из глицина или глицина и серина. Примеры таких линкеров включают аминокислотную последовательность Gly-Ser, аминокислотную последовательность Gly-Gly-Ser, аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly, аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотную последовательность Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательность, которая содержит 2-10

или 2-5 каких-либо из этих аминокислотных последовательностей, соединенных последовательно.

Предпочтительный вариант осуществления такой линкерной последовательности содержит 15 аминокислот, состоящих из последовательно соединенных трех копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

В случае, когда антитело к hTfR представляет собой одноцепочечное антитело, пример конкретных вариантов осуществления слитого белок между гуманизированным антителом к hTfR по настоящему изобретению и другим белком (А) представляет собой слитый белок, состоящий из другого белка (А), который соединяют, на его С-концевой стороне и через первую линкерную последовательность, состоящую из 27 аминокислот, которые содержат аминокислотную последовательность Gly-Ser, за которой следуют пять последовательно соединенных копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), с одноцепочечным антителом. Пример предпочтительного варианта осуществления одноцепочечных антител используемых здесь, представляет собой антитело, имеющее аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 277, которая состоит из аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела к hTfR, приведенной в SEQ ID NO: 205, которую соединяют, на ее С-конце и через первую линкерную последовательность, состоящую из 15 аминокислот, содержащих последовательно соединенные три копии аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), с вариабельной областью легкой цепи антитела к hTfR, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 191.

Когда антитело к hTfR представляет собой одноцепочечное антитело, такой слитый белок можно получать посредством, например, трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, и последующего культивирования клеток-хозяев.

Помимо того, в настоящем изобретении, когда пептидная цепь содержит множество линкерных последовательностей, каждую из этих линкерных последовательностей для удобства обозначают, с N-концевой стороны, первой линкерной последовательностью, второй линкерной последовательностью и так далее.

В случае, когда антитело к hTfR представляет собой Fab, пример конкретных вариантов осуществления слитого белка между гуманизированным антителом к hTfR и другим белком (А) по настоящему изобретению представляет собой слитый белок, который состоит из другого белка (А), который сливают, на его С-концевой стороне и через линкерную последовательность, состоящую из 27 аминокислот, содержащих Gly-Ser, за которыми следуют пять последовательно соединенных копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), с областью, имеющей вариабельную область тяжелой цепи антитела к hTfR и C_H1-область. Хотя часть шарнирной области здесь можно включать в дополнение к C_H1-области, шарнирная область не содержит остаток цистеина, который может формировать дисульфидную связь между тяжелыми цепями.

Хотя нет конкретного ограничения в отношении другого белка (А), подлежащего соединению с антителом к hTfR, он представляет собой белок, который может проявлять свою физиологическую активность в организме, и, в частности, такой белок, который должен попадать внутрь головного мозга и проявлять свою функцию там, но, из-за его фактической неспособности проходить через гематоэнцефалический барьер, нельзя ожидать, что он будет проявлять функцию в головном мозге при простом внутривенном введении. Примеры таких белков включают лизосомальные ферменты, например, фактор роста нервов (NGF), α-L-идуронидазу, идуронат-2-сульфатазу, глюкоцереброзидазу, β-галактозидазу, активаторный белок GM2, β-гексозаминидазу А, β-гексозаминидазу В, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу, α-маннозидазу, β-маннозидазу, галактозилцерамидазу, сапозин С, арилсульфатазу А, α-L-фукозидазу, аспартилглюкозаминидазу, α-N-ацетилгалактозаминидазу, кислую сфингомиелиназу, α-галактозидазу А, β-глюкуронидазу, гепаран-N-сульфатазу, α-N-ацетилглюкозаминидазу, ацетил КоА: α-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазу, N-ацетилглюкозамин-6-сульфатсульфатазу, кислую церамидазу, амило-1,6-глюкозидазу, сиалидазу, аспартилглюкозаминидазу (PPT1), трипептидилпептидазу 1, гиалуронидазу 1, CLN1 и CLN2 и т.п.

Фактор роста нервов (NGF), соединенный с антителом к hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для деменции при болезни Альцгеймера; α-L-идуронидазу, соединенную с антителом к hTfR, в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при синдроме Гурлера или синдроме Гурлера-Шейе; идуронат-2-сульфатазу, соединенную с антителом к hTfR, в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при синдроме Хантера; глюкоцереброзидазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при болезни Гоше; β-галактозидазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при GM1 ганглиозидозе типов 1-3; активаторный белок GM2 в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при GM2-ганглиозидозе, вариант АВ; β-гексозаминидазу А в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при болезни Сандгоффа и болезни Тея-Сакса; β-гексозаминидазу В в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при болезни Сандгоффа; N-ацетилглюкозамин-1-

фосфотрансферазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при болезни I-клеток; α -маннозидазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при α -маннозидозе; β -маннозидазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при β -маннозидозе; галактозилцерамидазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при болезни Краббе; сапозин С в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при болезни накопления наподобие болезни Гоше; арилсульфатазу А в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при метахроматической дегенерации белого вещества (метахроматической лейкодистрофии); α -L-фукозидазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при фукозидозе; аспартилглюкозаминидазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при аспартилглюкозаминурии; α -N-ацетилгалактозаминидазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при болезни Шиндлера и болезни Кавасаки; кислую сфингомиелиназу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при болезни Ниманна-Пика; α -галактозидазу А в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при болезни Фабри; β -глюкуронидазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при синдроме Слая; гепаран-N-сульфатазу, α -N-ацетилглюкозаминидазу, ацетил-КоА: α -глюкозаминид-N-ацетилтрансферазу и N-ацетилглюкозамин-6-сульфатсульфатазу в качестве терапевтических средств для нарушений центральной нервной системы при синдроме Санфилиппо; кислую церамидазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при болезни Фарбера; амило-1,6-глюкозидазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при болезни Кори (болезни Форбса-Кори); сиалидазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при дефиците сиалидазы; аспартилглюкозаминидазу в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при аспартилглюкозаминурии; пальмитоил-протеинтиозэстеразу 1 (PPT-1) в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при неврономальном цероид-липофусцинозе или болезни Сантавуори-Халтия; трипептидилпептидазу 1 (TRP-1) в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при неврономальном цероид-липофусцинозе или болезни Янского-Бильшовского; гиалуронидазу 1 в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при дефиците гиалуронидазы; CLN1 и CLN2 в качестве терапевтических средств для нарушений центральной нервной системы при болезни Баттена. В частности, антитело к hTfR по настоящему изобретению, после прохождения через гематоэнцефалический барьер, достигает паренхимы головного мозга и нейроноподобных клеток гиппокампа большого мозга, и клеток Пуркинье мозжечка, и ожидают, что дополнительно достигает нейроноподобных клеток полосатого тела большого мозга и нейроноподобных клеток черной субстанции среднего мозга. Следовательно, антитело к hTfR можно сливать с белками, которые должны проявлять свои функции в этих тканях или клетках, чтобы усилить фармакологические эффекты белков. Однако медицинские применения не ограничены этим.

Кроме того, примеры белков, которые могут проявлять свои фармакологические эффекты, когда соединены с антителом к hTfR, включают лизосомальные ферменты, цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF), нейротрофин-3, нейротрофин-4/5, нейротрофин-6, нейрегулин-1, эритропоэтин, дарбэпоэтин, активин, основной фактор роста фибробластов (bFGF), фактор роста фибробластов 2 (FGF2), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), интерферон α , интерферон β , интерферон γ , интерлейкин 6, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), цитокины, рецептор фактора некроза опухоли α (рецептор TNF- α), лиганды PD-1, ферменты, обладающие разрушающей β -амилоид активностью, антитело к β -амилоиду, антитело к BACE, антитело к EGFR, антитело к PD-1, антитело к PD-L1, антитело к HER2, антитело к TNF- α и другие лекарственные антитела.

Лизосомальные ферменты, соединенные с антителом к hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при лизосомальных болезнях накопления; CNTF в качестве терапевтического средства для амиотрофического бокового склероза; GDNF, нейротрофин-3 и нейротрофин-4/5 в качестве терапевтических средств для ишемии головного мозга; GDNF в качестве терапевтического средства для болезни Паркинсона; нейрегулин-1 в качестве терапевтического средства для шизофрении; эритропоэтин и дарбэпоэтин в качестве терапевтических средств для ишемии головного мозга; bFGF и FGF2 в качестве терапевтических средств для травматических нарушений центральной нервной системы; для восстановления после хирургического вмешательства в головной мозг и хирургического вмешательства в спинной мозг; ферменты, обладающие разрушающей β -амилоид активностью, антитело к β -амилоиду и антитело к BACE в качестве терапевтических средств для болезни Альцгеймера; антитело к EGFR, антитело к PD-1, антитело к PD-L1 и антитело к HER2 в качестве терапевтических средств для опухолей центральной нервной системы, включая опухоль головного мозга; и TNF α R-антитело к hTfR в качестве терапевтических средств для ишемии головного мозга и

энцефалита.

Возможные кандидаты на "другой белок (А)", подлежащий слиянию с антителом к hTfR, в целом включают терапевтические средства для таких заболеваний, как нейродегенеративные заболевания, такие как Болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и хорея Гентингтона; психические расстройства, такие как шизофрения и депрессия; рассеянный склероз; амиотрофический боковой склероз; опухоли центральной нервной системы, включая опухоль головного мозга; лизосомальные болезни накопления с сопутствующей энцефалопатией; гликогеноз; мышечная дистрофия; ишемия головного мозга; энцефалит; прионные заболевания; травматические нарушения центральной нервной системы. Кроме того, в целом терапевтическое средство для вирусных и бактериальных заболеваний центральной нервной системы также может являться кандидатом на другой белок (А), подлежащий слиянию с антителом к hTfR. Кроме того, в целом фармацевтические средства, которые можно использовать для восстановления после хирургического вмешательства в головной мозг или хирургического вмешательства в спинной мозг, также могут быть кандидатами на "другой белок (А)", подлежащий слиянию с антителом к hTfR.

В дополнение к указанным выше природным белкам (дикого типа), другой белок (А), подлежащий соединению с антителом к hTfR, также может представлять собой один из их аналогов, в котором одну или несколько аминокислот этих природных белков (дикого типа) модифицируют, например, заменяют на другие аминокислоты или удаляют, пока они полностью или частично обладают функциями соответствующих им исходных белков. При замене одной или нескольких аминокислот на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3. При удалении одной или нескольких аминокислот, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3. Комбинацию такой замены и делеции аминокислот также можно осуществлять для того, чтобы получать желаемые аналоги. Кроме того, аминокислотные последовательности, получаемые посредством добавления одной или нескольких аминокислот внутрь, на N-концевой стороне или С-концевой стороне, аминокислотной последовательности природных белков (дикого типа) или их аналогов, также включены в белки, указанные выше, до тех пор, пока они полностью или частично обладают функциями соответствующих им исходных белков. Число аминокислот, подлежащих добавлению, здесь предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3. Также возможно получать желаемые аналоги исходных белков посредством комбинирования добавления, замены и делеции аминокислот.

Помимо того, в случае, когда мутацию вводят в другой белок (А) посредством добавления одной или нескольких аминокислот на его С-конец или N-конец, если добавляемые аминокислоты располагают между белком и антителом к hTfR, когда сливают, добавляемые аминокислоты составляют часть линкера.

Природная I2S человека (hI2S) представляет собой лизосомальный фермент, состоящий из 525 аминокислот, приведенных в SEQ ID NO: 246. Конкретным примером слитых белков по настоящему изобретению между антителом к hTfR и другим белком (А) является такой тип, в котором тяжелую цепь антитела к hTfR сливают, на ее С-конце и через аминокислотную последовательность Gly-Ser в качестве линкерной последовательности, с природной I2S человека. Примеры слитых белков такого типа включают:

(1) тот, у которого легкая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 164, и тяжелая цепь, соединенная пептидной связью, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с I2S человека, образует аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 247,

(2) тот, у которого легкая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 180, и тяжелая цепь, соединенная пептидной связью, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с I2S человека, образует аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 249, и

(3) тот, у которого легкая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 196, и тяжелая цепь, соединенная пептидной связью, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с I2S человека, образует аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 251.

В настоящем изобретении, хотя термин "I2S человека" или "hI2S" относится, в частности, к hI2S, имеющей ту же аминокислотную последовательность, что и природная hI2S, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получают посредством введения мутации, такой как замена, делеция, добавление и т.п., в аминокислотную последовательность природной hI2S, до тех пор, пока они обладают активностью I2S. При замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hI2S на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hI2S, число аминокислот, подлежащих удалению, составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию из таких замены и делеции аминокислот. При добавлении одной или нескольких аминокислот в hI2S, их можно добавлять, внутрь или на N-концевую сторону или С-концевую сторону аминокислотной после-

довательности hI2S, и число аминокислот, подлежащих добавлению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2, также возможно вводить комбинированную мутацию из таких добавления, замены и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность мутированного hI2S имеет гомологию предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходной hI2S.

Утверждение о том, что hI2S обладает активностью I2S, в настоящем описании обозначает, что hI2S, слитая с антителом к hTfR, обладает активностью не ниже 3% от активности, которой в сущности обладает природная hI2S. Однако активность предпочтительно не ниже 10%, более предпочтительно не ниже 20%, еще более предпочтительно не ниже 50%, даже более предпочтительно не ниже 80% от активности, которой в сущности обладает природная hI2S. То же самое также применимо, если мутации вводят в hI2S, слитую с антителом к hTfR.

Слитый белок между антителом к hTfR и I2S человека можно получать посредством, например, трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 250, которая кодирует аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 249, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 181, которая кодирует легкую цепь антитела к hTfR, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 180, и последующего культивирования клеток-хозяев. Слитый белок, полученный таким образом, можно использовать в качестве терапевтического средства для болезни Хантера, в частности, терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы, сопутствующих болезни Хантера.

Помимо того, в случае, когда вводят мутации в антитело к hTfR или I2S человека посредством добавления одной или нескольких аминокислот к ним на их C-конец или N-конец, если добавляемые аминокислоты располагают между антителом к hTfR и I2S человека, добавляемые аминокислоты составляют часть линкера.

Хотя примеры слитых белков между антителом к hTfR и I2S человека описаны выше, нет конкретного ограничения в отношении аминокислотной последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи антитела к hTfR в предпочтительных вариантах осуществления слитого белка антитела к hTfR и I2S человека до тех пор, пока антитело имеет специфическую аффинность к hTfR. Однако антитело к hTfR по настоящему изобретению демонстрирует константу диссоциации (K_D) с hTfR, как измеряют способом, описанным в примере 7, которая предпочтительно не превышает 1×10^{-8} М, более предпочтительно не превышает 1×10^{-9} М, еще более предпочтительно не превышает 1×10^{-10} М. Например, предпочтительным является то, которое демонстрирует константу диссоциации от 1×10^{-13} до 1×10^{-9} М или от 1×10^{-13} до 1×10^{-10} М. То же самое также применимо, когда антитело представляет собой одноцепочечное антитело. Кроме того, в случае, когда антитело к hTfR по настоящему изобретению также обладает аффинностью к TfR обезьяны, константа диссоциации антитела к hTfR с TfR обезьяны, как измеряют способом, описанным в примере 7, предпочтительно не превышает 5×10^{-8} М, более предпочтительно не превышает 2×10^{-8} М, еще более предпочтительно не превышает 1×10^{-8} М. Например, предпочтительным является то, которое демонстрирует константу диссоциации от 1×10^{-13} до 2×10^{-8} М. То же самое также применимо, когда антитело представляет собой одноцепочечное антитело.

Также возможно соединять относительно короткую пептидную цепь с антителом к hTfR, аналогичным образом, как при соединении другого белка (А) с антителом к hTfR. Нет конкретного ограничения в отношении пептидной цепи, подлежащей соединению с антителом к hTfR, до тех пор, пока пептидная цепь обладает желаемой физиологической активностью. Например, существуют пептидные цепи, содержащие аминокислотную последовательность такой области различных белков, которая проявляет физиологическую активность. Хотя нет конкретного ограничения в отношении длины пептидной цепи, предпочтительно они состоят из 2-200 аминокислот, например, 5-50 аминокислот.

При соединении низкомолекулярного соединения с антителом к hTfR, нет конкретного ограничения в отношении кандидатов в низкомолекулярные соединения, но они представляют собой такое низкомолекулярное соединение, от которого хоть и требуется попадать внутрь головного мозга и функционировать там, из-за его неспособности в действительности проходить через гематоэнцефалический барьер, нельзя ожидать функционирования в головном мозге при простом внутривенном введении. Примеры таких низкомолекулярных соединений включают лекарственное средство против злокачественной опухоли, такое как циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан, бусульфан, тиотепа, нимустин, ранимустин, даркарбазин, прокарбазин, темозоломид, кармустин, стрептозоцин, бендамустин, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, надаплатин, 5-фторурацил, сульфадиазин, сульфаметоксазол, метотрексат, триметоприм, пириметамин, фторурацил, флуцитозин, азатиоприн, пентостатин, гидроксимочевина, флударабин, цитарабин, гемцитабин, иринотекан, доксорубин, эпопозид, левофлоксацин, ципрофлоксацин, винбластин, винкристин, паклитаксел, доцетаксел, митомицин С, доксорубин, эпирубицин. Дополнительные примеры низкомолекулярного соединения, подлежащего соединению с антителом к hTfR, включают миРНК,

антисмысловую ДНК и короткие пептиды.

При соединении между антителом к hTfR и низкомолекулярным соединением, или низкомолекулярное соединение можно соединять только с одной из легкой цепи и тяжелой цепи, или его можно соединять как с легкой цепью, так и с тяжелой цепью соответственно. Кроме того, до тех пор, пока оно обладает аффинностью к hTfR, антитело к hTfR может содержать аминокислотную последовательность, которая содержит полностью или частично вариабельную область легкой цепи, и/или аминокислотную последовательность, которая содержит целиком или частично вариабельную область тяжелой цепи.

Кандидаты в низкомолекулярные соединения, подлежащие слиянию с антителом к hTfR, в целом могут представлять собой терапевтические средства для заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания, такие как Болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорея Гентингтона; психические расстройства, такие как шизофрения, депрессия; рассеянный склероз; амиотрофический боковой склероз; опухоль центральной нервной системы, включая опухоль головного мозга; лизосомальные болезни накопления с сопутствующей энцефалопатией; гликогеноз; мышечная дистрофия; ишемия головного мозга; энцефалит; прионные заболевания; травматические нарушения центральной нервной системы. Кроме того, терапевтические средства для вирусных и бактериальных заболеваний центральной нервной системы также могут быть кандидатами, в целом, в низкомолекулярные соединения, подлежащие слиянию с антителом к hTfR. Кроме того, те фармацевтические средства, которые можно использовать для восстановления после хирургического вмешательства в головной мозг или хирургического вмешательства в спинной мозг, также могут быть кандидатами, в целом, в низкомолекулярные соединения, подлежащие слиянию.

Если антитело к hTfR происходит от животного, не относящегося к человеку, его введение человеку может повлечь существенный риск вызывать взаимодействие антиген-антитело, тем самым провоцируя нежелательные побочные эффекты. Превращая их в гуманизированные антитела, можно снижать антигенность антител животных, не относящихся к человеку, при введении человеку и, следовательно, можно ослаблять провокацию побочных эффектов из-за взаимодействия антиген-антитело. Кроме того, сообщалось о том, что в соответствии с экспериментами на обезьянах, гуманизированные антитела более стабильны, чем антитела мыши, в крови, и ожидают, что их терапевтический эффект, следовательно, может становиться долгосрочным соответственно. Также, используя антитело человека в качестве антитела к hTfR, можно ослаблять провокацию побочных эффектов из-за взаимодействия антиген-антитело.

Подробное объяснение приведено далее в отношении случая, когда антитело к hTfR представляет собой гуманизированное антитело или антитело человека. Среди легких цепей антитела человека существуют цепи λ и κ . Легкая цепь, образующая антитело человека, может представлять собой цепь λ и κ . Среди тяжелых цепей человека существуют цепи γ , μ , α , δ и ϵ , которые соответствуют IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. Хотя тяжелая цепь, образующая антитело к hTfR, может представлять собой какую-либо из цепей γ , μ , α , δ , и ϵ , предпочтительно представляет собой цепь γ . Кроме того, среди цепей у тяжелой цепи человека существуют цепи γ_1 , γ_2 , γ_3 и γ_4 , которые соответствуют IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 соответственно.

Когда тяжелая цепь, образующая антитело к hTfR, представляет собой цепь γ , хотя цепь γ может представлять собой любую из цепей γ_1 , γ_2 , γ_3 и γ_4 , предпочтительной является цепь γ_1 или γ_4 . В случае, когда антитело к hTfR представляет собой гуманизированное антитело или антитело человека и IgG, легкая цепь антитела человека может представлять собой цепь λ или цепь κ , и хотя тяжелая цепь антитела человека может представлять собой цепи γ_1 , γ_2 , γ_3 и γ_4 , предпочтительной является цепь γ_1 или γ_4 . Например, предпочтительный вариант осуществления антитела к hTfR включает тот, у которого легкая цепь представляет собой цепь λ и тяжелая цепь представляет собой цепь γ_1 .

В случае, когда антитело к hTfR представляет собой гуманизированное антитело или антитело человека, антитело к hTfR и другой белок (A) можно связывать вместе, соединяя антитело к hTfR, на N-конце (или C-конце) тяжелой цепи или легкой цепи, через линкерную последовательность или непосредственно, с C-концом (или N-концом), соответственно, другого белка (A) посредством пептидных связей. При соединении другого белка (A) с тяжелой цепью антитела к hTfR на ее N-концевой стороне (или C-концевой стороне), C-конец (или N-конец), соответственно, другого белка (A) соединяют с N-концом (или C-концом) цепи γ , μ , α , δ или ϵ антитела к hTfR, через линкерную последовательность или непосредственно, с помощью пептидных связей. При соединении другого белка (A) с легкой цепью антитела к hTfR на ее N-концевой стороне (или C-концевой стороне), C-конец (или N-конец), соответственно, другого белка (A) соединяют с N-концом (или C-концом) цепи λ и цепи κ антитела к hTfR, через линкерную последовательность или непосредственно, с помощью пептидных связей. Однако в случае, когда антитело к hTfR состоит из Fab-области или из Fab-области и целиком или частично шарнирной области (Fab, F(ab')₂, и F(ab')), другой белок (A) можно соединять на его C-конце (или N-конце) и через линкерную последовательность или непосредственно, с N-концом (или C-концом), соответственно, тяжелой цепи или легкой цепи, которая составляет Fab, F(ab')₂ и F(ab'), с помощью пептидных связей.

В слитом белке, получаемом посредством соединения другого белка (A) с легкой цепью антитела к hTfR, которое представляет собой гуманизированное антитело или антитело человека, на C-концевой

стороне, антитело к рецептору трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, которая содержит целиком или частично вариабельную область легкой цепи, и аминокислотную последовательность, которая содержит целиком или частично вариабельную область тяжелой цепи. Легкую цепь антитела к hTfR и другой белок (А) здесь можно соединять непосредственно или через линкер.

В слитом белке, получаемом посредством соединения другого белка (А) с тяжелой цепью антитела к hTfR, которое представляет собой гуманизированное антитело или антитело человека, на С-концевой стороне, антитело к рецептору трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, которая содержит целиком или частично вариабельную область легкой цепи, и аминокислотную последовательность, которая содержит целиком или частично вариабельную область тяжелой цепи. Тяжелую цепь антитела к hTfR и другой белок (А) здесь можно соединять непосредственно или через линкер.

В слитом белке, получаемом посредством соединения другого белка (А) с легкой цепью антитела к hTfR, которое представляет собой гуманизированное антитело или антитело человека, на N-концевой стороне, антитело к рецептору трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, которая содержит целиком или частично вариабельную область легкой цепи, и аминокислотную последовательность, которая содержит целиком или частично вариабельную область тяжелой цепи. Легкую цепь антитела к hTfR и другой белок (А) здесь можно соединять непосредственно или через линкер.

В слитом белке, получаемом посредством соединения другого белка (А) с тяжелой цепью антитела к hTfR, которое представляет собой гуманизированное антитело или антитело человека, на N-концевой стороне, антитело к рецептору трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, которая содержит целиком или частично вариабельную область легкой цепи, и аминокислотную последовательность, которая содержит целиком или частично вариабельную область тяжелой цепи. Тяжелую цепь антитела к hTfR и другой белок (А) здесь можно соединять непосредственно или через линкер.

Когда линкерную последовательность помещают между антителом к hTfR и другим белком (А), линкерная последовательность предпочтительно представляет собой пептидную цепь, состоящую из 1-50 аминокислот, хотя число аминокислот, образующих такую линкерную последовательность, можно корректировать по желанию в соответствии с другим белком (А), подлежащим соединению с антителом к hTfR, например 1-17, 1-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29 и так далее. Хотя нет конкретного ограничения в отношении конкретной аминокислотной последовательности такой линкерной последовательности, до тех пор, пока антитело к hTfR и другой белок (А), соединенные линкерной последовательностью, сохраняют соответствующие им функции (аффинность к hTfR и активность или функция при физиологических условиях), предпочтительно она состоит из глицина или серина, например, состоит из одной аминокислоты глицина или серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотной последовательности Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательности, которая содержит 1-10 или 2-5 из каких-либо из этих аминокислотных последовательностей, соединенных последовательно. Например, предпочтительно используют линкерную последовательность, которая содержит 27 аминокислот, которые состоят из аминокислотной последовательности Gly-Ser, после которой следуют последовательно соединенные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

Помимо того, когда здесь утверждают, что другой белок (А), слитый с антителом к hTfR, сохраняет свою активность или функцию при физиологических условиях, или просто он "сохраняет активность", это обозначает, что в сравнении со свойственной активностью природного другого белка (А) сохраняют не ниже 3% активности или функции. Однако такая активность или функция предпочтительно не ниже 10%, более предпочтительно не ниже 20%, еще более предпочтительно не ниже 50% и даже более предпочтительно не ниже 80% в сравнении со свойственной активностью природного другого белка (А). То же самое также применимо, когда в другой белок (А), слитый с антителом к hTfR, вводят мутации.

Дополнительным примером конкретных вариантов осуществления слитого белка между гуманизированным антителом к hTfR и другим белком (А) по настоящему изобретению является тот, который получают посредством слияния тяжелой цепи антитела к hTfR, на ее С-концевой стороне, с другим белком (А), через линкерную последовательность, состоящую из 27 аминокислот, которые состоят из аминокислотной последовательности Gly-Ser, после которой следуют последовательно соединенные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

В случае, когда антитело к hTfR представляет собой Fab, примером конкретных вариантов осуществления слитых белков между гуманизированным антителом к hTfR по настоящему изобретению и другим белком (А) является тот, который получают посредством слияния другого белка (А), на его С-концевой стороне через линкерную последовательность, с областью, образующей вариабельную область тяжелой цепи антитела к hTfR и сопутствующую ей C_H1-область, где линкерная последовательность состоит из 27 аминокислот, которые состоят из аминокислотной последовательности Gly-Ser, после которой следуют последовательно соединенные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3). Хотя здесь также допустимо, что часть шарнирной области, помимо того, также представляет собой C_H1-область, шарнирная область не содержит остаток цистеина, который будет формировать дисульфидную связь между тяжелыми цепями.

Специфическая аффинность к hTfR у антитела к hTfR преимущественно относится к аминокислотным последовательностям CDR тяжелой цепи и легкой цепи антитела к hTfR. Нет конкретного ограничения в отношении аминокислотных последовательностей этих CDR до тех пор, пока антитело к hTfR обладает специфической аффинностью к hTfR. Однако антитело к hTfR по настоящему изобретению представляет собой то, у которого константа диссоциации (K_D) с hTfR, как измеряют способом, описанным в примере 7, предпочтительно не превышает 1×10^{-8} М, более предпочтительно не превышает 1×10^{-9} М, еще более предпочтительно не превышает 1×10^{-10} М и даже более предпочтительно не превышает 1×10^{-11} М. Например, предпочтительным является то, которое обладает константой диссоциации от 1×10^{-13} до 1×10^{-9} М или от 1×10^{-13} до 1×10^{-10} М. То же самое также применимо, когда антитело представляет собой одноцепочечное антитело. Кроме того, когда антитело к hTfR по настоящему изобретению также обладает аффинностью к TfR обезьяны, у антитела к hTfR константа диссоциации с TfR обезьяны, как измеряют способом, описанным в примере 7, предпочтительно не превышает 5×10^{-8} М, более предпочтительно не превышает 2×10^{-8} М и еще более предпочтительно не превышает 1×10^{-8} М. Например, предпочтительным является то, которое демонстрирует константу диссоциации от 1×10^{-13} до 2×10^{-8} М. То же самое также применимо, если антитело представляет собой одноцепочечное антитело.

Примеры предпочтительных вариантов осуществления антитела, обладающего аффинностью к hTfR, включают те, в которых CDR легких цепей имеют аминокислотные последовательности в соответствии с одним из следующих с (1) до (14):

(1) аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7, в качестве CDR1; аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9, или аминокислотная последовательность Thr-Thr-Ser в качестве CDR2; и аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 10 в качестве CDR3;

(2) аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, в качестве CDR1; аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14, или аминокислотная последовательность Tyr-Ala-Ser в качестве CDR2; и аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 15, в качестве CDR3;

(3) аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17, в качестве CDR1; аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19, или аминокислотная последовательность Lys-Val-Ser в качестве CDR2; и аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 20, в качестве CDR3;

(4) аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22, в качестве CDR1; аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24, или аминокислотная последовательность Asp-Thr-Ser в качестве CDR2; и аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 25, в качестве CDR3;

(5) аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27, в качестве CDR1; аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29, или аминокислотная последовательность Asp-Thr-Ser в качестве CDR2; и аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 30, в качестве CDR3;

(6) аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32, в качестве CDR1; аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34, или аминокислотная последовательность Ala-Ala-Ser в качестве CDR2; и аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 35, в качестве CDR3;

(7) аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37, в качестве CDR1; аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 39, или аминокислотная последовательность Gln-Th-Ser в качестве CDR2; и аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 40, в качестве CDR3;

(8) аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 42, в качестве CDR1; аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44, или аминокислотная последовательность Gly-Thr-Ser в качестве CDR2; и аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 45, в качестве CDR3;

(9) аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 46 или SEQ ID NO: 47, в качестве CDR1; аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 49, или аминокислотная последовательность Phe-Thr-Ser в качестве CDR2; и аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 50, в качестве CDR3;

(10) аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52, в качестве CDR1; аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54, или аминокислотная последовательность Ala-Ala-Ser в качестве CDR2; и аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 55, в качестве CDR3;

(11) аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 57, в качестве CDR1; аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 59, или аминокислотная последовательность Tyr-Ala-Ser в качестве CDR2; и аминокислотная последовательность,

(10) комбинация

легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 53 в качестве CDR2; и SEQ ID NO: 55 в качестве CDR3; и

тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 128 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 130 в качестве CDR2; и SEQ ID NO: 132 в качестве CDR3;

(11) комбинация

легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 58 в качестве CDR2; и SEQ ID NO: 60 в качестве CDR3; и

тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 134 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 136 в качестве CDR2; и SEQ ID NO: 138 в качестве CDR3;

(12) комбинация

легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 63 в качестве CDR2; и SEQ ID NO: 65 в качестве CDR3; и

тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 140 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 142 в качестве CDR2; и SEQ ID NO: 144 в качестве CDR3;

(13) комбинация

легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 66 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 68 в качестве CDR2; и SEQ ID NO: 70 в качестве CDR3; и

тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 146 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 148 в качестве CDR2; и SEQ ID NO: 150 в качестве CDR3; и

(14) комбинация

легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 73 в качестве CDR2; и SEQ ID NO: 75 в качестве CDR3; и

тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 152 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 154 в качестве CDR2; и SEQ ID NO: 156 в качестве CDR3.

В качестве предпочтительных вариантов осуществления гуманизированных антител, обладающих аффинностью к hTfR, имеют место гуманизированные антитела, получаемые с использованием аминокислотных последовательностей вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи антитела мыши против TfR человека, приведенных в SEQ ID NO: 218-245, в качестве CDR. Гуманизированные антитела получают посредством замены надлежащих положений антитела человека на аминокислотные последовательности CDR вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи антитела мыши против TfR человека.

Например, легкую цепь гуманизированного антитела можно получать посредством замены аминокислотных последовательностей соответствующих CDR легкой цепи антитела человека на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 6, последовательных аминокислот в положениях с 24-го до 34-го аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 218 в качестве CDR1; на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 6, последовательных аминокислот в положениях с 50-го до 56-го в качестве CDR2; и на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 8, последовательных аминокислот в положениях с 89-го до 97-го в качестве CDR3, и тяжелую цепь гуманизированного антитела можно получать посредством замены аминокислотных последовательностей соответствующих CDR тяжелой цепи антитела человека на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3 последовательных аминокислот в положениях с 26-го до 35-го аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 219 в качестве CDR1; на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 8, последовательных аминокислот в положениях с 50-го до 66-го в качестве CDR2; на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 7, последовательных аминокислот в положениях с 97-го до 105-го в качестве CDR3.

Гуманизированное антитело можно получать, комбинируя легкую цепь и тяжелую цепь гуманизированного антитела, полученные таким образом.

Кроме того, например, легкую цепь гуманизированного антитела можно получать посредством замены аминокислотных последовательностей соответствующих CDR легкой цепи антитела человека на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 6, последовательных аминокислот в положениях с 24-го до 34-го аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 220 в качестве CDR1; на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 6, последовательных аминокислот в положениях с 50-го до 56-го в качестве CDR2; и на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3 или не меньше чем 8, последовательных аминокислот в положениях с 89-го до 97-го в качестве CDR3; и тяжелую цепь гуманизированного антитела можно получать посредством замены аминокислотных последовательностей соответствующих CDR тяжелой цепи антитела человека на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3 последовательных аминокислот в положениях с 26-го до 35-го аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 221 в качестве CDR1; на аминокислотную последовательность,

Кроме того, например, легкую цепь гуманизованного антитела можно получать посредством замены аминокислотных последовательностей соответствующих CDR легкой цепи антитела человека на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3 или не меньше чем 6, последовательных аминокислот в положениях с 24-го до 34-го аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 242 в качестве CDR1; на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 6, последовательных аминокислот в положениях с 50-го до 56-го в качестве CDR2; и на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 8, последовательных аминокислот в положениях с 89-го до 97-го в качестве CDR3; и тяжелую цепь гуманизованного антитела можно получать посредством замены аминокислотных последовательностей соответствующих CDR тяжелой цепи антитела человека на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3 последовательных аминокислот в положениях с 26-го до 35-го аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 243 в качестве CDR1; на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 8, последовательных аминокислот в положениях с 51-го до 66-го в качестве CDR2; и на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 9, последовательных аминокислот в положениях с 97-го до 107-го в качестве CDR3.

Гуманизованное антитело можно получать, комбинируя легкую цепь и тяжелую цепь гуманизованного антитела, полученные таким образом.

Кроме того, например, легкую цепь гуманизованного антитела можно получать посредством замены аминокислотных последовательностей соответствующих CDR легкой цепи антитела человека на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 5, последовательных аминокислот в положениях с 24-го до 33-го в аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 244 в качестве CDR1; на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 6, последовательных аминокислот в положениях с 49-го до 55-го в качестве CDR2; и на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 9, последовательных аминокислот в положениях с 88-го до 96-го в качестве CDR3; и тяжелую цепь гуманизованного антитела можно получать посредством замены аминокислотных последовательностей соответствующих CDR тяжелой цепи антитела человека на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3 последовательных аминокислот в положениях с 26-го до 35-го аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 245 в качестве CDR1; на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 8, последовательных аминокислот в положениях с 51-го до 66-го в качестве CDR2; и на аминокислотную последовательность, состоящую из не меньше чем 3, или не меньше чем 9, последовательных аминокислот в положениях с 97-го до 107-го в качестве CDR3.

Гуманизованное антитело можно получать, комбинируя легкую цепь и тяжелую цепь гуманизованного антитела, полученные таким образом.

Примеры предпочтительных вариантов осуществления гуманизованного антитела, обладающего аффинностью к hTfR, включают те, которые имеют аминокислотную последовательность в соответствии с одним из следующих с (1) до (3):

(1) антитело к hTfR,

в котором его переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 и SEQ ID NO: 163, и

в котором его переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170 и SEQ ID NO: 171.

(2) антитело к hTfR,

в котором его переменная область легкой цепи содержит какую-либо аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178 и SEQ ID NO: 179, и

в котором его переменная область тяжелой цепи содержит какую-либо аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186 и SEQ ID NO: 187.

(3) антитело к hTfR,

в котором его переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194 и SEQ ID NO: 195, и

в котором его переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 209.

Аминокислотные последовательности переменной области легкой цепи, приведенные в SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 и SEQ ID NO: 163, содер-

ID NO: 205, в вариабельной области тяжелой цепи,

то, которое содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 193, в вариабельной области легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 205, в вариабельной области тяжелой цепи,

то, которое содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 194, в вариабельной области легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 205, в вариабельной области тяжелой цепи, и

то, которое содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 195, в вариабельной области легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 205 в вариабельной области тяжелой цепи.

Примеры более конкретных вариантов осуществления гуманизованного антитела, обладающего аффинностью к hTfR, включают:

то, которое содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 164, в легкой цепи и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 172, в тяжелой цепи,

то, которое содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 180, в легкой цепи и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 188, в тяжелой цепи,

то, которое содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 196, в легкой цепи и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, в тяжелой цепи,

то, которое содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 198, в легкой цепи и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, в тяжелой цепи,

то, которое содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 200, в легкой цепи и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, в тяжелой цепи,

то, которое содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 202, в легкой цепи и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, в тяжелой цепи,

то, которое содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 196, в легкой цепи и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 212, в тяжелой цепи,

то, которое содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 198, в легкой цепи и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 212, в тяжелой цепи,

то, которое содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 200, в легкой цепи и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 212, в тяжелой цепи, и

то, которое содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 202, в легкой цепи и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 212, в тяжелой цепи.

Примеры предпочтительных вариантов осуществления антитела, обладающего аффинностью к hTfR, приведены выше. В легкую цепь и тяжелую цепь этих антител к hTfR можно вводить мутации по желанию, посредством замены, делеции, добавления и т.п. в аминокислотные последовательности их вариабельных областей для того, чтобы у антитела к hTfR корректировать аффинность к hTfR до подходящего уровня.

При замене одной или нескольких аминокислот в аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. При удалении одной или нескольких аминокислот из аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. Введение комбинированной мутации из таких замены и делеции аминокислот также допустимо.

При добавлении одной или нескольких аминокислот в вариабельную область легкой цепи, их можно добавлять внутрь или на N-концевой стороне или C-концевой стороне аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, и в количестве предпочтительно 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. Введение комбинированной мутации из таких добавления, замены и делеции аминокислот также допустимо. Такая мутированная аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи обладает гомологией предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходной вариабельной областью легкой цепи.

В частности, при замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности соответствующих CDR в легкой цепи на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2 и даже более предпочтительно 1. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности соответствующих CDR, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2 и даже более предпочтительно 1. Введение комбинированной мутации из таких замены и делеции аминокислот также допустимо.

При добавлении одной или нескольких аминокислот в аминокислотную последовательность соответствующих CDR в легкой цепи, их добавляют внутрь или на N-концевой стороне или C-концевой сто-

роне аминокислотной последовательности, и в количестве предпочтительно 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2. Введение комбинированной мутации из таких добавления, замены и делеции аминокислот также допустимо. Аминокислотная последовательность каждой из таких мутированных CDR обладает гомологией предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90% и еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью соответствующих исходных CDR.

При замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. Введение комбинированной мутации из таких замены и делеции аминокислот также допустимо.

При добавлении одной или нескольких аминокислот в вариабельную область тяжелой цепи, их можно добавлять внутрь или на N-концевой стороне или C-концевой стороне аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, и в количестве предпочтительно 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. Введение комбинированной мутации из таких добавления, замены и делеции аминокислот также допустимо. Такая мутированная аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи обладает гомологией предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходной вариабельной области тяжелой цепи.

В частности, при замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности соответствующих CDR в тяжелой цепи на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2 и даже более предпочтительно 1. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности соответствующих CDR число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2 и даже более предпочтительно 1. Введение комбинированной мутации из таких замены и делеции аминокислот также допустимо.

При добавлении одной или нескольких аминокислот в аминокислотную последовательность соответствующих CDR в тяжелой цепи, их добавляют внутрь или на N-концевой стороне или C-концевой стороне аминокислотной последовательности, и в количестве предпочтительно 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2 и даже более предпочтительно 1. Введение комбинированной мутации из таких добавления, замены и делеции аминокислот также допустимо. Аминокислотная последовательность каждой из таких мутированных CDR обладает гомологией предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, и еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью соответствующих исходных CDR.

В приведенном выше, примером замены одной или нескольких аминокислот в вышеуказанной аминокислотной последовательности вариабельной области антитела к hTfR на другие аминокислоты служит взаимозамена между кислыми аминокислотами, т.е. аспарагиновой кислотой и глутаминовой кислотой; взаимозамена между амидными аминокислотами, т.е. аспарагином и глутамином; взаимозамена между основными аминокислотами, т.е. лизином и аргинином, взаимозамена между разветвленными аминокислотами, т.е. валином, лейцином и изолейцином, взаимозамена между алифатическими аминокислотами, т.е. глицином и аланином, взаимозамена между гидроксиаминокислотами, т.е. сером и треонином, и взаимозамена между ароматическими аминокислотами, т.е. фенилаланином и тирозином.

Помимо того, в случае, когда вводят мутацию в антитело к hTfR посредством добавления одной или нескольких аминокислот на его C-конец или N-конец, если добавляемые аминокислоты располагают между антителом к hTfR и другим белком (A), когда их сливают, добавляемые аминокислоты составляют часть линкера.

В приведенных выше предпочтительных вариантах осуществления антитела, включая гуманизованное антитело, обладающего аффинностью к hTfR, нет конкретного ограничения в отношении аминокислотной последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи антитела к hTfR до тех пор, пока антитело обладает специфической аффинностью к hTfR. Однако антитело к hTfR по настоящему изобретению демонстрирует константу диссоциации (K_D) с hTfR, как измеряют способом, описанным в примере 7, которая предпочтительно не превышает 1×10^{-8} М, более предпочтительно не превышает 1×10^{-9} М, еще более предпочтительно не превышает 1×10^{-9} М и даже более предпочтительно не превышает 1×10^{-9} М. Например, предпочтительным является то, которое демонстрирует константу диссоциации от 1×10^{-13} М до 1×10^{-9} М или от 1×10^{-13} М до 1×10^{-10} М. То же самое применимо, когда антитело представляет собой одноцепочечное антитело. Кроме того, в случае, когда антитело к hTfR по настоящему изобретению обладает аффинностью также к TfR обезьяны, у антитела к hTfR константа диссоциации с TfR обезьяны, как измеряют способом, описанным в примере 7, предпочтительно не превышает 5×10^{-8} М, более предпочтительно не превышает 2×10^{-8} М, еще более предпочтительно не превышает 1×10^{-8} М. Например,

предпочтительным является то, которое демонстрирует константу диссоциации от 1×10^{-13} М до 2×10^{-8} М. То же самое применимо, когда антитело представляет собой одноцепочечное антитело.

Конкретные варианты осуществления вышеуказанного слитого белка между гуманизированным антителом, которое обладает аффинностью к hTfR, и другим белком (А), описанным выше, включают: те, в которых другой белок (А) представляет собой идуонат-2-сульфатазу человека (hI2S), эритропоэтин человека (hEPO), арилсульфатазу А человека (hARSA), PPT-1 человека (hPPT-1), TPP-1 человека (hTPP-1), α -L-идуронидазу человека (hIDUA), рецептор TNF α человека (hTNF α R) и гепаран-N-сульфатазу человека (hSGSH).

Конкретные примеры слитого белка, где другой белок (А) представляет собой hI2S, включают:

(1) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с hI2S, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность из первой приведена в SEQ ID NO: 247 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 164,

(2) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с hI2S, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность из первой приведена в SEQ ID NO: 249 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 180,

(3) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с hI2S, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность из первой приведена в SEQ ID NO: 251 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

В вышеприведенном (1), аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи, которая включена в SEQ ID NO: 247, представляет собой ту, которая приведена в SEQ ID NO: 172. А именно, слитый белок в соответствии с вышеприведенным (1) содержит, в качестве гуманизованного антитела, аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 164, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 172.

В вышеприведенном (2), аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи, которая включена в SEQ ID NO: 249, представляет собой ту, которая приведена в SEQ ID NO: 188. А именно, слитый белок в соответствии с вышеприведенным (2) содержит, в качестве гуманизованного антитела, аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 180, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 188.

В вышеприведенном (3), аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи, которая включена в SEQ ID NO: 251, представляет собой ту, которая приведена в SEQ ID NO: 210. А именно, слитый белок в соответствии с вышеприведенным (3) содержит, в качестве гуманизованного антитела, аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 196, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 210.

Конкретные примеры слитого белка, где другой белок (А) представляет собой эритропоэтин человека (hEPO), включают:

(1) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hEPO, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 172 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 164,

(2) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hEPO, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 188 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 180, и

(3) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hEPO, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 210 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

В любом из вышеприведенных с (1) до (3) hEPO и hTfR тяжелую цепь можно соединять посредством пептидной связи, или непосредственно или через линкерную последовательность. А именно, в любом из вышеприведенных с (1) до (3) значение фразы "через пептидную связь" и таковое фразы "непосредственно или через линкерную последовательность" являются одинаковыми. Используемая здесь линкерная последовательность состоит из 1-50 аминокислотных остатков. Хотя нет конкретного ограничения в отношении аминокислотной последовательности линкера, предпочтительно его создают из глицина и серина: например, одной аминокислоты глицина или серина, аминокислотной

последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотной последовательности Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательности, состоящей из 1-50 или 2-17, 2-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29 или 27 ами-

нокислот, которые состоят из 1-10 или 2-5 каких-либо из этих аминокислотных последовательностей, соединенных последовательно. Например, аминокислотная последовательность, которая содержит аминокислотную последовательность Gly-Ser, предпочтительно можно использовать в качестве линкерной последовательности. Кроме того, предпочтительно используют линкерную последовательность, содержащую 27 аминокислот, которая состоит из аминокислотной последовательности Gly-Ser, после которой следуют последовательно соединенные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

Более конкретные варианты осуществления гуманизованного антитела плюс hЕРО включают то, которое состоит из части, состоящей из hЕРО, соединенного, через линкерную последовательность Gly-Ser, с С-концевой стороной hTfR тяжелой цепи, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность из первой приведена в SEQ ID NO: 257 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

Помимо того, в настоящем изобретении, хотя термин "ЕРО человека" или "hЕРО" относится, в частности, к hЕРО, имеющему ту же аминокислотную последовательность, что и природный hЕРО, приведенную в SEQ ID NO: 256, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получают посредством введения мутации, такой как замена, делеция, добавление и т.п., в аминокислотную последовательность природного hЕРО, до тех пор, пока они обладают активностью ЕРО. При замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hЕРО на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hЕРО, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию из таких замены и делеции аминокислот. При добавлении одной или нескольких аминокислот в hЕРО, их можно добавлять внутрь или на N-концевой стороне или С-концевой стороне аминокислотной последовательности hЕРО, и число аминокислот, подлежащих добавлению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию из таких добавления, замены и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность каждого из таких мутированных hЕРО обладает гомологией предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходного hЕРО. Дарбэпоэтин является примером, получаемым посредством введения мутаций в природный hЕРО.

Конкретные примеры слитого белка, где другой белок (А) представляет собой арилсульфатазу А человека (hARSA), включают:

(1) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hARSA, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 172 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 164,

(2) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hARSA, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 188 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 180, и

(3) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне через пептидную связь, с hARSA, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 210 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

В любом из вышеприведенных с (1) до (3), hARSA и hTfR тяжелую цепь можно соединять посредством пептидной связи, или непосредственно или через линкерную последовательность. А именно, в любом из вышеприведенных с (1) до (3) значение фразы "через пептидную связь" и таковое фразы "непосредственно или через линкерную последовательность" являются одинаковыми. Используемая здесь линкерная последовательность состоит из 1-50 аминокислотных остатков. Хотя нет конкретного ограничения в отношении аминокислотной последовательности линкера, предпочтительно его создают из глицина и серина: например, одной аминокислоты глицина или серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотной последовательности Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательности, состоящей из 1-50 или 2-17, 2-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29 или 27 аминокислот, которые состоят из 1-10 или 2-5 каких-либо из этих аминокислотных последовательностей, соединенных последовательно. Например, аминокислотную последовательность, которая содержит аминокислотную последовательность Gly-Ser, предпочтительно можно использовать в качестве линкерной последовательности. Кроме того, предпочтительно используют линкерную последовательность, содержащую 27 аминокислот, которая состоит из аминокислотной последовательности Gly-Ser, после которой следуют последователь-

но соединенные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

Более конкретные варианты осуществления гуманизованного антитела плюс hARSA включают то, которое состоит из части, состоящей из hARSA, соединенной, через линкерную последовательность Gly-Ser, с С-концевой стороной hTfR тяжелой цепи, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность из первой приведена в SEQ ID NO: 260 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

Помимо того, в настоящем изобретении, хотя термин "ARSA человека" или "hARSA" относится, в частности, к hARSA, имеющей ту же аминокислотную последовательность, что и природная hARSA, приведенную в SEQ ID NO: 259, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получают посредством введения мутации, такой как замена, делеция, добавление и т.п., в аминокислотную последовательность природной hARSA, до тех пор, пока они обладают активностью ARSA. При замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hARSA на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hARSA, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию таких замены и делеции аминокислот. При добавлении одной или нескольких аминокислот в hARSA, их можно добавлять внутрь или на N-концевой стороне или С-концевой стороне аминокислотной последовательности hARSA, и число аминокислот, подлежащих добавлению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию из таких добавления, замены и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность каждой из таких мутированных hARSA обладает гомологией предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90% и еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходной hARSA.

Конкретные примеры слитого белка, где другой белок (A) представляет собой PPT-1 человека (hPPT-1), включают:

(1) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hPPT-1, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 172 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 164,

(2) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hPPT-1, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 188 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 180, и

(3) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hPPT-1, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 210 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

В любом из вышеприведенных с (1) до (3), hPPT-1 и hTfR тяжелую цепь можно соединять посредством пептидной связи, или непосредственно или через линкерную последовательность. А именно, в любом из вышеприведенных с (1) до (3), значение фразы "через пептидную связь" и таковое фразы "непосредственно или через линкерную последовательность" являются одинаковыми. Используемая здесь линкерная последовательность состоит из 1-50 аминокислотных остатков. Хотя нет конкретного ограничения в отношении аминокислотной последовательности линкера, предпочтительно его создают из глицина и серина: например, одной аминокислоты глицина или серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотной последовательности Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательности, состоящей из 1-50 или 2-17, 2-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29 или 27 аминокислот, которые состоят из 1-10 или 2-5 каких-либо из этих аминокислотных последовательностей, соединенных последовательно. Например, аминокислотную последовательность, которая содержит аминокислотную последовательность Gly-Ser, предпочтительно можно использовать в качестве линкерной последовательности. Кроме того, предпочтительно используют линкерную последовательность, содержащую 27 аминокислот, которая состоит из аминокислотной последовательности Gly-Ser, после которой следуют последовательно соединенные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

Более конкретные варианты осуществления гуманизованного антитела плюс hPPT-1 включают то, которое состоит из части, состоящей из hPPT-1, соединенной, через линкерную последовательность Gly-Ser, с С-концевой стороной hTfR тяжелой цепи, и другую часть, состоящую из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность из первой приведена в SEQ ID NO: 263 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

Помимо того, в настоящем изобретении, хотя термин "PPT-1 человека" или "hPPT-1" относится, в

частности, к hPPT-1, имеющей ту же аминокислотную последовательность, что и природная hPPT-1, приведенную в SEQ ID NO: 262, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получают посредством введения мутации, такой как замена, делеция, добавление и т.п., в аминокислотную последовательность природной hPPT-1, до тех пор, пока они обладают активностью PPT-1. При замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hPPT-1 на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hPPT-1, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию из таких замены и делеции аминокислот. При добавлении одной или нескольких аминокислот в hPPT-1, их можно добавлять внутрь или на N-концевой стороне или C-концевой стороне аминокислотной последовательности hPPT-1, и число аминокислот, подлежащих добавлению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию из таких добавления, замены и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность каждой из таких мутированных hPPT-1 обладает гомологией предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, и еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходной hPPT-1.

Конкретные примеры слитого белка, где другой белок (A) представляет собой PPT-1 человека (hPPT-1), включают:

(1) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее C-концевой стороне через пептидную связь, с hTPP-1, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 172 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 164,

(2) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее C-концевой стороне через пептидную связь, с hTPP-1, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 188 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 180, и

(3) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее C-концевой стороне через пептидную связь, с hTPP-1, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 210 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

В любом из вышеприведенных с (1) до (3), hTPP-1 и hTfR тяжелую цепь можно соединять посредством пептидной связи, или непосредственно или через линкерную последовательность. А именно, в любом из вышеприведенных с (1) до (3), значение фразы "через пептидную связь" и таковое фразы "непосредственно или через линкерную последовательность" являются одинаковыми. Используемая здесь линкерная последовательность состоит из 1-50 аминокислотных остатков. Хотя нет конкретного ограничения в отношении аминокислотной последовательности линкера, предпочтительно его создают из глицина и серина: например, одной аминокислоты глицина или серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотной последовательности Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательности, состоящей из 1-50 или 2-17, 2-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29 или 27 аминокислот, которые состоят из 1-10 или 2-5 каких-либо из этих аминокислотных последовательностей, соединенных последовательно. Например, аминокислотную последовательность, которая содержит аминокислотную последовательность Gly-Ser, предпочтительно можно использовать в качестве линкерной последовательности. Кроме того, предпочтительно используют линкерную последовательность, содержащую 27 аминокислот, которая состоит из аминокислотной последовательности Gly-Ser, после которой следуют последовательно соединенные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

Более конкретные варианты осуществления гуманизированного антитела плюс hTPP-1 включают то, которое состоит из части, состоящей из hTPP-1, соединенной, через линкерную последовательность Gly-Ser, с C-концевой стороной hTfR тяжелой цепи, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность из первой приведена в SEQ ID NO: 266 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

Помимо того, в настоящем изобретении, хотя термин "TPP-1 человека" или "hTPP-1" относится, в частности, к hTPP-1, имеющей ту же аминокислотную последовательность, что и природная hTPP-1, приведенную в SEQ ID NO: 265, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получают посредством введения мутации, такой как замена, делеция, добавление и т.п., в аминокислотную последовательность природной hTPP-1, до тех пор, пока они обладают активностью TPP-1. При замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hTPP-1 на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. При удалении одной или

нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hTPP-1, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию из таких замены и делеции аминокислот. При добавлении одной или нескольких аминокислот в hTPP-1, их можно добавлять внутрь или на N-концевой стороне или C-концевой стороне аминокислотной последовательности hTPP-1, и число аминокислот, подлежащих добавлению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию из таких добавления, замены и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность каждой из таких мутированных hTPP-1 обладает гомологией предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, и еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходной hTPP-1.

Конкретные примеры слитого белка, где другой белок (A) представляет собой α -L-идуронидазу человека (hIDUA), включают:

(1) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее C-концевой стороне и через пептидную связь, с hIDUA, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 172 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 164,

(2) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее C-концевой стороне и через пептидную связь, с hIDUA, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 188 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 180, и

(3) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее C-концевой стороне и через пептидную связь, с hIDUA, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 210 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

В любом из вышеприведенных с (1) до (3), hIDUA и hTfR тяжелую цепь можно соединять посредством пептидной связи, или непосредственно или через линкерную последовательность. А именно, в любом из вышеприведенных с (1) до (3), значение фразы "через пептидную связь" и таковое фразы "непосредственно или через линкерную последовательность" являются одинаковыми. Используемая здесь линкерная последовательность состоит из 1-50 аминокислотных остатков. Хотя нет конкретного ограничения в отношении аминокислотной последовательности линкера, предпочтительно его создают из глицина и серина: например, одной аминокислоты глицина или серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотной последовательности Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательности, состоящей из 1-50 или 2-17, 2-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29 или 27 аминокислот, которые состоят из 1-10 или 2-5 каких-либо из этих аминокислотных последовательностей, соединенных последовательно. Например, аминокислотную последовательность, которая содержит аминокислотную последовательность Gly-Ser, предпочтительно можно использовать в качестве линкерной последовательности. Кроме того, предпочтительно используют линкерную последовательность, содержащую 27 аминокислот, которая состоит из аминокислотной последовательности Gly-Ser, после которой следуют последовательно соединенные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

Более конкретные варианты осуществления гуманизированного антитела плюс hIDUA включают то, которое состоит из части, состоящей из hIDUA, соединенной, через линкерную последовательность Gly-Ser, с C-концевой стороной hTfR тяжелой цепи, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность из первой приведена в SEQ ID NO: 269 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

В настоящем изобретении, хотя термин "IDUA человека" или "hIDUA" относится, в частности, к hIDUA, имеющей ту же аминокислотную последовательность, что и природная hIDUA, приведенную в SEQ ID NO: 268, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получают посредством введения мутации, такой как замена, делеция, добавление и т.п., в аминокислотную последовательность природной hIDUA, до тех пор, пока они обладают активностью hIDUA. При замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hIDUA на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hIDUA, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию из таких замены и делеции аминокислот. При добавлении одной или нескольких аминокислот hIDUA, их можно добавлять внутрь или на N-концевой стороне или C-концевой стороне аминокислотной последовательности hIDUA, и число аминокислот, подлежащих добавлению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить ком-

бинированную мутацию из таких добавления, замены и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность мутированной hIDUA обладает гомологией предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходной hIDUA.

Конкретные примеры слитого белка, где другой белок (A) представляет собой рецептор TNF- α человека (hTNF α R), включают:

(1) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hTNF α R, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 172 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 164,

(2) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hTNF α R, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 188 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 180, и

(3) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hTNF α R, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 210 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

В любом из вышеприведенных с (1) до (3), hTNF α R и hTfR тяжелую цепь можно соединять посредством пептидной связи, или непосредственно или через линкерную последовательность. А именно, в любом из вышеприведенных с (1) до (3), значение фразы "через пептидную связь" и таковое фразы "непосредственно или через линкерную последовательность" являются одинаковыми. Используемая здесь линкерная последовательность состоит из 1-50 аминокислотных остатков. Хотя нет конкретного ограничения в отношении аминокислотной последовательности линкера, предпочтительно его создают из глицина и серина: например, одной аминокислоты глицина или серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотной последовательности Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательности, состоящей из 1-50 или 2-17, 2-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29 или 27 аминокислот, которые состоят из 1-10 или 2-5 каких-либо из этих аминокислотных последовательностей, соединенных последовательно. Например, аминокислотную последовательность, которая содержит аминокислотную последовательность Gly-Ser, предпочтительно можно использовать в качестве линкерной последовательности. Кроме того, предпочтительно используют линкерную последовательность, содержащую 27 аминокислот, которая состоит из аминокислотной последовательности Gly-Ser, после которой следуют последовательно соединенные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

Более конкретные варианты осуществления гуманизованного антитела плюс hTNF α R включают то, которое состоит из части, состоящей из hTNF α R, соединенного, через линкерную последовательность Gly-Ser, с С-концевой стороной hTfR тяжелой цепи, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность из первой приведена в SEQ ID NO: 272 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

Помимо того, в настоящем изобретении, хотя термин "TNF α R человека" или "hTNF α R" относится, в частности, к hTNF α R, имеющему ту же аминокислотную последовательность, что и природный hTNF α R, приведенную в SEQ ID NO: 271, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получают посредством введения мутации, такой как замена, делеция, добавление и т.п., в аминокислотную последовательность природного hTNF α R, до тех пор, пока они обладают активностью или выполняют функцию TNF α R. При замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hTNF α R на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hTNF α R, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию из таких замены и делеции аминокислот. При добавлении одной или нескольких аминокислот в hTNF α R, их можно добавлять внутрь или на N-концевой стороне или С-концевой стороне аминокислотной последовательности hTNF α R, и число аминокислот, подлежащих добавлению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию из таких добавления, замены и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность каждой из таких мутированных hTNF α R обладает гомологией предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, и еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходного hTNF α R.

Конкретные примеры слитого белка, где другой белок (А) представляет собой гепан-N-сульфатазу человека (hSGSH), включают:

(1) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hSGSH, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 172 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 164,

(2) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hSGSH, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 188 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 180, и

(3) тот, который состоит из части, состоящей из hTfR тяжелой цепи, соединенной, на ее С-концевой стороне и через пептидную связь, с hSGSH, и другой части, состоящей из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность hTfR тяжелой цепи из первой приведена в SEQ ID NO: 210 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

В любом из вышеприведенных с (1) до (3), hSGSH и hTfR тяжелую цепь можно соединять посредством пептидной связи, или непосредственно или через линкерную последовательность. А именно, в любом из вышеприведенных с (1) до (3), значение фразы "через пептидную связь" и таковое фразы "непосредственно или через линкерную последовательность" являются одинаковыми. Используемая здесь линкерная последовательность состоит из 1-50 аминокислотных остатков. Хотя нет конкретного ограничения в отношении аминокислотной последовательности линкера, предпочтительно его создают из глицина и серина: например, одной аминокислоты глицина или серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотной последовательности Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательности, состоящей из 1-50 или 2-17, 2-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29 или 27 аминокислот, которые состоят из 1-10 или 2-5 каких-либо из этих аминокислотных последовательностей, соединенных последовательно. Например, аминокислотную последовательность, которая содержит аминокислотную последовательность Gly-Ser, предпочтительно можно использовать в качестве линкерной последовательности. Кроме того, предпочтительно используют линкерную последовательность, содержащую 27 аминокислот, которая состоит из аминокислотной последовательности Gly-Ser, после которой следуют последовательно соединенные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

Более конкретные варианты осуществления гуманизированного антитела плюс hSGSH включают то, которое состоит из части, состоящей из hSGSH, соединенной, через линкерную последовательность Gly-Ser, с С-концевой стороной hTfR тяжелой цепи, и другую часть, состоящую из hTfR легкой цепи, где аминокислотная последовательность из первой приведена в SEQ ID NO: 275 и аминокислотная последовательность из последней приведена в SEQ ID NO: 196.

Помимо того, в настоящем изобретении, хотя термин "SGSH человека" или "hSGSH" относится, в частности, к hSGSH, имеющей ту же аминокислотную последовательность, что и природная hSGSH, приведенную в SEQ ID NO: 274, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получают посредством введения мутации, такой как замена, делеция, добавление и т.п., в аминокислотную последовательность природной hSGSH, до тех пор, пока они обладают активностью SGSH. При замене одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hSGSH на другие аминокислоты, число аминокислот, подлежащих замене, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. При удалении одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности hSGSH, число аминокислот, подлежащих удалению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию из таких замены и делеции аминокислот. При добавлении одной или нескольких аминокислот в hSGSH, их можно добавлять внутрь или на N-концевой стороне или С-концевой стороне аминокислотной последовательности hSGSH, и число аминокислот, подлежащих добавлению, предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, даже более предпочтительно 1-2. Также возможно вводить комбинированную мутацию из таких добавления, замены и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность каждой из таких мутированных hSGSH обладает гомологией предпочтительно не ниже 80%, более предпочтительно не ниже 90%, и еще более предпочтительно не ниже 95% с аминокислотной последовательностью исходной hSGSH.

В случае, когда другой белок (А), слитый с антителом к hTfR, представляет собой идуронат-2-сульфатазу человека (hI2S), эритропоэтин человека (hEPO), арилсульфатазу А человека (hARSA), PPT-1 человека (hPPT-1), TPP-1 человека (hTPP-1), α -L-идуридазу человека (hIDUA), рецептор TNF- α человека (hTNF α R) или гепан-N-сульфатазу человека (hSGSH), выражение другой белок (А), слитый с антителом к hTfR, сохраняет активность или функцию, которую другой белок (А) проявляется при физиологических условиях, (или просто он сохраняет активность или функцию), обозначает, что сохраняют не

меньше чем 3% активности или функции по сравнению с активностью или функцией, которые в сущности имеют соответствующие природные белки. Однако их активность или функция предпочтительно составляет не меньше чем 10%, более предпочтительно не меньше чем 20%, еще более предпочтительно не меньше чем 50% и даже более предпочтительно не меньше чем 80% по сравнению с активностью или функцией, которые в сущности имеет соответствующий природный другой белок (А). То же самое применимо, когда мутирован другой белок (А), слитый с антителом к hTfR.

Антитело к hTfR в соответствии с настоящим изобретением можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения состояния заболевания центральной нервной системы посредством связывания его с молекулой физиологически активного белка или фармакологически активного низкомолекулярного соединения. И антитело к hTfR, конъюгированное с молекулой физиологически активного белка или фармакологически активного низкомолекулярного соединения, можно использовать в способе лечения пациента с состоянием заболевания центральной нервной системы, в котором терапевтически эффективное количество физиологически активного белка или фармакологически активного низкомолекулярного соединения вводят пациенту с заболеванием центральной нервной системы парентерально (включая внутривенную инъекцию, такую как внутривенная инфузия). Антитело к hTfR, конъюгированное с молекулой физиологически активного белка или фармакологически активного низкомолекулярного соединения, после парентерального введения, может не только попадать внутрь головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессирован hTfR.

В частности, поскольку антитело к hTfR по настоящему изобретению, в виде конъюгата с идуонат-2-сульфатазой человека (hI2S), может позволять hI2S проходить через гематоэнцефалический барьер и функционировать в головном мозге, антитело можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения состояния заболевания центральной нервной системы, сопутствующего синдрому Хантера. Кроме того, антитело к hTfR, конъюгированное с hI2S, можно использовать в способе лечения пациента с состоянием заболевания при нарушении в центральной нервной системе, которое сопутствует синдрому Хантера, где терапевтически эффективное количество антитела вводят пациенту с синдромом Хантера парентерально (включая внутривенную инъекцию, такую как внутривенная инфузия). Антитело к hTfR, конъюгированное с hI2S, после парентерального введения может не только попадать внутрь головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессирован hTfR.

Кроме того, поскольку антитело к hTfR по настоящему изобретению, в виде конъюгата с эритропоэтином человека (hEPO), может позволять hEPO проходить через гематоэнцефалический барьер и функционировать в головном мозге, антитело можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения состояния заболевания центральной нервной системы, сопутствующего ишемии головного мозга. Кроме того, антитело к hTfR, конъюгированное с hEPO, можно использовать в способе лечения пациента с состоянием заболевания центральной нервной системы, сопутствующим ишемией головного мозга, где терапевтически эффективное количество конъюгированного антитела вводят пациенту с ишемией головного мозга парентерально (включая внутривенную инъекцию, такую как внутривенная инфузия). Антитело к hTfR, конъюгированное с hEPO, после парентерального введения может не только попадать внутрь головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессирован hTfR. То же самое применимо, если эритропоэтин человека заменяют на дарбэпоэтин человека.

Кроме того, поскольку антитело к hTfR по настоящему изобретению, в виде конъюгата с арилсульфатазой А человека (hARSA), может позволять hARSA проходить через гематоэнцефалический барьер и функционировать в головном мозге, антитело можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения состояния заболевания центральной нервной системы, сопутствующего метахроматической дегенерации белого вещества (метахроматической лейкодистрофии). Кроме того, антитело к hTfR, конъюгированное с hARSA, можно использовать в способе лечения пациента с состоянием заболевания центральной нервной системы, сопутствующим метахроматической дегенерации белого вещества (метахроматической лейкодистрофии), в котором терапевтически эффективное количество конъюгированного антитела вводят пациенту с заболеванием парентерально (включая внутривенную инъекцию, такую как внутривенная инфузия). Антитело к hTfR, конъюгированное с hARSA, после парентерального введения может не только попадать внутрь головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессирован hTfR.

Кроме того, поскольку антитело к hTfR по настоящему изобретению, в виде конъюгата с PPT-1 человека (hPPT-1), может позволять hPPT-1 проходить через гематоэнцефалический барьер и функционировать в головном мозге, антитело можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения состояния заболевания центральной нервной системы, сопутствующего неврональному цероид-липофусцинозу или болезни Сантавуори-Халтия. Кроме того, антитело к hTfR, конъюгированное с hPPT-1, можно использовать в способе лечения пациента с состоянием заболевания центральной нервной системы, сопутствующим неврональному цероид-липофусцинозу или болезни Сантавуори-Халтия, в котором терапевтически эффективное количество конъюгированного антитела вводят пациенту с каким-либо из этих заболеваний парентерально (включая внутривенную инъек-

цию, такую как внутривенная инфузия). Антитело к hTfR, конъюгированное с hPPT-1, после парентерального введения, может не только попадать внутрь головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессирован hTfR.

Кроме того, поскольку антитело к hTfR по настоящему изобретению, в виде конъюгата с TPP-1 человека (hTPP-1), может позволять hTPP-1 проходить через гематоэнцефалический барьер и функционировать в головном мозге, антитело можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения состояния заболевания центральной нервной системы, сопутствующего неврональному цероид-липофусцинозу или болезни Янского-Бильшовского. Кроме того, антитело к hTfR, конъюгированное с hPPT-1, можно использовать в способе лечения пациента с состоянием заболевания центральной нервной системы, сопутствующим неврональному цероид-липофусцинозу или болезни Янского-Бильшовского, в котором терапевтически эффективное количество конъюгированного антитела вводят пациенту с каким-либо из этих заболеваний парентерально (включая внутривенную инъекцию, такую как внутривенная инфузия). Антитело к hTfR, конъюгированное с hTPP-1, после парентерального введения, может не только попадать внутрь головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессирован hTfR.

Кроме того, поскольку антитело к hTfR по настоящему изобретению, в виде конъюгата с α -L-идуронидазой человека (hIDUA), может позволять hIDUA проходить через гематоэнцефалический барьер и функционировать в головном мозге, антитело можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения состояния заболевания центральной нервной системы, сопутствующего синдрому Гурлера или синдрому Гурлера-Шейе. Кроме того, антитело к hTfR, конъюгированное с hIDUA, можно использовать в способе лечения пациента с состоянием заболевания центральной нервной системы, сопутствующим синдрому Гурлера или синдрому Гурлера-Шейе, в котором терапевтически эффективное количество конъюгированного антитела вводят пациенту с каким-либо из этих заболеваний парентерально (включая внутривенную инъекцию, такую как внутривенная инфузия). Антитело к hTfR, конъюгированное с hIDUA, после парентерального введения может не только попадать внутрь головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессирован hTfR.

Кроме того, поскольку антитело к hTfR по настоящему изобретению, в виде конъюгата с рецептором TNF- α человека (hTNF α R), может позволять hTNF α R проходить через гематоэнцефалический барьер и функционировать в головном мозге, антитело можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения состояния заболевания центральной нервной системы, сопутствующего ишемии головного мозга или энцефалиту. Кроме того, антитело к hTfR, конъюгированное с hTNF α R, можно использовать в способе лечения пациента с состоянием заболевания центральной нервной системы, сопутствующим ишемии головного мозга или энцефалиту, в котором терапевтически эффективное количество конъюгированного антитела вводят пациенту с каким-либо из этих заболеваний парентерально (включая внутривенную инъекцию, такую как внутривенная инфузия). Антитело к hTfR, конъюгированное с hTNF α R, после парентерального введения может не только попадать внутрь головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессирован hTfR.

Кроме того, поскольку антитело к hTfR по настоящему изобретению, в виде конъюгата с гепаран-N-сульфатазой человека (hSGSH), может позволять hSGSH проходить через гематоэнцефалический барьер и функционировать в головном мозге, антитело можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения состояния заболевания центральной нервной системы, сопутствующего синдрому Санфилиппо. Кроме того, антитело к hTfR, конъюгированное с hSGSH, можно использовать в способе лечения пациента с состоянием заболевания центральной нервной системы, сопутствующим синдрому Санфилиппо, в котором терапевтически эффективное количество конъюгированного антитела вводят пациенту с каким-либо из этих заболеваний парентерально (включая внутривенную инъекцию, такую как внутривенная инфузия). Антитело к hTfR, конъюгированное с hSGSH, после парентерального введения может не только попадать внутрь головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессирован hTfR.

Белки, низкомолекулярное соединение и т.п., которые конъюгированы с антителом к hTfR по настоящему изобретению, можно использовать в качестве фармацевтических средств, которые проявляют свои функции в центральной нервной системе (ЦНС) после парентерального введения. Такие фармацевтические средства можно вводить пациентам в целом посредством внутривенной инъекции, такой как внутривенная инъекция, подкожная инъекция, внутримышечная инъекция и т.п., хотя нет конкретного ограничения в отношении пути их введения.

Белки, низкомолекулярные соединения и т.п., которые конъюгированы с антителом к hTfR по настоящему изобретению, можно предоставлять для медицинских учреждений в качестве фармацевтических средств в формах лиофилизированного продукта или водного препарата. В случае водного препарата, их можно предоставлять в форме препаратов, в которых одно из фармацевтических средств растворяют в растворе, предварительно содержащем стабилизатор, буфер и изотоническое средство, и которые закупоривают во флаконах или шприцах. Тип препаратов, закупоренных в шприце, в целом называют препаратом по типу предварительно заполненного шприца. Использование формы препарата по типу предва-

рительно заполненного шприц облегчает самостоятельное введение фармацевтического средства пациентом.

Когда предоставляют водный препарат, концентрация белка, низкомолекулярного соединения или тому подобного, конъюгированного с антителом к hTfR, в водном препарате составляет, например, 1-4 мг/мл, хотя она подлежит корректировке по желанию в соответствии с дозой. Когда нет конкретного ограничения в отношении стабилизаторов, подлежащих включению в водный препарат, до тех пор, пока они являются фармацевтически приемлемыми, предпочтительно можно использовать неионные поверхностно-активные средства. Примеры таких неионных поверхностно-активных средств включают полисорбат и полоксамер, любой из которых можно использовать отдельно или в комбинации. Среди полисорбатов предпочтительно используют полисорбат 20 и полисорбат 80. В качестве полоксамера особенно предпочтительным является полоксамер 188 (полиоксиэтилен (160) полиоксипропилен (30) гликоль). Кроме того, концентрация неионного поверхностно-активного средства, содержащегося в водном препарате, предпочтительно составляет 0,01-1 мг/мл, более предпочтительно 0,01-0,5 мг/мл и еще более предпочтительно 0,1-0,5 мг/мл. В качестве стабилизаторов также можно использовать аминокислоты, такие как гистидин, аргинин, метионин и глицин. Когда используют в качестве стабилизатора, концентрация аминокислоты в водном препарате предпочтительно составляет 0,1-40 мг/мл, более предпочтительно 0,2-5 мг/мл и еще более предпочтительно 0,5-4 мг/мл. Хотя нет конкретного ограничения в отношении буфера, подлежащего включению в водный препарат, до тех пор, пока он фармацевтически приемлем, фосфатный буфер является предпочтительным и более предпочтительным является натрий-фосфатный буфер. При использовании в качестве буфера, концентрация фосфата натрия предпочтительно составляет 0,01-0,04 М. pH водного препарата, корректируемый с использованием буфера, предпочтительно составляет 5,5-7,2. Хотя нет конкретного ограничения в отношении изотонического средства, подлежащего включению в водный препарат, до тех пор, пока оно фармацевтически приемлемо, в качестве изотонического средства предпочтительно можно использовать хлорид натрия или маннит отдельно или в комбинации.

Примеры

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

Пример 1. Конструкция hTfR экспрессирующего вектора.

Используя Quick Clone cDNA (Clontech Inc.) селезенки человека в качестве матрицы и праймер hTfR5' (SEQ ID NO: 214) и праймер hTfR3' (SEQ ID NO: 215), ПЦР осуществляли для того, чтобы амплифицировать фрагмент гена, кодирующий рецептор трансферрина человека (hTfR). Амплифицированный фрагмент, кодирующий hTfR, расщепляли с использованием MluI и NotI и затем вставляли между сайтами MluI и NotI в векторе pCI-neo (Promega Inc.). Вектор, полученный таким образом, обозначали pCI-neo(hTfR). Затем этот вектор расщепляли с использованием MluI и NotI, чтобы вырезать фрагмент гена, кодирующий hTfR, и этот фрагмент вставляли между сайтами MluI и NotI в pE-mIRES-GS-puro, экспрессирующем векторе, раскрытом в международной публикации WO 2012/063799, для того, чтобы конструировать hTfR экспрессирующий вектор, pE-mIRES-GS-puro(hTfR).

Пример 2. Получение рекомбинантного hTfR.

В клетки CHO-K1 вводили pE-mIRES-GS-puro(hTfR) с помощью электропорации, и затем клетки подвергали отбору в культуре в CD среде OptiCHO™ (Invitrogen Inc.), содержащей сульфоксимин метионина (MSX) и пуромидин, чтобы получать экспрессирующие рекомбинантный hTfR клетки. Экспрессирующие рекомбинантный hTfR клетки культивировали и получали рекомбинантный hTfR.

Пример 3. Иммунизация мышей рекомбинантным hTfR.

Мышей иммунизировали рекомбинантным hTfR, полученным в примере 2, в качестве антигена. Иммунизацию осуществляли посредством внутривенной или интраперитонеальной инъекции антигена мышам.

Пример 4. Получение гибридных клеток.

Приблизительно через одну неделю после последней инъекции селезенки мышей иссекали и гоменизировали для того, чтобы выделывать клетки селезенки. Клетки селезенки, полученные таким образом, сливали с клетками линии миеломных клеток мыши (P3.X63.Ag8.653) способом с полиэтиленгликолем. После слияния клеток, клетки суспендировали в среде RPMI 1640, содержащей (1X) NAT Supplement (Life Technologies Inc.) и 10% эмбриональную телячью сыворотку с ультранизким содержанием IgG (Life Technologies Inc.), и распределяли клеточную суспензию по 20-ти 96-луночным планшетам, 2 00 мкл/лунка. Затем клетки культивировали в течение 10 суток в инкубаторе с газообразным диоксидом углерода (37°C, 5% CO₂), каждую лунку исследовали под микроскопом и отбирали лунки, которые содержали отдельную колонию.

Когда клетки в каждой лунке почти достигали конfluence, культуральный супернатант собирали в качестве культурального супернатанта гибридомы и подвергали следующему процессу скрининга.

Пример 5. Скрининг клеточной линии, продуцирующей высокоаффинное антитело.

Раствор рекомбинантного hTfR (Sino Biologics Inc.) разводили с использованием 50 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 9,5-9,6) до 5 мкг/мл для того, чтобы получать раствор твердой фазы. После до-

бавления 50 мкл раствора твердой фазы в каждую лунку плоскодонного 96-луночного планшета Nunc MaxiSorp™ (подложка: полистирол производства Nunc Inc.), планшет оставляли стоять в течение 1 ч при комнатной температуре, чтобы позволять рекомбинантному hTfR прилипнуть к планшету и становиться иммобилизованным. Раствор твердой фазы выбрасывали, каждую лунку промывали три раза с использованием 250 мкл промывающего раствора (PBS, который содержит 0,05% Tween20), затем в каждую лунку добавляли 200 мкл блокирующего раствора (PBS, который содержит 1% BSA) и планшет оставляли стоять в течение 1 ч при комнатной температуре.

Блокирующий раствор выбрасывали, и каждую лунку промывали три раза с использованием 250 мкл промывающего раствора (PBS, который содержит 0,05% Tween20). В каждую лунку добавляли 50 мкл культурального супернатанта гибридомы и планшет оставляли стоять в течение 1 ч при комнатной температуре, чтобы позволять антителу мыши к hTfR, содержащемуся в культуральном супернатанте, связываться с рекомбинантным hTfR. Одновременно, в некоторые лунки добавляли 50 мкл культурального супернатанта гибридомы, которая не продуцировала антитело мыши к hTfR, в качестве контроля. Кроме того, 50 мкл среды для культуры гибридомы добавляли в лунки, в качестве лунок с имитацией, наряду с теми лунками, в которые добавляли культуральный супернатант. Измерения проводили при $n=2$. Затем раствор выбрасывали и каждую лунку промывали три раза с использованием 250 мкл промывающего раствора (PBS, который содержит 0,05% Tween20).

В каждую из вышеуказанных лунок добавляли 100 мкл раствора HRP-меченного антитела козы против иммуноглобулина мыши (Promega Inc.), и планшет оставляли стоять в течение 1 мин при комнатной температуре. Затем раствор выбрасывали и каждую лунку промывали три раза с использованием 250 мкл промывающего раствора (PBS, который содержит 0,05% Tween20). В каждую лунку добавляли 50 мкл раствора хромогенного субстрата, TMB Stabilized Substrate for Horseradish Peroxidase (Promega Inc.), и лунки оставляли стоять в течение от 10 до 20 мин при комнатной температуре. Затем, после добавления 100 мкл останавливающего раствора (2 N серная кислота), поглощение каждой лунки измеряли на считывателе планшетов при 450 нм. Из двух лунок для каждого из культурального супернатанта и контроля брали средние значения, соответственно, и из каждого из средних значений, соответствующее среднее значение для двух лунок с имитацией, которое ставили в соответствие каждому из культурального супернатанта и контроля, вычитали, получая измерение.

Четырнадцать типов гибридомных клеток, соответствующих культуральным супернатантам, добавленным в лунки, которые демонстрировали более высокие измерения, отбирали в качестве клеточных линий (клеточных линий, продуцирующих высокоаффинных антител), которые продуцируют антитела, демонстрирующие высокие аффинности к hTfR (высокоаффинное антитело к hTfR). Эти четырнадцать типов клеточных линий обозначали от линии клона 1 до линии клона 14. Кроме того, антитела к hTfR, продуцируемые от линии клона 1 до линии клона 14, обозначали как антитела к hTfR № от 1 до 14 соответственно.

Пример 6. Анализ аминокислотной последовательности варибельной области высокоаффинных антител к hTfR.

Из каждой линии клона от 1 до 14, отобранных в примере 5, получали кДНК, используя которую в качестве матрицы, амплифицировали гены, кодирующие легкие цепи и тяжелые цепи антител. Посредством трансляции нуклеотидной последовательности амплифицированных генов, соответствующие аминокислотные последовательности варибельных областей легких цепей и тяжелых цепей определяли для антител к hTfR № от 1 до 14, продуцируемых клеточными линиями.

Обнаружено, что антитело к hTfR № 1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 218 в качестве варибельной области легкой цепи, и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 219 в качестве варибельной области тяжелой цепи. Обнаружено, что варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6 или 7 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 8 или 9 в качестве CDR2 и SEQ ID NO: 10 в качестве CDR3; и варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76 или 77 в качестве CDR1, SEQ ID NO: 78 или 79 в качестве CDR2 и SEQ ID NO: 80 или 81 в качестве CDR3. Однако также полагают, что CDR не ограничены теми, которые состоят из этих аминокислотных последовательностей, но также они могут представлять собой или области аминокислотных последовательностей, которые содержат какие-либо из вышеуказанных последовательностей, или аминокислотные последовательности, состоящие из не меньше чем трех последовательных аминокислот, содержащих часть вышеуказанных последовательностей.

Обнаружено, что антитело к hTfR № 2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 220, в качестве варибельной области легкой цепи, и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 221 в качестве варибельной области тяжелой цепи. Обнаружено, что варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11 или 12 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 13 или 14 в качестве CDR2 и SEQ ID NO: 15 в качестве CDR3; и варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82 или 83 в качестве CDR1, SEQ ID NO: 84 или 85 в качестве CDR2 и SEQ ID NO: 86 или 87 в качестве CDR3. Однако также полагают, что CDR не ограничены теми, которые состоят из этих

кислот, содержащих часть вышеуказанных последовательностей.

Обнаружено, что антитело к hTfR № 13 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 242 в качестве вариательной области легкой цепи, и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 243 в качестве вариательной области тяжелой цепи. Обнаружено, что вариательная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 66 или 67 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 68 или 69 в качестве CDR2 и SEQ ID NO: 70 в качестве CDR3; и вариательная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 146 или 147 в качестве CDR1, SEQ ID NO: 148 или 149 в качестве CDR2 и SEQ ID NO: 150 или 151 в качестве CDR3. Однако также полагают, что CDR не ограничены теми, которые состоят из этих аминокислотных последовательностей, но также они могут представлять собой или области аминокислотных последовательностей, которые содержат какие-либо из вышеуказанных последовательностей, или аминокислотные последовательности, состоящие из не меньше чем трех последовательных аминокислот, содержащих часть вышеуказанных последовательностей.

Обнаружено, что антитело к hTfR № 14 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 244 в качестве вариательной области легкой цепи, и аминокислотную

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 245 в качестве вариательной области тяжелой цепи. Обнаружено, что вариательная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71 или 72 в качестве CDR1; SEQ ID NO: 73 или 74 в качестве CDR2 и SEQ ID NO: 75 в качестве CDR3; и вариательная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 152 или 153 в качестве CDR1, SEQ ID NO: 154 или 155 в качестве CDR2 и SEQ ID NO: 156 или 157 в качестве CDR3. Однако также полагают, что CDR не ограничены теми, которые состоят из этих аминокислотных последовательностей, но также они могут представлять собой или области аминокислотных последовательностей, которые содержат какие-либо из вышеуказанных последовательностей, или аминокислотные последовательности, состоящие из не меньше чем трех последовательных аминокислот, содержащих часть вышеуказанных последовательностей.

В табл. 1 сведены SEQ ID NO: № для соответствующих аминокислотных последовательностей, содержащихся в вариательных областях легких цепей и тяжелых цепей антитела к hTfR № от 1 до 14.

Таблица 1

Номера соответствующих аминокислотных последовательностей, содержащихся в вариательных областях легких и тяжелых цепей антител к hTfR № от 1 до 14

№ Антитела	Вариательная область легкой цепи	Вариательная область тяжелой цепи
1	218	219
2	220	221
3	222	223
4	224	225
5	226	227
6	228	229
7	230	231
8	232	233
9	234	235
10	236	237
11	238	239
12	240	241
13	242	243
14	244	245

В табл. 2 сведены SEQ ID NO: № соответствующих аминокислотных последовательностей, содержащихся в от CDR1 до CDR3 вариательной области легкой цепи и от CDR1 до CDR3 вариательной области тяжелой цепи антител к hTfR № от 1 до 14. Однако в табл. 2 представлены эти аминокислотные последовательности только в качестве примеров, а не ограничения аминокислотной последовательности каждой CDR тем, что приведено в табл. 2, и считают, что CDR не ограничены теми, которые состоят из этих аминокислотных последовательностей, но также они могут представлять собой или области аминокислотных последовательностей, которые содержат какие-либо из вышеуказанных последовательностей, или аминокислотные последовательности, состоящие из не меньше чем трех последовательных аминокислот, содержащих часть вышеуказанных последовательностей.

Таблица 2

Номера последовательностей соответствующих аминокислотных последовательностей, включенных в от CDR1 до CDR2 переменных областей легких цепей и тяжелых цепей антител к hTfR № от 1 до 14

№ анти-тела	Переменная область легкой цепи			Переменная область тяжелой цепи		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
1	6, 7	8, 9	10	76, 77	78, 79	80, 81
2	11, 12	13, 14	15	82, 83	84, 85	86, 87
3	16, 17	18, 19	20	88, 89	90, 91	92, 93
4	21, 22	23, 24	25	94, 95	96, 97	98, 99
5	26, 27	28, 29	30	100, 101	102, 103	104, 105
6	31, 32	33, 34	35	106, 107	108, 278	109, 110
7	36, 37	38, 29	40	111, 112	113, 114	115, 116
8	41, 42	43, 44	45	117, 118	119, 279	120, 121
9	46, 47	48, 49	50	122, 123	124, 125	126, 127
10	51, 52	53, 54	55	128, 129	130, 131	132, 133
11	56, 57	58, 59	60	134, 135	136, 137	138, 139
12	61, 62	63, 64	65	140, 141	142, 143	144, 145
13	66, 67	68, 69	70	146, 147	148, 149	150, 151
14	71, 72	73, 74	75	152, 153	154, 155	156, 157

Пример 7. Измерение у антитела к hTfR аффинности к TfR человека и обезьяны.

У антитела к hTfR аффинность к TfR человека и обезьяны измеряли на Octet RED96 (ForteBio Inc., подразделение Pall Corporation), системе для анализа взаимодействий между биологическими молекулами с использованием интерферометрии биослоя (BLI). Базовые принципы интерферометрии биослоя в кратком изложении приведены далее. Когда слой биологических молекул, иммобилизованных на поверхности наконечника датчика, облучают светом определенной длины волны, происходит отражение света от двух поверхностей, поверхности биологических молекул и поверхности внутреннего условного слоя, что дает интерференцию световых волн. Молекула, измеряемая в образце, связывается с биологической молекулой на поверхности наконечника датчика и, таким образом, увеличивает толщину слоев на наконечнике датчика, результатом чего является сдвиг между интерферирующими волнами. Посредством измерения вариации этого сдвига между интерферирующими волнами в реальном времени можно осуществлять определение числа молекул, связанных со слоем биологических молекул, иммобилизованных на поверхности наконечника датчика, и его кинетический анализ. Измерение осуществляли в целом в соответствии с руководством по эксплуатации, приложенным к Octet RED96. В качестве TfR человека использовали рекомбинантный TfR человека (rTfR человека: Sino Biologic Inc.), который имеет аминокислотную последовательность внеклеточной области hTfR, т.е. от остатка цистеина в положении 89 с N-концевой стороны до фенилаланина на C-конце, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, с гистидиновой меткой, прикрепленной к N-концу. В качестве TfR обезьяны использовали рекомбинантный TfR обезьяны (rTfR обезьяны: Sino Biologic Inc.), который имеет аминокислотную последовательность внеклеточной области TfR макака-крабоведа, т.е. от остатка цистеина в положении 89 с N-концевой стороны до фенилаланина на C-конце, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, с гистидиновой меткой, прикрепленной к N-концу.

Линии клонов 1-14, которые отбирали в примере 5, соответственно, разбавляли средой RPMI 1640, содержащей (IX) NAT Supplement (Life Technologies Inc.) и 10% эмбриональную телячью сыворотку с ультранизким содержанием IgG (Life Technologies Inc.) с тем, чтобы корректировать плотность клеток приблизительно до 2×10^5 клеток/мл. В 1 л коническую колбу добавляли 200 мл каждой клеточной суспензии и осуществляли культивирование в течение от 6 до 7 суток во влажной среде при 37°C, 5% CO₂ и 95% воздуха, при перемешивании со скоростью приблизительно 70 об/мин. Культуральный супернатант собирали посредством центрифугирования и фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) для того, чтобы получать культуральный супернатант. Культуральный супернатант, собранный таким образом, загружали на колонку с белком G (объем колонки: 1 мл, GE Healthcare Inc.), которую предварительно уравнивали с использованием трех объемов колонки буфера 20 mM Tris (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl. Затем колонку промывали с использованием 5 объемов колонки того же буфера, адсорбированное антитело элюировали с использованием 4 объемов колонки 50 mM глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 mM NaCl, и собирали элюированные фракции. Элюированные фракции корректировали до pH 7,0 посредством добавления 1 M буфера Tris (pH 8,0). Их использовали в качестве очищенных продуктов антител к hTfR № от 1 до 14 в экспериментах, которые описаны далее.

Каждое из антител (антитело к hTfR № от 1 до 14), очищенных выше, подвергали стадиям 2-кратного разведения с использованием HBS-P+ (10 mM HEPES, содержащий 150 mM NaCl, 50 мкМ

EDTA и 0,05% Surfactant P20) для того, чтобы получать растворы антител в 7 различных концентрациях, от 0,78125 до 50 нМ (от 0,117 до 7,5 мкг/мл). Эти растворы антител использовали в качестве растворов образцов. rTfR человека и обезьяны, соответственно, разводили в HBS-P+ для того, чтобы получать 25 мкг/мл растворы, которые использовали в качестве раствора rTfR человека-ECD (Histag) и раствора rTfR обезьяны-ECD (Histag) соответственно.

Каждый из растворов образцов, полученных выше, через стадии 2-кратного разведения, добавляли по 200 мкл/лунка в черный 96-луночный планшет (Greiner Bio-One Inc.). каждый из раствора rTfR человека-ECD (Histag) и растворов rTfR обезьяны-ECD (Histag), полученных выше, добавляли по 200 мкл/лунка в предварительно определенные лунки. В соответствующие лунки для базового уровня, диссоциации и промывания добавляли HBS-P+, 200 мкл/лунка. В лунки для регенерации добавляли 10 мМ глицин-HCl, pH 1,7, 200 мкл/лунка. В лунки для активации добавляли 0,5 мМ раствор NiCl₂, 200 мкл/лунка. Планшет и биосенсор (Biosensor/Ni-NTA: ForteBio Inc., подразделение Pall Corporation) устанавливали в предписанные положения в Octet RED96.

Octet RED96 запускали при условиях, приведенных далее в табл. 3, чтобы собирать данные, по которым затем, используя аналитическое программное обеспечение, прилагаемое к Octet RED96, и аппроксимируя кривую реакции связывания к модели связывания 1:1 или модели связывания 2:1, у антитела к hTfR измеряли константу скорости ассоциации (k_{on}) и константу скорости диссоциации (k_{off}) с rTfR человека и rTfR обезьяны и вычисляли константу диссоциации (K_D). Измерение осуществляли при 25-30°C.

Таблица 3

Рабочие условия для Octet RED96

	Стадия	Время контакта (с)	Скорость (об./мин)	Порог
1	Базов. ур. 1	60	1000	-
2	Загрузка	600	1000	1.5-2.0
3	Базов. ур. 2	60	1000	
4	Ассоциация	180	1000	
5	Диссоциация	540	1000	
6	Регенерация	5	1000	
7	Промывание	5	1000	
Стадии 6-7 повторяли 6-7 раз				
8	Активация	60	1000	-
Стадии 1-8 повторяли, пока не измерили все образцы				

В табл. 4 представлены результаты измерения константы скорости ассоциации (k_{on}), константы скорости диссоциации (k_{off}) антитела к hTfR № от 1 до 14 (соответствующего антителу № от 1 до 14 в таблице) и константы диссоциации (K_D) с TfR человека.

Таблица 4

Аффинность к hTfR человека у антител к hTfR

№ антитела	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (с ⁻¹)	K_D (M)
1	5.00×10^5	2.55×10^{-6}	5.09×10^{-12}
2	1.11×10^6	1.23×10^{-5}	1.12×10^{-11}
3	6.53×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
4	1.91×10^6	2.29×10^{-4}	1.20×10^{-10}
5	6.71×10^5	2.44×10^{-5}	3.64×10^{-11}
6	7.54×10^5	7.23×10^{-4}	9.58×10^{-10}
7	3.69×10^5	3.03×10^{-5}	8.22×10^{-11}
8	6.96×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
9	7.82×10^5	9.46×10^{-5}	1.21×10^{-10}
10	6.79×10^5	7.66×10^{-4}	1.13×10^{-9}
11	2.72×10^5	2.28×10^{-5}	8.37×10^{-11}
12	7.54×10^5	7.23×10^{-4}	4.32×10^{-10}
13	8.35×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
14	9.61×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$

В табл. 5 представлены результаты измерения константы скорости ассоциации (k_{on}), константы скорости диссоциации (k_{off}) антитела к hTfR № от 1 до 14 (соответствующего антителу № от 1 до 14 в таблице) и константы диссоциации (K_D) с TfR обезьяны.

Таблица 5

Аффинность к hTfR обезьяны у антител к hTfR

№ антитела	$k_{on} (M^{-1}c^{-1})$	$k_{off} (c^{-1})$	$K_D (M)$
1	2.80×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
2	4.18×10^5	1.75×10^{-6}	4.18×10^{-11}
3	3.89×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
4	7.54×10^5	1.21×10^{-4}	1.61×10^{-10}
5	5.19×10^5	7.58×10^{-4}	1.46×10^{-9}
6	4.95×10^5	2.36×10^{-4}	1.23×10^{-10}
7	2.66×10^5	4.54×10^{-6}	1.71×10^{-11}
8	5.52×10^5	5.07×10^{-3}	9.18×10^{-9}
9	6.99×10^5	1.47×10^{-4}	2.10×10^{-9}
10	3.87×10^5	1.22×10^{-2}	3.16×10^{-8}
11	1.24×10^5	4.21×10^{-4}	3.38×10^{-9}
12	5.05×10^5	1.26×10^{-4}	2.49×10^{-10}
13	5.91×10^5	7.29×10^{-5}	1.23×10^{-10}
14	7.00×10^5	3.61×10^{-5}	5.16×10^{-11}

В результате измерения у этих антител к hTfR аффинности к TfR человека, константа диссоциации с TfR человека не превышала 1×10^{-8} М для всех антител; и для 13 антител, за исключением антитела № 10, константа диссоциации с TfR человека не превышала 1×10^{-9} М; и для антител № 3, 8, 13 и 14, в частности, константа диссоциации не превышала 1×10^{-12} М (табл. 4). Результат демонстрирует, что все 14 антител представляют собой антитела, имеющие высокоаффинное антитело к TfR человека. Кроме того, судя по результату измерения у антител к hTfR аффинности к TfR обезьяны, константа диссоциации с TfR обезьяны не превышала 5×10^{-8} М для всех антител и, в частности, для антител № 1 и 3 константа диссоциации с TfR обезьяны не превышала 1×10^{-12} М (табл. 5). Результат показывает, что все 14 антител представляют собой антитела, имеющие высокоаффинное антитело не только к TfR человека, но также к TfR обезьяны.

Пример 7-2. Оценка переноса антител к hTfR в головной мозг с использованием мышей.

Затем для 13 антител, антител к hTfR № от 1 до 9 и от 11 до 14, осуществляли оценку их переноса в головной мозг через BBB с использованием мышей с нокином hTfR (hTfR-KI мышей), у которых ген, кодирующий внеклеточную область рецептора трансферрина мыши заменяли на ген, кодирующий внеклеточную область рецептора трансферрина человека. В целом, hTfR-KI мышей получали способом, описанным далее. Помимо того, очищенные антитела из примера 7 использовали в качестве антител к hTfR.

Химически синтезировали фрагмент ДНК, имеющий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 253, в котором ген устойчивости к неомицину, фланкированный последовательностями loxP, помещали на 3'-стороне кДНК, кодирующей химерный hTfR, у которого внутриклеточная область состояла из аминокислотной последовательности TfR мыши и внеклеточная область состояла из аминокислотной последовательности hTfR человека. Этот фрагмент ДНК вставляли стандартным способом в направленный вектор, имеющий в качестве последовательности 5'-плеча нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 254, и в качестве последовательности 3'-плеча нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 255, и конструкцию вводили в ES клетки мыши с помощью электропорации. ES клетки мыши, в которые вводили ген, подвергали отбору в культуре в среде в присутствии неомицина для того, чтобы отбирать те ES клетки мыши, в которых направленный вектор встроен в хромосому через гомологичную рекомбинацию. Рекомбинантные ES клетки мыши, полученные таким образом, инъецировали в эмбрионы на стадии 8-клеток (эмбрионы-хозяева) ICR мышей, и эмбрионы, полученные таким образом, имплантировали псевдобеременным мышам (мышам-реципиентам), которых получали через скрещивание с мышами, прошедшими наложение вазолигатуры. Полученных потомков (химерных мышей) проверяли по их цвету шерсти, и отбирали тех мышей, которые имели более высокую долю белой шерсти в их общем волосяном покрове, т.е. тех мышей, у которых ES клетки вносили более выраженный вклад в развитие индивидуальных организмов. Каждую из этих химерных мышей скрещивали с ICR мышами для того, чтобы создавать мышей F1. Отбирали мышей F1 с белой шерстью, анализировали ДНК, которую экстрагировали из тканей их хвостов, и тех мышей, у которых ген рецептора трансферрина мыши в их хромосомах заменяли на химерный hTfR, рассматривали в качестве hTfR-KI мышей.

Осуществляли флуоресцентное мечение вышеуказанных 13 антител к hTfR с использованием флуоресцеинизотиоцианата (FITC), используя Fluorescein Labeling Kit-NH₂ (Dojindo Laboratories) в соответст-

вии с прилагаемым руководством. Получали PBS растворы, каждый из которых содержал одно из 13 антител к hTfR с флуоресцентной меткой FITC. Каждый из этих PBS растворов антител внутривенно инъецировали hTfR-KI мыши (самец в возрасте от 10 до 12 недель), при дозе антитела к hTfR 3 мг/кг. В качестве контроля PBS раствор, содержащий мышье IgG1 (Sigma Inc.) с флуоресцентной меткой FITC, аналогичным образом, как и выше, внутривенно инъецировали hTfR-KI мыши (самец в возрасте от 10 до 12 недель), при дозе 3 мг/кг. Приблизительно через 8 ч после внутривенной инъекции весь организм орошали физиологическим раствором и получали головной мозг (часть, содержащую большой мозг и мозжечок). Головной мозг, иссеченный таким образом, взвешивали (влажная масса) и затем ткани головного мозга гомогенизировали с использованием T-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.), содержащим Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Inc.). Гомогенат центрифугировали, собирали супернатант и измеряли количество антитела с флуоресцентной меткой FITC, содержащегося в супернатанте, следующим образом. Сначала 10 мкл anti-FITC Antibody (Bethyl Inc.) добавляли в каждую лунку High Bind Plate (Meso Scale Diagnostics Inc.) и оставляли стоять в течение 1 ч с тем, чтобы иммобилизовать его на планшете. Затем планшет блокировали посредством добавления 150 мкл блокирующего буфера SuperBlock в PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) в каждую лунку и встряхивания планшета в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл супернатанта гомогената ткани головного мозга и планшет встряхивали в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл SULFO-TAG Anti-Mouse Antibody (Goat) (Meso Scale Diagnostics Inc.) и встряхивание продолжали в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли 150 мкл Read Buffer T (Meso Scale Diagnostics Inc.) и считывали количество люминесценции в каждой лунке на считывателе Sector™ Imager 6000. Вычисляли количество антитела, содержащегося в одном грамме головного мозга (влажная масса), (концентрацию антитела к hTfR в тканях головного мозга) посредством получения калибровочной кривой на основании измерений стандартных образцов, содержащих известные концентрации антитела к hTfR с флуоресцентной меткой FITC, и последующей интерполяции измерений для каждого из образцов с привязкой к стандарту. Результаты представлены в табл. 5-2.

Концентрация любого из антител, обозначаемых как антитела к hTfR № от 1 до 9 и от 11 до 14, в тканях головного мозга в 25 раз превышала таковую для контроля. Концентрация антител к hTfR № 5 и 6 в 100 раз превышала таковую для контроля, где, в частности, значение для антитела к hTfR № 6 приблизительно в 160 раз превышало таковую для контроля. Результаты указывают на активное прохождение через BBB и перенос антител, обозначаемых как антитела к hTfR № от 1 до 9 и от 11 до 14, в головной мозг.

Таблица 5-2

Концентрация антител к hTfR в тканях головного мозга

№ антитела	Ткани головного мозга (мкг/г влажной массы)	Относительное значение к контролю
Контроль	0.003	1
1	0.141	47.0
2	0.126	42.0
3	0.0833	27.8
4	0.221	73.7
5	0.335	112
6	0.492	164
7	0.0855	28.5
8	0.133	44.3
9	0.112	37.3
11	0.103	34.3
12	0.215	71.7
13	0.127	42.3
14	0.213	71.0

Пример 8. Фармакокинетический анализ антител к hTfR у обезьян.

Каждое из антител к hTfR № от 1 до 3 внутривенно вводили один раз самцам макаков-крабоедов в дозе 5,0 мг/кг, и через 8 ч после введения осуществляли орошение всего организма физиологическим раствором. В качестве отрицательного контроля, обезьяну, которая не получала антитело к hTfR, подвергали орошению всего организма аналогичным образом. После орошения иссекали ткани головного мозга, содержащие продолговатый мозг. Используя ткани головного мозга, измеряли концентрацию антитела к hTfR и осуществляли иммуногистохимическое окрашивание. Помимо того, используемые антитела к hTfR представляли собой продукты очистки того, что описано в примере 7.

Измерение концентрации антител к hTfR в тканях головного мозга осуществляли, главным образом, придерживаясь процедуры, описанной далее. Собранные ткани головного мозга делили на большой мозг,

мозжечок, гиппокамп и продолговатый мозг, и их, соответственно, гомогенизировали с использованием RIPA Buffer (Wako Pure Chemical Industries Inc.), содержащего Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Inc.), и центрифугировали для того, чтобы собирать супернатант. Добавляли Affinipure Goat Anti mouse IgG Fc γ pAb (Jackson ImmunoResearch Inc.), по 10 мкл каждого, в лунки High Bind Plate (Meso Scale Diagnostics Inc.), и планшет оставляли стоять в течение 1 ч для того, чтобы иммобилизовать антитело. Затем планшет блокировали посредством добавления 150 мкл блокирующего буфера SuperBlock в PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) в каждую лунку и встряхивали в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл супернатанта гомогената ткани головного мозга и планшет встряхивали в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл Affinipure Goat Anti mouse IgG Fab-Biotin (Jackson ImmunoResearch Inc.) и встряхивание продолжали в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл SULFO-Tag-Streptavidin (Meso Scale Diagnostics Inc.) и встряхивание продолжали в течение получаса. В каждую лунку добавляли 150 мкл Read Buffer T (Meso Scale Diagnostics Inc.) и считывали количество люминесценции в каждой лунке на считывателе Sector™ Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics). Вычисляли количество антитела, содержащегося в одном грамме головного мозга (влажная масса), (концентрацию антитела к hTfR в тканях головного мозга) посредством получения калибровочной кривой на основании измерений стандартных образцов, содержащих известные концентрации антитела к hTfR, и последующей интерполяции измерений каждого из образцов с привязкой к стандарту.

Результат измерения концентрации антител к hTfR в тканях головного мозга представлен в табл. 6. Хотя наблюдали накопление любого из антител к hTfR № от 1 до 3 в большом мозге, мозжечке, гиппокампе и продолговатом мозге, где их количества находились в следующем соотношении антитело к hTfR № 1 < антитело к hTfR № 3 < антитело к hTfR № 2, отражающем наименьшее для антитела к hTfR № 1 и наивысшее для антитела к hTfR № 2. В сравнении с антителом к hTfR № 1, накопление антитела к hTfR № 2 приблизительно в 4,3 раза выше в большом мозге, приблизительно в 6,6 раза выше в мозжечке, приблизительно в 4,6 раза выше в гиппокампе и приблизительно в 2 раза выше в продолговатом мозге. Эти результаты демонстрируют, что эти 3 антитела обладали свойством проходить через гематоэнцефалический барьер и накапливаться в тканях головного мозга, а также показывают, что посредством связывания этих антител с фармацевтическим средством, которое должно действовать в тканях головного мозга, возможно позволять этим фармацевтическим средствам эффективно накапливаться в тканях головного мозга.

Таблица 6
Концентрация антител к hTfR в тканях головного мозга (мкг/г влажной массы)

№ антитела	Большой мозг	Мозжечок	Гиппокамп	Продолговатый мозг
1	0.18	0.15	0.12	0.22
2	0.78	0.99	0.56	0.43
3	0.82	0.6	0.33	0.31

Иммуногистохимическое окрашивание антител к hTfR в этих тканях головного мозга осуществляли, в целом, придерживаясь процедур, описанных далее. Собранные ткани быстро замораживали при -80°C в Tissue-Tek Cryo 3DM (Sakura Finetek Inc.) для того, чтобы получать замороженные блоки тканей. Замороженные блоки нарезали на 4 мкм срезы, которые накладывали на покрытые MAS предметные стекла (Matsunami Glass Inc.). Проводили реакции тканевых срезов с 4% параформальдегидом (Wako Pure Chemical Industries Inc.) в течение 5 мин при 4°C и фиксировали их на предметных стеклах. Затем проводили реакции тканевых срезов с метаноловым раствором, содержащим 0,3% пероксида водорода (Wako Pure Chemical Industries Inc.), в течение 30 мин для того, чтобы инактивировать собственные пероксидазы. Затем предметные стекла блокировали посредством проведения реакции с блокирующим буфером SuperBlock в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем проводили реакции тканевых срезов с Mouse IgG-heavy and light chain Antibody (Bethyl Laboratories Inc.) в течение 1 ч при комнатной температуре. Тканевые срезы оставляли для развития окраски с использованием субстрата DAB (3,3'-диаминобензидин, Vector Laboratories Inc.), осуществляли контрастное окрашивание раствором гематоксилина Мейера (Merck Inc.), дегидратировали, осветляли, заливали и наблюдали под микроскопом.

На фиг. 1 представлен результат иммуногистохимического окрашивания антител к hTfR в коре головного мозга. В коре головного мозга обезьян, которым вводили антитела к hTfR № от 1 до 3, наблюдали специфическое окрашивание кровеносных сосудов (фиг. от 1b-d соответственно). В частности, в коре головного мозга обезьян, которым вводили антитела к hTfR № 2 или 3, также наблюдали обширное специфическое окрашивание паренхимы области головного мозга снаружи кровеносных сосудов (фиг. 1c и 1d соответственно). Помимо того, окрашивание не наблюдали в коре головного мозга контрольной обезьяны, которой не вводили антитело к hTfR, что указывает на почти полное отсутствие фонового окрашивания (фиг. 1a).

На фиг. 2 представлен результат иммуногистохимического окрашивания антител к hTfR в гиппокампе. В большом мозге обезьян, которым вводили антитела к hTfR № от 1 до 3, наблюдали специфиче-

ское окрашивание кровеносных сосудов (фиг. 2b-d соответственно). В частности, в гиппокампе обезьян, которым вводили антитела к hTfR № 2 или 3, также наблюдали специфическое окрашивание нейроноподобных клеток (фиг. 2c и 2d соответственно), а также наблюдали специфическое и обширное окрашивание области паренхимы головного мозга вне кровеносных сосудов. Помимо того, окрашивание не наблюдали в гиппокампе контрольной обезьяны, которой не вводили антитело к hTfR, что указывает на почти полное отсутствие фонового окрашивания (фиг. 2a).

На фиг. 3 представлен результат иммуногистохимического окрашивания антител к hTfR в мозжечке. В мозжечке обезьян, которым вводили антитела к hTfR № от 1 до 3, наблюдали специфическое окрашивание кровеносных сосудов (фиг. 3b-d соответственно). В частности, в мозжечке обезьян, которым вводили антитела к hTfR № 2 или 3, также наблюдали специфическое окрашивание клеток Пуркинье (фиг. 3c и 3d соответственно). Помимо того, окрашивание не наблюдали в мозжечке контроля, которому не вводили антитело к hTfR, что указывает на почти полное отсутствие фонового окрашивания (фиг. 3a).

Из приведенных выше результатов иммуногистохимического окрашивания в большом мозге, гиппокампе и мозжечке сочли, что хотя антитело к hTfR № 1 может связываться с hTfR, встречающимся на эндотелии кровеносных сосудов головного мозга, относительно небольшое его количество переносится в паренхиму головного мозга по сравнению с антителами к hTfR № 2 и 3. Одновременно обнаружено, что антитела к hTfR № 2 и 3 могут связываться с hTfR, встречающимся на эндотелии кровеносных сосудов головного мозга, и после связывания с hTfR они проходят через гематоэнцефалический барьер и переносятся в паренхиму головного мозга и далее из паренхимы головного мозга в нейроноподобные клетки в гиппокампе и их захватывают клетки Пуркинье в мозжечке.

Пример 9. Получение гуманизованных антител к hTfR.

Пытались гуманизовать аминокислотную последовательность, содержащуюся в переменных областях легких цепей и тяжелых цепей антител к hTfR № от 1 до 3, которые представлены в табл. 1. Из антитела к hTfR № 1 получали гуманизованную переменную область легкой цепи, которая имеет одну из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: № 158-163, и гуманизованную переменную область тяжелой цепи, которая имеет одну из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: № 166-171.

Из антитела к hTfR № 2 получали гуманизованную переменную область легкой цепи, которая имеет одну из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: № 174-179, и гуманизованную переменную область тяжелой цепи, которая имеет одну из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: № 182-187.

Из антитела к hTfR № 3 получали гуманизованную переменную область легкой цепи, которая имеет одну из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: № 190-195, и гуманизованную переменную область тяжелой цепи, которая имеет одну из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: № 204-209.

Пример 10. Конструирование генов, кодирующих гуманизованные антитела к hTfR.

Для каждого из приведенных выше антител к hTfR № от 1 до 3 искусственно синтезировали фрагменты ДНК, которые содержали ген, кодирующий полноразмерную легкую цепь и тяжелую цепь, которые имеют переменные области легкой цепи и тяжелой цепи гуманизованного антитела к hTfR соответственно. Выполняя это, добавляли последовательности MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, в этом порядке от 5'-конца, на 5'-стороне гена, кодирующего полноразмерную легкую цепь, и на 3'-стороне добавляли последовательность NotI. И добавляли последовательности MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, в этом порядке от 5'-конца, на 5'-стороне гена, кодирующего полноразмерную тяжелую цепь, и на 3'-стороне добавляли последовательность NotI. Лидерный пептид, введенный выше, выполняет функцию сигнала секреции, когда легкую цепь и тяжелую цепь гуманизованного антитела экспрессируют в клетках млекопитающих в качестве клеток-хозяев с тем, чтобы секретировать легкую цепь и тяжелую цепь из клеток.

Для легкой цепи антитела к hTfR № 1 синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 165), который содержит ген, кодирующий полноразмерную легкую цепь (легкую цепь гуманизованного антитела к hTfR № 1), состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 164, которая имеет в переменной области аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 163.

Для тяжелой цепи антитела к hTfR № 1 синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 173), который содержит ген, кодирующий полноразмерную тяжелую цепь (тяжелую цепь гуманизованного антитела к hTfR № 1), состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 172, которая имеет в переменной области аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 171.

Тяжелая цепь гуманизованного антитела к hTfR, кодируемая фрагментом ДНК, приведенным в SEQ ID NO: 173, представляет собой IgG1.

Для легкой цепи антитела к hTfR № 2 синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 181), который содержит ген, кодирующий полноразмерную легкую цепь (легкую цепь гуманизованного антитела к hTfR № 2), состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 180, которая имеет в переменной области аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 179.

Для тяжелой цепи антитела к hTfR № 2 синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 189), который содержит ген, кодирующий полноразмерную тяжелую цепь (тяжелую цепь гуманизированного антитела к hTfR № 2), состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 188, которая имеет в варибельной области аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 187.

Тяжелая цепь гуманизированного антитела к hTfR, кодируемая фрагментом ДНК, приведенным в SEQ ID NO: 189, представляет собой IgG1.

Для легкой цепи антитела к hTfR № 3 синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 197), который содержит ген, кодирующий полноразмерную легкую цепь (легкую цепь гуманизированного антитела к hTfR № 3), состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 196, которая имеет в варибельной области аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 191.

Для тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 211), который содержит ген, кодирующий полноразмерную тяжелую цепь (тяжелую цепь гуманизированного антитела к hTfR № 3), состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 210, которая имеет в варибельной области аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 205.

Тяжелая цепь гуманизированного антитела к hTfR, кодируемая фрагментом ДНК, приведенным в SEQ ID NO: 211, представляет собой IgG1.

Что касается легкой цепи антитела к hTfR № 3, также синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 199), кодирующий полноразмерную аминокислотную последовательность легкой цепи (легкой цепи гуманизированного антитела к hTfR № 3-2), состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 198, которая имеет в варибельной области аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 193;

фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 201), кодирующий полноразмерную аминокислотную последовательность легкой цепи (легкой цепи гуманизированного антитела к hTfR № 3-3), состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 200, которая имеет в варибельной области аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 194;

фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 203), кодирующий полноразмерную аминокислотную последовательность легкой цепи (легкой цепи гуманизированного антитела к hTfR № 3-4), состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 202, которая имеет в варибельной области аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 195;

Кроме того, для тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 также синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 213), кодирующий полноразмерную аминокислотную последовательность тяжелой цепи (тяжелую цепь IgG4 гуманизированного антитела к hTfR № 3), состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 212, которая имеет в варибельной области аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 205;

Тяжелая цепь гуманизированного антитела к hTfR, кодируемая фрагментом ДНК, приведенным в SEQ ID NO: 213, представляет собой IgG4.

Пример 11. Конструирование экспрессирующего вектора гуманизированного антитела к hTfR.

Вектор pEF/myc/nuc (Invitrogen Inc.) расщепляли с использованием KpnI и NcoI, чтобы вырезать область, содержащую промотор EF-1 α и его первый интрон, и затупляли концы с использованием T4 ДНК-полимеразы. Область, содержащую энхансер/промотор и интрон CMV, удаляли из pCI-neo (Invitrogen Inc.) посредством расщепления его с использованием BglII и EcoRI, и у остающегося фрагмента, полученного таким образом, затупляли концы с использованием T4 ДНК-полимеразы. В него вставляли указанную выше область, содержащую промотор EF-1 α и его первый интрон, чтобы конструировать вектор pE-neo. Этот вектор pE-neo расщепляли с использованием SfiI и BstXI для того, чтобы удалять область приблизительно в 1 т.п. н., содержащую ген устойчивости к неомицину. ПЦР осуществляли с использованием pcDNA3.1/Hygro(+)(Invitrogen) в качестве матрицы и праймера Hyg-Sfi5' (SEQ ID NO: 216) и праймера Hyg-BstX3' (SEQ ID NO: 217) для того, чтобы амплифицировать ген гигромицина. Ген гигромицина, амплифицированный таким образом, расщепляли с использованием SfiI и BstXI и вставляли в вышеуказанный вектор pE-neo, из которого удаляли ген устойчивости к неомицину для того, чтобы конструировать вектор pE-hygr.

Оба вектора pE-hygr и pE-neo расщепляли с использованием MluI и NotI. Фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 165), кодирующий легкую цепь гуманизированного антитела к hTfR № 1, и фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 173), кодирующий тяжелую цепь антитела, оба их синтезировали в примере 10, расщепляли с использованием MluI и NotI, и фрагменты, полученные таким образом, вставляли в вектор pE-hygr и вектор pE-neo, соответственно, между их сайтами MluI и NotI. Векторы, полученные таким образом, использовали в качестве экспрессирующего вектора для легкой цепи гуманизированного антитела к hTfR № 1 pE-hygr(LC1) и в качестве экспрессирующего вектора для тяжелой цепи антитела pE-neo(HC1) в экспериментах, которые описаны далее.

Аналогичным образом, фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 181), кодирующий легкую цепь гуманизи-

ванного антитела к hTfR № 2, и фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 189), кодирующий тяжелую цепь антитела, оба их синтезировали в примере 10, расщепляли с использованием MluI и NotI, и фрагменты, полученные таким образом, вставляли в вектор pE-hygr и вектор pE-neo, соответственно, между их сайтами MluI и NotI. Векторы, полученные таким образом, использовали в качестве экспрессирующего вектора для легкой цепи гуманизированного антитела к hTfR № 2 pE-hygr(LC2) и в качестве экспрессирующего вектора для тяжелой цепи антитела pE-neo(HC2) в экспериментах, которые описаны далее.

Кроме того, образом, аналогичным приведенному выше, фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 197), кодирующий легкую цепь гуманизированного антитела к hTfR № 3, и фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 211), кодирующий тяжелую цепь антитела, оба их синтезировали в примере 10, расщепляли с использованием MluI и NotI, и фрагменты, полученные таким образом, вставляли в вектор pE-hygr и вектор pE-neo, соответственно, между их сайтами MluI и NotI. Векторы, полученные таким образом, использовали в качестве экспрессирующего вектора для легкой цепи гуманизированного антитела к hTfR № 3 pE-hygr(LC3) и в качестве экспрессирующего вектора для тяжелой цепи антитела pE-neo(HC3) в экспериментах, которые описаны далее.

Кроме того, что касается легкой цепи антитела к hTfR № 3, следующие фрагменты, которые синтезировали в примере 10, а именно:

фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 199), кодирующий легкую цепь гуманизированного антитела к hTfR № 3-2,

фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 201), кодирующий легкую цепь гуманизированного антитела к hTfR № 3-3, и

фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 203), кодирующий легкую цепь гуманизированного антитела к hTfR № 3-4,

расщепляли с использованием MluI и NotI и вставляли в вектор pE-hygr между их сайтами MluI и NotI, чтобы конструировать

pE-hygr(LC3-2), экспрессирующий вектор для легкой цепи гуманизированного антитела к hTfR № 3-2,

pE-hygr(LC3-3), экспрессирующий вектор для легкой цепи гуманизированного антитела к hTfR № 3-3, и

pE-hygr(LC3-4), экспрессирующий вектор для легкой цепи гуманизированного антитела к hTfR № 3-4 соответственно.

Кроме того, образом, аналогичным приведенному выше, в отношении тяжелой цепи антитела к hTfR № 3, фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 213), кодирующий тяжелую цепь IgG4 гуманизированного антитела к hTfR № 3, синтезированный в примере 10, расщепляли с использованием MluI и NotI и вставляли в вектор pE-neo между его сайтами MluI и NotI для того, чтобы конструировать pE-neo(HC3-IgG4), экспрессирующий вектор для тяжелой цепи IgG4 гуманизированного антитела к hTfR № 3.

Пример 12. Конструирование клеток для экспрессии гуманизированного антитела к hTfR.

Клетки CHO (CHO-K1: приобретали в American Type Culture Collection) трансформировали с использованием pE-hygr(LC1), вектора для экспрессии легкой цепи, и pE-neo(HC1), вектора для экспрессии тяжелой цепи, оба их конструировали в примере 11, следующим образом, используя GenePulser (Bio-Rad Inc.). Трансформацию клеток осуществляли в целом следующим образом, клетки CHO-K1, 5×10^5 , высевали в 3,5 см культуральную чашку, содержащую среду CD OptiCHO™ (Life Technologies Inc.) и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. Среду заменяли на среду Opti-MEM™ I (Life Technologies Inc.) и клетки суспендировали при плотности 5×10^6 клеток/мл. Брали 100 мкл клеточной суспензии, в которую добавляли по 5 мкл каждого из раствора pE-hygr(LC1) и раствора плазмидной ДНК pE-neo(HC1), их оба разводили средой Opti-MEM™ I до 100 мкг/мл. Эти плазмиды вводили в клетки с помощью электропорации, используя GenePulser (Bio-Rad Inc.). Затем клетки культивировали в течение ночи в условиях 37°C, 5% CO₂ и подвергали отбору в культуре в среде D OptiCHO™ с добавлением 0,5 мг/мл гигромицина и 0,8 мг/мл G418.

Затем клетки, отобранные выше через отбор в культуре, высевали в 96-луночные планшеты так, чтобы высевать не более одной клетки на лунку, с помощью предельного разведения. Затем клетки культивировали в течение приблизительно 10 суток с тем, чтобы формировать моноклональные колонии. Собирали культуральные супернатанты соответствующих лунок, в которых формировали моноклональные колонии, определяли количество гуманизированного антитела, содержащегося в культуральных супернатантах с помощью ELISA и отбирали клеточные линии с высокой экспрессией гуманизированного антитела.

Вышеуказанный ELISA проводили в целом следующим образом. В каждую лунку 96-луночных микротитровальных планшетов (Nunc Inc.) добавляли 100 мкл раствора поликлонального антитела козы против IgG человека, разведенного в 0,05 М натрий-бикарбонатном буфере (pH 9,6) до 4 мкг/мл, и планшет оставляли стоять в течение по меньшей мере одного часа при комнатной температуре с тем, чтобы допускать абсорбцию антитела планшетами. Затем, после промывания лунок три раза фосфатно-солевым буфером (pH 7,4) с добавлением 0,05% Tween20 (PBS-T), в каждую лунку добавляли 200 мкл блокирую-

шего буфера Starting Block (PBS) (Thermo Fisher Scientific Inc.) и планшеты оставляли стоять в течение 30 мин при комнатной температуре. После промывания каждой лунки с использованием PBS-T три раза, в каждую лунку добавляли культуральный супернатант или стандартный продукт IgG человека, которые разводили в PBS с добавлением 0,5% BSA и 0,05% Tween20 (PBS-BT) до подходящих концентраций, в количестве 100 мкл и планшеты оставляли стоять в течение по меньшей мере одного часа при комнатной температуре. После промывания планшетов три раза в PBS-T, в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора HRP-меченного поликлонального антитела против IgG человека, которое разводили в PBS-BT, и планшеты оставляли стоять в течение по меньшей мере одного часа при комнатной температуре. После промывания лунок три раза в PBS-T, в каждую лунку добавляли о-фенилендиамин 0,4 мг/мл в цитрат-фосфатном буфере (pH 5,0) в количестве 100 мкл и лунки оставляли стоять в течение от 8 до 20 мин при комнатной температуре. Затем в каждую лунку добавляли серную кислоту 1 моль/л в количестве 100 мкл, чтобы останавливать реакцию, и измеряли поглощение для каждой лунки при 490 нм с использованием считывателя 96-луночных планшетов. Клетки, соответствующие лункам, которые давали более высокие измерения, рассматривали в качестве клеточной линии с высокой экспрессией гуманизованного антитела к hTfR № 1. Ее обозначали как экспрессирующую антитело № 1 клеточную линию.

Аналогичным образом, клетки CHO трансформировали экспрессирующим вектором легкой цепи pE-hygr(LC2) и экспрессирующим вектором тяжелой цепи pE-neo(HC2), оба конструировали в примере 11, и получали клеточную линию с высокой экспрессией гуманизованного антитела к hTfR № 2. Ее обозначали как экспрессирующую антитело № 2 клеточную линию.

Кроме того, аналогичным образом, клетки CHO трансформировали экспрессирующим вектором легкой цепи pE-hygr(LC3) и экспрессирующим вектором тяжелой цепи pE-neo(HC3), оба конструировали в примере 11, и получали клеточную линию с высокой экспрессией гуманизованного антитела к hTfR № 3. Ее обозначали как экспрессирующую антитело № 3 клеточную линию.

Кроме того, аналогичным образом, клетки CHO трансформировали экспрессирующим вектором легкой цепи pE-hygr(LC3-2) и экспрессирующим вектором тяжелой цепи pE-neo(HC3), оба конструировали в примере 11, и получали клеточную линию с высокой экспрессией гуманизованного антитела к hTfR № 3-2. Ее обозначали как экспрессирующую антитело № 3-2 клеточную линию.

Кроме того, аналогичным образом, клетки CHO трансформировали экспрессирующим вектором легкой цепи pE-hygr(LC3-3) и экспрессирующим вектором тяжелой цепи pE-neo(HC3), оба конструировали в примере 11, и получали клеточную линию с высокой экспрессией гуманизованного антитела к hTfR № 3-3. Ее обозначали как экспрессирующую антитело № 3-3 клеточную линию.

Кроме того, аналогичным образом, клетки CHO трансформировали экспрессирующим вектором легкой цепи pE-hygr(LC3-4) и экспрессирующим вектором тяжелой цепи pE-neo(HC3), оба конструировали в примере 11, и получали клеточную линию с высокой экспрессией гуманизованного антитела к hTfR № 3-4. Ее обозначали как экспрессирующую антитело № 3-4 клеточную линию.

Кроме того, аналогичным образом, клетки CHO трансформировали экспрессирующим вектором легкой цепи pE-hygr(LC3) и экспрессирующим вектором тяжелой цепи pE-neo(HC3-IgG4), оба конструировали в примере 11, и получали клеточную линию с высокой экспрессией гуманизованного антитела к hTfR № 3(IgG4). Ее обозначали как экспрессирующую антитело № 3(IgG4) клеточную линию.

Кроме того, аналогичным образом, клетки CHO трансформировали экспрессирующим вектором легкой цепи pE-hygr(LC3-2) и экспрессирующим вектором тяжелой цепи pE-neo(HC3-IgG4), оба конструировали в примере 11, и получали клеточную линию с высокой экспрессией гуманизованного антитела к hTfR № 3-2 (IgG4). Ее обозначали как экспрессирующую антитело № 3-2 (IgG4) клеточную линию.

Пример 13. Очистка гуманизованных антител к hTfR.

Экспрессирующую антитело № 1 клеточную линию, экспрессирующую антитело № 2 клеточную линию, экспрессирующую антитело № 3 клеточную линию, экспрессирующую антитело № 3-2 клеточную линию, экспрессирующую антитело № 3-3 клеточную линию и экспрессирующую антитело № 3-4 клеточную линию, полученные в примере 12, соответственно, разводили средой CD OptiCHO™ до плотности приблизительно 2×10^5 клеток/мл. Клеточные суспензии, 200 мл, добавляли в 1 л коническую колбу и культивировали в течение от 6 до 7 суток во влажной среде при 37°C, 5% CO₂, 95% воздуха, при перемешивании со скоростью приблизительно 70 об/мин. Каждый культуральный супернатант собирали посредством центрифугирования и фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) для того, чтобы получить культуральный супернатант. В каждый культуральный супернатант, полученный таким образом, добавляли пять объемов 20 мМ Tris буфера (pH 8,0), содержащего 150 мМ NaCl, и загружали на колонку с белком A (объем колонки: 1 мл, Bio-Rad Inc.), которую предварительно уравнивали с использованием трех объемов колонки буфера 20 мМ Tris (pH 8,0), содержащего 150 мМ NaCl. Затем колонку промывали пятью объемами колонки того же буфера и адсорбированное гуманизованное антитело элюировали четырьмя объемами колонки 50 мМ глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 мМ NaCl, и собирали элюированную фракцию. В элюированные фракции добавляли 1 М буфер Tris (pH 8,0), осуществляя нейтрализацию с его помощью, и использовали их в качестве очищенного препарата антитела.

В приведенном выше антитело, очищенное от культурального супернатанта экспрессирующей антитело № 1 клеточной линии, обозначали как гуманизированное антитело к hTfR № 1. Антитело, очищенное от культурального супернатанта экспрессирующей антитело № 2 клеточной линии, обозначали как гуманизированное антитело к hTfR № 2. Антитело, очищенное от культурального супернатанта экспрессирующей антитело № 3 клеточной линии, обозначали как гуманизированное антитело к hTfR № 3. Антитело, очищенное от культурального супернатанта экспрессирующей антитело № 3-2 клеточной линии, обозначали как гуманизированное антитело к hTfR № 3-2. Антитело, очищенное от культурального супернатанта экспрессирующей антитело № 3-3 клеточной линии, обозначали как гуманизированное антитело к hTfR № 3-3. Антитело, очищенное от культурального супернатанта экспрессирующей антитело № 3-4 клеточной линии, обозначали как гуманизированное антитело к hTfR № 3-4.

Кроме того, экспрессирующую антитело № 3 (IgG4) клеточную линию и экспрессирующую антитело № 3-2 (IgG4) клеточную линию, полученные в примере 12, также культивировали аналогично тому, что приведено выше, и из их культуральных супернатантов получали очищенные гуманизированное антитело к hTfR № 3 (IgG4) и гуманизированное антитело к hTfR № 3-2 (IgG4) соответственно. Эти два антитела использовали в фармакокинетическом анализе с использованием обезьян, как описано в примере 15.

Пример 14. Измерение аффинности к TfR человека и TfR обезьяны у гуманизированных антител к hTfR.

Аффинность гуманизированных антител к hTfR, полученных в примере 13, к TfR человека и обезьяны измеряли способом, описанным в примере 7. В табл. 7 представлен результат измерения константы скорости ассоциации (k_{on}), константы скорости диссоциации (k_{off}) и константы диссоциации (K_D) гуманизированных антител к hTfR № от 1 до 3-4 (в таблице они соответствуют № от 1 до 3-4) с TfR человека.

Таблица 7

№ антитела	k_{on} ($M^{-1}c^{-1}$)	k_{off} (c^{-1})	K_D (M)
1	3.93×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
2	1.97×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
3	1.19×10^6	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
3-2	6.06×10^5	1.45×10^{-5}	2.39×10^{-11}
3-3	6.00×10^5	1.25×10^{-5}	2.09×10^{-11}
3-4	1.01×10^6	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$

В табл. 8 представлен результат измерения константы скорости ассоциации (k_{on}), константы скорости диссоциации (k_{off}), и константы диссоциации (K_D) гуманизированных антител к hTfR № от 1 до 3-4 (в таблице они соответствуют № от 1 до 3-4) с TfR обезьяны.

Таблица 8

Аффинность к TfR обезьяны у гуманизированных антител к hTfR

№ антитела	k_{on} ($M^{-1}c^{-1}$)	k_{off} (c^{-1})	K_D (M)
1	2.53×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
2	4.87×10^5	3.67×10^{-5}	7.55×10^{-11}
3	6.03×10^5	6.76×10^{-4}	1.12×10^{-9}
3-2	4.95×10^5	8.76×10^{-4}	1.77×10^{-9}
3-3	4.88×10^5	9.32×10^{-4}	1.91×10^{-9}
3-4	5.19×10^5	1.35×10^{-4}	2.60×10^{-10}

Результат измерения аффинности гуманизированного антитела к hTfR № от 1 до 3-4 к TfR человека показывает, что константа диссоциации между гуманизированными антителами к hTfR № 1, 2, 3 и 3-4 и TfR человека была меньше 1×10^{-12} M (табл. 7). Константа диссоциации между гуманизированными антителами к hTfR № 3-2 и 3-3 и TfR человека составляла $2,39 \times 10^{-11}$ M и $2,09 \times 10^{-11}$ M соответственно. Одновременно, константа диссоциации между предварительно гуманизированными антителами к hTfR, соответствующими этим антителам, и TfR человека составляла: $5,09 \times 10^{-12}$ M для антитела № 1, $1,12 \times 10^{-11}$ M для антитела № 2 и меньше чем 1×10^{-12} M для антитела № 3 (табл. 4). Эти результаты демонстрируют, что высокая аффинность к TfR человека у этих предварительно гуманизированных антител к hTfR сохранялась после гуманизации антител, а также показывают, что антитела к hTfR № от 4 до 14 также сохраняют свою аффинность к TfR человека после их гуманизации.

Тогда по результату измерения у гуманизированных антител к hTfR аффинности к TfR обезьяны видно, что константа диссоциации гуманизированного антитела к hTfR № 1 составляла меньше 1×10^{-12}

М, что показывает, что предварительно гуманизованную аффинность сохраняли после гуманизации, а также, в отношении гуманизованного антитела к hTfR № 2, предварительно гуманизованная константа диссоциации составляла $4,18 \times 10^{-11}$ М и $7,55 \times 10^{-11}$ М после гуманизации, что указывает на сохранение аффинности (табл. 5, табл. 8). С другой стороны, относительно гуманизованных антител к hTfR № с 3 до 3-4, хотя константа диссоциации антитела к hTfR № 3, предварительно гуманизованного антитела, соответствующего им, с TfR обезьяны составляла меньше 1×10^{-12} М, их константа диссоциации после гуманизации составляла от $2,60 \times 10^{-10}$ М до $1,91 \times 10^{-9}$ М, что указывает на снижение аффинности к TfR обезьяны. В отношении гуманизованного антитела к hTfR № 3, несмотря на то, что наблюдали снижение аффинности к TfR обезьяны, результат показывает, что предварительно гуманизованные высокоаффинные антитела к hTfR к TfR обезьяны не были утрачены после гуманизации и в целом сохранены. Это указывает на то, что в отношении гуманизованных антител к hTfR № от 4 до 14 также можно сохранять предварительно гуманизованную аффинность к TfR обезьяны после их гуманизации.

Пример 15. Фармакокинетический анализ гуманизованного антитела к hTfR у обезьян.

Используя обезьян, осуществляли фармакокинетический анализ четырех антител: гуманизованного антитела к hTfR № 3, гуманизованного антитела к hTfR № 3-2, гуманизованного антитела к hTfR № 3 (IgG4) и гуманизованного антитела к hTfR № 3-2 (IgG4). Помимо того, тяжелая цепь гуманизованного антитела к hTfR № 3 представляла собой IgG1, тогда как в гуманизованном антителе к hTfR № 3 (IgG4) тяжелую цепь гуманизованного антитела к hTfR № 3 превращали в IgG4, сохраняя ее переменную область интактной. Кроме того, тяжелая цепь гуманизованного антитела к hTfR № 3-2 представляла собой IgG1, тогда как в гуманизованном антителе к hTfR № 3-2 (IgG4) тяжелую цепь гуманизованного антитела к hTfR № 3-2 превращали в IgG4, сохраняя ее переменную область интактной. Соответственно, эти четыре антитела внутривенно вводили один раз самцам макаков-крабоедов в дозе 5,0 мг/кг и брали образцы их периферической крови перед введением, через 2, 30 мин, 2 ч, 4 и 8 ч после введения и затем их подвергали орошению всего организма. В качестве отрицательного контроля трастузумаб (Герцептин™, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), гуманизованное антитело к белку HER2, внутривенно вводили один раз одной обезьяне аналогичным образом, и брали образцы ее периферической крови перед введением, через 2 мин, 30 мин, 2 ч, 4 ч и 8 ч после введения, и затем ее подвергали орошению всего организма. После орошения иссекали ткани головного мозга и спинного мозга, включая продолговатый мозг, и другие ткани (печень, сердце, селезенку и костный мозг). Используя эти ткани головного мозга и спинного мозга и другие ткани, измеряли концентрацию гуманизованных антител к hTfR и осуществляли иммуногистохимическое окрашивание.

Измерение концентрации гуманизованных антител к hTfR в тканях и периферической крови осуществляли, в целом придерживаясь процедуры, описанной далее. Помимо того, в отношении головного мозга, полученные ткани разделяли на кору головного мозга, мозжечок, гиппокамп и продолговатый мозг, и затем измеряли концентрации гуманизованных антител к hTfR. Соответствующие ткани, полученные таким образом, гомогенизировали в RIPA Buffer (Wako Pure Chemical Industries Inc.), содержащем Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Inc.), центрифугировали и собирали супернатант. Из вышеуказанной периферической крови, выделяли сыворотку. В каждую лунку High Bind Plate (Meso Scale Diagnostics) добавляли 10 мкл Affinipure Goat Anti mouse IgG Fcγ pAb (Jackson ImmunoResearch Inc.) и планшет оставляли стоять в течение 1 ч для предоставления твердой фазы. Затем в каждую лунку добавляли 150 мкл блокирующего буфера SuperBlock в PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) и планшет блокировали посредством встряхивания в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл супернатанта гомогената или сыворотки и лунки встряхивали в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл Affinipure Goat Anti mouse IgG Fab-Biotin (Jackson ImmunoResearch Inc.) и встряхивание продолжали в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл SULFO-Tag-Streptavidin (Meso Scale Diagnostics Inc.), после чего следовало встряхивание в течение получаса. В каждую лунку добавляли 150 мкл Read Buffer T (Meso Scale Diagnostics Inc.) и количество люминесценции в каждой лунке считывали на считывателе Sector™ Imager 6000. Количество антитела, содержащегося в каждой ткани и периферической крови, вычисляли посредством получения калибровочной кривой на основании измерений стандартных образцов, содержащих известные концентрации антитела к hTfR и последующей интерполяции измерений каждого из образцов с привязкой к стандарту. Измерение концентрации повторяли три раза для каждого образца.

Результат измерения концентрации гуманизованных антител к hTfR в тканях головного мозга и спинного мозга представлены в табл. 9.

Таблица 9

Концентрация гуманизированных антител к hTfR
в тканях головного мозга (мкг/г влажной массы)

№ анти- тела	Кора головного мозга	Мозжечок	Гиппокамп	Продолго- ватый мозг	Спинальный мозг
3	0.67±0.12	0.61±0.02	0.49±0.02	0.59±0.10	0.46±0.17
3-2	1.05±0.07	0.72±0.04	0.72±0.07	0.69±0.03	0.46±0.02
3(IgG4)	0.65±0.05	0.59±0.03	0.56±0.02	0.59±0.02	0.46±0.07
3-2(IgG4)	0.76±0.02	0.57±0.07	0.62±0.05	0.73±0.16	0.48±0.03
Отрицат. контроль	0.0082±	0.0090±	0.0053±	0.011±	0.15±
	0.0032	0.0067	0.0009	0.003	0.04

Наблюдали накопление всех антител, т.е. гуманизированного антитела к hTfR № 3, гуманизированного антитела к hTfR № 3-2, гуманизированного антитела к hTfR № 3 (IgG4) и гуманизированного антитела к hTfR № 3-2 (IgG4) в коре головного мозга, мозжечке, гиппокампе, продолговатом мозге и спинном мозге (табл. 9). Соответственно, накоплены следующие количества:

для гуманизированного антитела к hTfR № 3 приблизительно в 82 раза выше в коре головного мозга, приблизительно в 68 раз выше в мозжечке, приблизительно в 92 раза выше в гиппокампе, приблизительно в 54 раза выше в продолговатом мозге и приблизительно в 3,1 раза выше в спинном мозге в сравнении с отрицательным контролем, трастузумабом (Герцептином™),

для гуманизированного антитела к hTfR № 3-2 приблизительно в 128 раз выше в коре головного мозга, приблизительно в 80 раз выше в мозжечке, приблизительно в 136 раз выше в гиппокампе, приблизительно в 63 раза выше в продолговатом мозге, приблизительно в 3,1 раза выше в спинном мозге в сравнении с отрицательным контролем, трастузумабом,

для гуманизированного антитела к hTfR № 3 (IgG4) приблизительно в 79 раз выше в коре головного мозга, приблизительно в 66 раз выше в мозжечке, приблизительно в 106 раз выше в гиппокампе, приблизительно в 54 раза выше в продолговатом мозге, приблизительно в 3,1 раза выше в спинном мозге в сравнении с отрицательным контролем, трастузумабом, и

для гуманизированного антитела к hTfR № 3-2 (IgG4) приблизительно в 93 раза выше в коре головного мозга,

приблизительно в 63 раза выше в мозжечке, приблизительно в 117 раз выше в гиппокампе, приблизительно в 66 раз выше в продолговатом мозге, приблизительно в 3,2 раза выше в спинном мозге в сравнении с отрицательным контролем, трастузумабом (табл. 10).

Эти результаты показывают, что эти четыре гуманизированных антитела к hTfR обладают свойством, которое позволяет им проходить через гематоэнцефалический барьер и накапливаться в тканях головного мозга, а также что теперь возможно позволять фармацевтическим средствам, которые должны функционировать в тканях головного мозга, эффективно накапливаться в них, посредством связывания таких фармацевтических средств с одним из этих антител.

Таблица 10

Количество гуманизированных антител к hTfR, накопленное в тканях головного мозга
(показатели в сравнении с отрицательным контролем)

№ анти- тела	Кора головного мозга	Мозжечок	Гиппокамп	Продолгова- тый мозг	Спинальный мозг
3	82	68	92	54	3.1
3-2	128	80	136	63	3.1
3(IgG4)	79	66	106	54	3.1
3-2(IgG4)	93	63	117	66	3.2
Отрицат. контроль	1	1	1	1	1

Далее на фиг. 4 представлен результат измерения концентрации гуманизированных антител к hTfR в тканях печени, сердца, селезенки и костного мозга. Наблюдали накопление четырех гуманизированных антител к hTfR, а также отрицательного контроля, трастузумаба, в печени и селезенке, и их накопленное количество равно между четырьмя гуманизированными антителами к hTfR и трастузумабом. В сердце гуманизированные антитела к hTfR склонны к большему накоплению, чем трастузумаб, отрицательный контроль, но количество только приблизительно в 1,5-2,8 раза выше, чем для отрицательного контроля. В костном мозге гуманизированные антитела к hTfR склонны к заметно большему накоплению, чем трастузумаб, отрицательный контроль, и количество составляло 3,5-16 раз выше, чем для отрицательного контроля. Полагают, что причина этого накопления гуманизированных антител к hTfR в костном мозге состоит в том, что TfR экспрессируется на высоком уровне в костном мозге, гематopoэтическом органе,

и, следовательно, через связывание с TfR гуманизированных антител к hTfR накапливается больше, чем отрицательного контроля. Эти данные показывают, что четыре гуманизированных антитела к hTfR обладают свойством, которое позволяет им специфически накапливаться в большом мозге, мозжечке, гиппокампе и продолговатом мозге, которые образуют центральную нервную систему, и что теперь возможно позволять фармацевтическим средствам, которые должны функционировать в тканях головного мозга, эффективно накапливаться в них, посредством связывания таких фармацевтических средств с одним из этих антител.

Далее в табл. 11 представлен результат измерения фармакокинетики гуманизированных антител к hTfR в крови. Относительно отрицательного контроля, трастузумаба, концентрация четырех гуманизированных антител к hTfR в крови сохранялась на высоких уровнях, выше чем 60 мкг/мл, даже через 8 ч после введения, что показывает, что они стабильны в крови.

Таблица 11
Фармакокинетика гуманизированных антител к hTfR в крови (мкг/мл крови)

№ анти- тела	Время после введения				
	2 мин	30 мин	2 ч	4 ч	8 ч
3	173	147	128	117	97.5
3-2	124	99.5	78.5	76.5	61
3(IgG4)	141	113	99	95	83
3-2(IgG4)	132	111	98.5	99	95.5
Отрицат. контроль	124	92.5	96	75.5	60.5

Иммуногистохимическое окрашивание гуманизированных антител к hTfR в тканях головного мозга осуществляли следующим образом. Собранные ткани быстро замораживали до -80°C в Tissue-Tek Cryo 3DM (Sakura Finetek Inc.) для того, чтобы получать замороженные блоки тканей. Замороженные блоки нарезали на 4 мкм срезы, которые помещали на покрытые MAS предметные стекла (Matsunami Glass Inc.). Проводили реакцию тканевых срезов с 4% параформальдегидом (Wako Pure Chemical Industries Inc.) в течение 5 мин при 4°C и фиксировали их на предметных стеклах. Затем проводили реакцию тканевых срезов с метаноловым раствором, содержащим 0,3% пероксида водорода (Wako Pure Chemical Industries Inc.), в течение 30 мин для того, чтобы инактивировать собственные пероксидазы. Затем предметные стекла блокировали посредством реакции с блокирующим буфером SuperBlock в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем проводили реакцию тканевых срезов с Mouse IgG-heavy and light chain Antibody (Bethyl Laboratories) в течение 1 ч при комнатной температуре. Тканевые срезы оставляли для развития окраски с субстратом DAB (3,3'-диаминобензидин, Vector Laboratories Inc.), осуществляли контрастное окрашивание раствором гематоксилина Мейера (Merck Inc.), дегидратировали, осветляли, заливали и наблюдали под микроскопом.

На фиг. 5 представлен результат иммуногистохимического окрашивания гуманизированных антител к hTfR в коре головного мозга. Специфическое окрашивание кровеносных сосудов и нейроноподобных клеток наблюдали в коре головного мозга обезьян, которым вводили гуманизированное антитело к hTfR № 3, гуманизированное антитело к hTfR № 3-2, гуманизированное антитело к hTfR № 3 (IgG4) и гуманизированное антитело к hTfR № 3-2 (IgG4) (фиг. 5b-e соответственно). В коре головного мозга обезьяны, которой вводили гуманизированное антитело к hTfR № 3-2, в частности, (фиг. 5c), в области паренхимы головного мозга, вне кровеносных сосудов, также наблюдали обширное специфическое окрашивание. Помимо того, окрашивание не наблюдали в коре головного мозга обезьяны, которой вводили герцептин в качестве контроля, что указывает на то, что окрашивание ткани, которое наблюдали на фиг. 5b-e, было специфическим для гуманизированных антител к hTfR (фиг. 5a).

На фиг. 6 представлен результат иммуногистохимического окрашивания гуманизированных антител к hTfR в гиппокампе. Специфическое окрашивание кровеносных сосудов и нейроноподобных клеток наблюдали в гиппокампе обезьян, которым вводили гуманизированное антитело к hTfR № 3, гуманизированное антитело к hTfR № 3-2, гуманизированное антитело к hTfR № 3(IgG4) и гуманизированное антитело к hTfR № 3-2 (IgG4) (фиг. 6b-e соответственно). Помимо того, окрашивание не наблюдали в гиппокампе обезьяны, которой вводили герцептин в качестве контроля, что указывает на то, что окрашивание ткани, которое наблюдали на фиг. 6b-e, было специфическим для гуманизированных антител к hTfR (фиг. 6a).

На фиг. 7 представлен результат иммуногистохимического окрашивания гуманизированных антител к hTfR в мозжечке. Специфическое окрашивание кровеносных сосудов и клеток Пуркинье наблюдали в мозжечке обезьян, которым вводили гуманизированное антитело к hTfR № 3, гуманизированное антитело к hTfR № 3-2, гуманизированное антитело к hTfR № 3(IgG4) и гуманизированное антитело к hTfR № 3-2 (IgG4) (фиг. 7b-e соответственно). Помимо того, окрашивание не наблюдали в мозжечке обезьяны, которой вводили герцептин в качестве контроля, что указывает на то, что окрашивание ткани, которое наблюдали на фиг. 7b-e, было специфическим для гуманизированных антител к hTfR (фиг. 7a).

На фиг. 8 представлен результат иммуногистохимического окрашивания гуманизированных антител к hTfR в продолговатом мозге. Специфическое окрашивание кровеносных сосудов и нейроноподобных клеток наблюдали в продолговатом мозге обезьян, которым вводили гуманизированное антитело к hTfR № 3, гуманизированное антитело к hTfR № 3-2, гуманизированное антитело к hTfR № 3(IgG4) и гуманизированное антитело к hTfR № 3-2 (IgG4) (фиг. 8b-e соответственно). Помимо того, окрашивание не наблюдали в продолговатом мозге обезьяны, которой вводили герцептин в качестве контроля, что указывает на то, что окрашивание ткани, которое наблюдали на фиг. 8b-e, было специфическим для гуманизированных антител к hTfR (фиг. 8a).

По результату иммуногистохимического окрашивания большого мозга и мозжечка в примере 8 сделано предположение о том, что, хотя антитело к hTfR № 1, предварительно гуманизированное антитело мыши, может связываться с hTfR, встречающимся на эндотелии кровеносных сосудов в головном мозге, количественный перенос в паренхиму головного мозга будет небольшим. С другой стороны, показано, что антитела к hTfR № 2 и 3, предварительно гуманизированные антитела мыши, могут связываться с hTfR, встречающимся на эндотелии кровеносных сосудов в головном мозге, и, после связывания с hTfR, проходить через гематоэнцефалический барьер в паренхиму головного мозга, и, кроме того, подвергаться накоплению в паренхиме головного мозга и нейроноподобных клетках в гиппокампе, а также в клетках Пуркинье в мозжечке.

По результату иммуногистохимического окрашивания в большом мозге, гиппокампе, мозжечке и продолговатом мозге в примере 15, обнаружено, что четыре тестируемых гуманизированных антитела к hTfR, полученные посредством гуманизации антитела к hTfR № 3, которые использовали в эксперименте, могут связываться с hTfR, встречающимся на эндотелии кровеносных сосудов головного мозга, и, после связывания hTfR, проходить через гематоэнцефалический барьер и переноситься в паренхиму головного мозга, и, кроме того, накапливаться в нейроноподобных клетках в коре головного мозга; в паренхиме головного мозга и нейроноподобных клетках в гиппокампе; в клетках Пуркинье в мозжечке; и в нейроноподобных клетках в продолговатом мозге.

Пример 16. Получение клеток, экспрессирующих слитый белок hI2S-гуманизированного антитела к hTfR.

Посредством расщепления pEF/myc/nucvector (Invitrogen Inc.) с использованием KpnI и NcoI вырезали область, содержащую промотор EF-1 α и его первый интрон, у которой затем затупляли концы с использованием T4 ДНК-полимеразы. После расщепления pCI-neo (Invitrogen Inc.) с использованием BglIII и EcoRI для того, чтобы удалять область, содержащую энхансер/промотор и интрон CMV, концы вектора затупляли с использованием T4 ДНК-полимеразы, и туда вставляли указанную выше область, содержащую промотор EF-1 α и его первый интрон, чтобы конструировать вектор pE-neo. Вектор pE-neo расщепляли с использованием SfiI и BstXI, чтобы вырезать область приблизительно 1 т.п. о., содержащую ген устойчивости к неомицину. Используя pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen Inc.) в качестве матрицы и праймер Hyg-Sfi5' (SEQ ID NO: 216) и праймер Hyg-BstX3' (SEQ ID NO: 217), ПЦП осуществляли для того, чтобы амплифицировать ген гигромицина. Ген гигромицина, амплифицированный таким образом, расщепляли с использованием SfiI и BstXI и вставляли в вышеуказанный вектор pE-neo, из которого удаляли ген устойчивости к неомицину для того, чтобы конструировать вектор pE-hygr.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, имеющий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 248, которая содержала ген, кодирующий белок, в котором тяжелая цепь гуманизированного антитела к hTfR, которая имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 172, соединена на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность (Gly Ser) с hI2S, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 246. Этот фрагмент ДНК кодировал белок, в котором тяжелая цепь гуманизированного антитела к hTfR, которая имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 247, соединена через линкерную последовательность (Gly Ser) с hI2S. Этот фрагмент ДНК имел, на его 5'-стороне, последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, действующий в качестве сигнала секреции, в этом порядке от 5'-конца, и последовательность NotI на его 3'-стороне. Фрагмент ДНК расщепляли с использованием MluI и NotI и встраивали в вектор pE-neo, между его MluI и NotI, чтобы конструировать pE-neo(hI2S-1).

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, имеющий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 250, которая содержала ген, кодирующий белок, в котором тяжелая цепь гуманизированного антитела к hTfR, которая имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 188, соединена на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность (Gly Ser) с hI2S, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 246. Этот фрагмент ДНК кодировал белок, в котором тяжелая цепь гуманизированного антитела к hTfR, которая имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 249, соединена через линкерную последовательность (Gly Ser) с hI2S. Этот фрагмент ДНК имел на его 5'-стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, действующий в качестве сигнала секреции, в этом порядке от 5'-конца, и последовательность NotI на его 3'-стороне. Фрагмент ДНК расщепляли с использо-

ванием MluI и NotI и вставляли в вектор pE-neo между его MluI и NotI для того, чтобы конструировать pE-neo(НС-I2S-2).

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, имеющий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 252, которая содержала ген, кодирующий белок, в котором тяжелая цепь гуманизированного антитела к hTfR, которая имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, соединена на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность (Gly Ser) с hI2S, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 246. Этот фрагмент ДНК кодировал белок, в котором тяжелая цепь гуманизированного антитела к hTfR, которая имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 251, соединена через линкерную последовательность (Gly Ser) с hI2S. Этот фрагмент ДНК имел на его 5'-стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, действующий в качестве сигнала секреции, в этом порядке от 5'-конца, и последовательность NotI на его 3'-стороне. Фрагмент ДНК расщепляли с использованием MluI и NotI и вставляли в вектор pE-neo между его MluI и NotI для того, чтобы конструировать pE-neo(НС-I2S-3).

Клетки CHO (CHO-K1: приобретали в American Type Culture Collection) трансформировали в соответствии со способом, описанным в примере 12, с использованием pE-neo(НС-I2S-1) и pE-hygr(LC1), которые получали в примере 11, чтобы получать клеточную линию, экспрессирующую слитый белок между hI2S и гуманизированным антителом к hTfR. Эту клеточную линию обозначали как экспрессирующую hI2S-антитело к hTfR клеточную линию 1. Слитый белок между hI2S и гуманизированным антителом к hTfR, экспрессируемый клеточными линиями, обозначали как I2S-антитело к hTfR 1.

Аналогичным образом, клетки CHO трансформировали с использованием pE-neo(НС-I2S-2) и pE-hygr(LC2), которые получали в примере 11, чтобы получать клеточную линию, экспрессирующую слитый белок между hI2S и гуманизированным антителом к hTfR. Эту клеточную линию обозначали как экспрессирующую hI2S-антитело к hTfR клеточную линию 2. Слитый белок между hI2S и гуманизированным антителом к hTfR, экспрессируемый клеточными линиями, обозначали как I2S-антитело к hTfR 2.

Кроме того, аналогичным образом, клетки CHO трансформировали с использованием pE-neo(НС-I2S-3) и pE-hygr(LC3), которые получали в примере 11, чтобы получать клеточную линию, экспрессирующую слитый белок между hI2S и гуманизированным антителом к hTfR. Эту клеточную линию обозначали как экспрессирующую hI2S-антитело к hTfR клеточную линию 3. Слитый белок между hI2S и гуманизированным антителом к hTfR, экспрессируемый клеточными линиями, обозначали как I2S-антитело к hTfR 3.

Пример 17. Получение I2S-антител к hTfR.

I2S-антитела к hTfR получали с помощью следующего способа. Средой CD OptiCHO™ разводили экспрессирующие hI2S-антитела к hTfR клеточные линии 1, 2 и 3, полученные в примере 16, до плотности приблизительно 2×10^5 клеток/мл соответственно. Клеточные суспензии, 200 мл, добавляли в соответствующие 1 л конические колбы и культивировали в течение от 6 до 7 суток во влажной среде при 37°C, 5% CO₂, 95% воздуха, при перемешивании со скоростью приблизительно 70 об/мин. Каждый культуральный супернатант собирали посредством центрифугирования и фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) для того, чтобы получать культуральный супернатант. В каждый культуральный супернатант, полученный таким образом, добавляли пять объемов колонки 20 mM Tris буфера (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl, и загружали на колонку с белком А (объем колонки: 1 мл, Bio-Rad Inc.), которую предварительно уравнивали с использованием трех объемов колонки буфера 20 mM Tris (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl. Затем колонку промывали пятью объемами колонки того же буфера и адсорбированное I2S-антитело к hTfR элюировали с использованием четырех объемов колонки 50 mM глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 mM NaCl. pH элюата, содержащего I2S-антитело к hTfR, корректировали до pH 7,0 с использованием 1 M буфера Tris (pH 8,0) и затем буфер заменяли на PBS буфер, используя мембрану Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.), чтобы получать очищенный продукт I2S-антитела к hTfR.

Аффинность к TfR человека и обезьяны у I2S-антител к hTfR, полученных таким образом, можно измерять, например, способом, описанным в примере 7. Фармакокинетический анализ I2S-антител к hTfR после их внутривенного введения можно проводить, например, способом, описанным в примере 8. Фармакологические эффекты I2S-антител к hTfR можно оценивать, например, посредством внутривенного введения I2S-антител к hTfR мышам I2S-KO/hTfR KI, которых можно получать через скрещивание мышей с нокаутом гена идуронат-2-сульфатазы (мышь I2S-KO), модельных мышей с синдромом Хантера, с мышами hTfR-KI, описанными в примере 7-2, и измерения снижения гликозаминогликанов, накопленных в головном мозге.

Пример 18. Оценка переноса I2S-антител к hTfR в головной мозг-1.

Каждый из очищенных продуктов I2S-антитела к hTfR 3, полученных в примере 17, внутривенно инъецировали, при дозе 1 мг/кг, мышам hTfR-KI, полученным способом, описанным в примере 7-2 (группа введения I2S-антитела к hTfR). В качестве контроля рекомбинантную hI2S (rhI2S) внутривенно

инъекции, при дозе 1 мг/кг, мышам hTfR-KI (контрольная группа). Пятнадцать мышей hTfR-KI вводили в группу введения I2S-антитела к hTfR и трех в контрольную группу (самцы в возрасте от 15 до 18 недель). Помимо того, rhI2S, использованную выше, получали в соответствии со стандартным способом, который описан в публикации международного патента (WO 2012/102998). Также возможно использовать Elargase(R), лекарственный препарат, доступный на рынке, в качестве.

В группе введения I2S-антитела к hTfR трех мышей подвергали орошению всего организма физиологическим раствором через 15 мин, 1 ч, 4 ч, 8 ч и 24 ч, соответственно, после введения I2S-антитела к hTfR 3, а также получали головной мозг (большой мозг и мозжечок). В отношении контрольной группы орошение всего организма физиологическим раствором осуществляли через один час после введения rhI2S, и также получали головной мозг (большой мозг и мозжечок). Массу (влажную массу) иссеченного большого мозга и мозжечка взвешивали, и затем большой мозг и мозжечок гомогенизировали с использованием T-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.), содержащего Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Inc.), и их супернатанты собирали после центрифугирования. Измеряли количество I2S-антитела к hTfR, содержащегося в супернатанте гомогената, для группы введения I2S-антитела к hTfR, и количество rhI2S, содержащейся в супернатанте гомогената для контрольной группы, посредством ECL, как описано в примерах 20 и 21, соответственно, и вычисляли количество I2S-антитела к hTfR, содержащегося в 1 г головного мозга (влажная масса) (концентрация I2S-антитела к hTfR в тканях головного мозга) и количество rhI2S (концентрация rhI2S в тканях головного мозга). Результат представлен в табл. 12.

Концентрация I2S-антитела к hTfR и rhI2S в тканях головного мозга через один час после введения составляла $0,368 \pm 0,019$ мкг/г влажной массы и $0,00134 \pm 0,00232$ мкг/г влажной массы, соответственно, что показывает, что концентрация I2S-антитела к hTfR приблизительно в 270 раз превышала таковую для rhI2S. Результат показывает, что rhI2S, которая с трудом проходит через гематоэнцефалический барьер в целом и не переносится в головной мозг, можно заставлять проходить через гематоэнцефалический барьер и переноситься в ткани головного мозга посредством ее комбинирования с антителом к hTfR. Кроме того, концентрация I2S-антитела к hTfR в тканях головного мозга достигала $0,263 \pm 0,038$ мкг/г влажной массы уже через 15 мин после введения, что приблизительно в 200 раз превосходило концентрацию rhI2S в тканях головного мозга через один час после введения. Результат также указывает на то, что посредством комбинирования с антителом к hTfR, становится возможным позволять rhI2S быстро переноситься в ткани головного мозга.

Таблица 12

Концентрация I2S-антитела к hTfR и rhI2S в тканях головного мозга (мкг/г влажной массы)

Время после введения (ч)	I2S-антитело к hTfR	rhI2S
0.25	0.263 ± 0.038	-
1	0.368 ± 0.019	0.00134 ± 0.00232
4	0.440 ± 0.033	-
8	0.382 ± 0.011	-
24	0.245 ± 0.012	-

Пример 19. Оценка переноса I2S-антител к hTfR в головной мозг-2.

Очищенный продукт I2S-антитела к hTfR 3, полученный в примере 17, внутривенно вводили один раз самцам макаков-крабоедов, в дозе 5 мг/кг (группа введения I2S-антитела к hTfR). Аналогичным образом, rhI2S вводили один раз самцам макаков-крабоедов, в дозе 5 мг/кг (группа rhI2S). rhI2S, использованную здесь, получали в соответствии со стандартным способом, который описан в публикации международного патента (WO 2012/102998). Также возможно использовать Elargase(R), лекарственный препарат, доступный на рынке, в качестве rhI2S. Две обезьяны вводили в каждую группу. Через 8 ч после введения осуществляли орошение всего организма. После орошения иссекали ткани головного мозга, включая шейный отдел спинного мозга. Ткани головного мозга, иссеченные таким образом, разделяли на кору головного мозга, мозжечок, гиппокамп и шейный отдел спинного мозга, и каждый из них гомогенизировали с использованием T-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.), содержащего Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Inc.), центрифугировали и собирали супернатант. Измеряли количество I2S-антитела к hTfR, содержащегося в супернатанте гомогената в группе введения I2S-антитела к hTfR, и количество rhI2S, содержащейся в супернатанте гомогената в контрольной группе, посредством ECL, как описано в примерах 20 и 21 соответственно. На основе измерения, полученного таким образом, вычисляли количество I2S-антитела к hTfR, содержащегося в 1 г (г влажной массы) коры головного мозга, мозжечка, гиппокампа и шейного отдела спинного мозга (концентрация I2S-антитела к hTfR в этих тканях головного мозга), а также количество rhI2S (концентрация rhI2S в этих тканях головного мозга). Результат представлен на фиг. 9.

Концентрация I2S-антитела к hTfR в коре головного мозга составляла приблизительно 0,22 мкг/г, тогда как таковая для rhI2S составляла 0,035 мкг/г. Концентрация I2S-антитела к hTfR в мозжечке составляла приблизительно 0,18 мкг/г, тогда как таковая для rhI2S составляла 0,02 мкг/г. Концентрация

I2S-антитела к hTfR в гиппокампе составляла приблизительно 0,25 мкг/г, тогда как таковая для rhI2S составляла 0,017 мкг/г. И концентрация I2S-антитела к hTfR в шейном отделе спинного мозга составляла приблизительно 0,15 мкг/г, тогда как таковая для rhI2S составляла 0,039 мкг/г. Таким образом, показано, что концентрация I2S-антитела к hTfR в коре головного мозга, мозжечке, гиппокампе и шейном отделе спинного мозга приблизительно в 6,3 раза, приблизительно в 9,0 раза, приблизительно в 14,7 раза и приблизительно в 3,8 раза выше таковой для rhI2S соответственно. Результат показывает, что посредством связывания hI2S с антителом к hTfR, становится возможным позволять hI2S активно проходить через гематоэнцефалический барьер и эффективно попадать в головной мозг. В частности, то, что концентрация I2S-антитела к hTfR в гиппокампе приблизительно в 12,5 раза выше таковой для rhI2S, указывает на то, что введение I2S-антитела к hTfR может позволять I2S проявлять свою активность в гиппокампе, среди прочего. Энцефалопатию у пациентов с синдромом Хантера нельзя улучшать посредством ферментной заместительной терапии с использованием стандартной rhI2S, поскольку мало rhI2S может проходить через гематоэнцефалический барьер. В отличие от этого, поскольку I2S-антитело к hTfR может проходить через гематоэнцефалический барьер, введение I2S-антитела к hTfR может усиливать активность I2S в тканях головного мозга, таких как кора головного мозга, гиппокамп и мозжечок. Следовательно, I2S-антитело к hTfR (в частности, I2S-антитело к hTfR 3) можно использовать в качестве терапевтических средств для усиления активности I2S в головном мозге пациентов с синдромом Хантера. Таким образом, посредством введения I2S-антитела к hTfR (в частности, I2S-антитела к hTfR 3), возможны профилактика и лечение энцефалопатии у пациентов с синдромом Хантера, что является затруднительным при ферментной заместительной терапии с использованием стандартной rhI2S. В частности, это перспективно в качестве терапевтического средства для пациентов с синдромом Хантера, которому сопутствуют нарушения в гиппокампе.

Пример 20. Количественное определение I2S-антитела к hTfR посредством ECL.

В каждую лунку 96-луночного Streptavidin Gold Plate (Meso Scale Diagnostics Inc.), покрытого стрептавидином планшета, добавляли 150 мкл блокирующего буфера SuperBlock в PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.), и планшет оставляли стоять в течение 1 ч для блокирования. Anti-Human Kappa Light chain Goat IgG Biotin (Monkey Absorbed) (IBL Inc.), меченное биотином антитело, разводили блокирующим буфером SuperBlock в PBS до 0,5 мкг/мл. Меченное SULFO антитело против человека I2S разводили в блокирующем буфере SuperBlock в PBS до 1,0 мкг/мл. Разведенные растворы меченного биотином антитела и меченного SULFO антитела, по 25 мкл каждого, смешивали с 25 мкл каждого образца, инкубировали в течение 1 ч для того, чтобы получать образец реакции антитела.

Каждую лунку планшета после блокирования промывали в 200 мкл PBS-T (Sigma Inc.), добавляли 25 мкл образца реакции антитела и инкубировали в течение 1 ч. После инкубации каждую лунку планшета промывали в 200 мкл PBS-T, в каждую лунку добавляли Read Buffer T (Meso scale Diagnostics Inc.) и измеряли количество люминесценции в каждой лунке на Sector™ Imager 6000 (Meso scale Diagnostics Inc.). Калибровочную кривую получали на измерениях стандартных образцов, содержащих известные концентрации I2S-антитела к hTfR, и определяли количество I2S-антитела к hTfR посредством интерполяции измерения каждого из образцов с привязкой к стандарту.

Помимо того, антитело против I2S человека, использованное выше, представляло собой моноклональное антитело, полученное посредством иммунизации мышей с использованием rhI2S в качестве антигена, которую получали в соответствии со стандартным способом, описанным в публикации международного патента (WO 2012/102998). Получали множество моноклональных антител. В качестве меченного SULFO антитела против I2S человека, антитело против I2S человека метили SULFO, используя MSD SULFO-TAG NHS-Ester (Meso scale Diagnostics Inc.) в соответствии с прилагаемым руководством.

Пример 21. Количественное определение hI2S посредством ECL.

В каждую лунку 96-луночного Streptavidin Gold Plate (Meso Scale Diagnostics Inc.), покрытого стрептавидином планшета, добавляли 150 мкл блокирующего буфера SuperBlock в PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) и планшет оставляли стоять в течение 1 ч для блокирования. Меченное биотином антитело против I2S человека разводили в блокирующем буфере SuperBlock в PBS до 0,5 мкг/мл. Меченное SULFO антитело против I2S человека разводили в блокирующем буфере SuperBlock в PBS до 1,0 мкг/мл. Разведенные растворы меченного биотином антитела и меченного SULFO антитела, по 25 мкл каждого, смешивали с 25 мкл каждого образца, инкубировали в течение 1 ч для того, чтобы получать образец реакции антитела.

Каждую лунку планшета после блокирования промывали с использованием 200 мкл PBS-T (Sigma Inc.), добавляли 25 мкл образца реакции антитела и инкубировали в течение 1 ч. После инкубации каждую лунку планшета промывали с использованием 200 мкл PBS-T, в каждую лунку добавляли Read Buffer T (Meso scale Diagnostics Inc.) и измеряли количество люминесценции в каждой лунке на Sector™ Imager 6000 (Meso scale Diagnostics Inc.). Калибровочную кривую получали на измерениях стандартных образцов, содержащих известные концентрации hI2S, и определяли количество rhI2S посредством интерполяции измерения каждого из образцов с привязкой к стандарту.

Помимо того, антитело против I2S человека, использованное выше, представляло собой монокло-

нальное антитело, полученное посредством иммунизации мышей с использованием rhI2S в качестве антигена, которую получали в соответствии со стандартным способом, описанным в публикации международного патента (WO 2012/102998). В качестве меченого SULFO антитела против I2S человека, антитело против I2S человека метили SULFO, используя MSD SULFO-TAG NHS-Ester (Meso scale Diagnostics Inc.) в соответствии с прилагаемым руководством. Кроме того, в качестве меченого биотином антитела против I2S человека, другое антитело против I2S человека, за исключением того, которое использовали для мечения с использованием SULFO, метили биотином, используя Biotin Labelling Kit-NH₂ (Dojindo Laboratories Inc.) в соответствии с прилагаемым руководством.

Пример 22. Оценка фармакологического эффекта I2S-антитела к hTfR.

Фармакологический эффект I2S-антитела к hTfR оценивали посредством измерения концентрации гликозаминогликанов (GAG), которые, как известно, накапливаются в органах пациентов с синдромом Хантера, у которых генетически отсутствует активность hI2S. Очищенный продукт I2S-антитела к hTfR 3, полученный в примере 17, внутривенно инъецировали мышам I2S-KO/hTfR-KI в дозе 0,5, 1,0 и 2,0 мг/кг (группа введения 0,5 мг/кг, группа введения 1,0 мг/кг и группа введения 2,0 мг/кг). Введение выполняли с частотой раз в неделю в течение четырех недель, мышей умерщвляли посредством кровопускания под анестезией через четыре недели после первого введения и иссекали головной мозг, печень, легкие и сердце. Затем иссеченные органы лиофилизировали в лиофилизаторе (EYELA Inc.), размельчали и измеряли их сухую массу. К 100 мг (сухой массы) каждого из высушенных препаратов органов добавляли 1 мл 0,5 М Tris буфера (pH 7,5) и осуществляли нагревание в течение 10 мин приблизительно при 100°C. Затем в сухой препарат добавляли раствор Actinase E (Kaken Pharmaceutical Inc.) так, чтобы 1 мг актиназы E добавлять к 50 мг (сухой массы) сухого препарата, смесь инкубировали в течение 16 ч приблизительно при 60°C, чтобы разлагался белок, и нагревание продолжали в течение 10 мин приблизительно при 100°C. После центрифугирования в течение 10 мин при 15000 об/мин собирали супернатант. Количество GAG, содержащихся в супернатанте, измеряли с использованием количественного набора Wieslab™ sGAG (Euro-Diagnostica Inc.) и вычисляли количество GAG, содержащихся в 1 г (г сухой массы) каждого органа. Помимо того, в качестве контрольной группы использовали мышей I2S-KO/hTfR-KI, которым не вводили I2S-антитело к hTfR. Одновременно измеряли количество GAG в органах мышей дикого типа. Этот эксперимент проводили с использованием трех мышей I2S-KO/hTfR-KI (самцы и самки в возрасте от 19 до 25 недель) в каждой группе измерения. Помимо того, использовали трех мышей дикого типа, самцов и самок в возрасте от 19 до 25 недель.

Результат представлен на фиг. 10. Наблюдали, что во всем головном мозге, печени, легких и сердце концентрация GAG значительно снижена, в зависимости от дозы, посредством введения I2S-антитела к hTfR (фиг. 10a-d).

В головном мозге концентрация GAG составляла приблизительно 2,66 мкг/г в тканях головного мозга контрольной группы, тогда как концентрация GAG в тканях головного мозга групп введения 0,5, 1,0 и 2,0 мг/кг составляла приблизительно 2,23 мкг/г, приблизительно 2,15 мкг/г, приблизительно 2,10 мкг/г, соответственно, что указывает на дозозависимое снижение (фиг. 10a). Аномальное количество GAG в тканях головного мозга мышей I2S-KO/hTfR-KI можно определять как составляющее приблизительно 0,90 мкг/г, т.е. количество, которое остается после вычитания концентрации GAG в тканях головного мозга мышей дикого типа (приблизительно 1,76 мкг/г) из концентрации GAG в тканях головного мозга контрольной группы (приблизительно 2,66 мкг/г). Таким образом, можно заключить, что приблизительно 48%, приблизительно 57% и приблизительно 62% GAG, аномально накопленных в тканях головного мозга мышей I2S-KO/hTfR-KI, разрушалось с помощью I2S-антитела к hTfR, вводимого в дозах 0,5, 1,0 и 2,0 мг/кг соответственно. Результат показывает, что возможно разрушать и удалять GAG, аномально накопленные в тканях головного мозга пациента с синдромом Хантера, посредством введения I2S-антитела к hTfR пациенту и что I2S-антитело к hTfR (в частности, I2S-антитело к hTfR 3) может предотвращать и лечить повреждения головного мозга, обусловленные накоплением и т.п. GAG или его фрагментов, которое наблюдают у пациентов с синдромом Хантера.

В печени концентрация GAG составляла приблизительно 10,3 мкг/г в ткани печени контрольной группы, тогда как концентрация GAG в ткани печени групп введения 0,5, 1,0 и 2,0 мг/кг составляла приблизительно 2,2 мкг/г, приблизительно 2,0 мкг/г, приблизительно 1,9 мкг/г, соответственно, что указывает на дозозависимое снижение (фиг. 10b). Аномальную часть количества GAG в ткани печени мышей I2S-KO/hTfR-KI можно определять как составляющую приблизительно 10 мкг/г, т.е. количество, которое остается после вычитания концентрации GAG в ткани печени мышей дикого типа (приблизительно 0,3 мкг/г) из концентрации GAG в ткани печени контрольной группы (приблизительно 10,3 мкг/г). Таким образом, можно заключить, что не меньше чем 80% GAG, аномально накопленных в ткани печени мышей I2S-KO/hTfR-KI, разрушали посредством введения I2S-антитела к hTfR в дозах от 0,5 до 2,0 мг/кг.

В легких концентрация GAG составляла приблизительно 10,5 мкг/г в ткани легких контрольной группы, тогда как концентрация GAG в ткани легких групп введения 0,5, 1,0 и 2,0 мг/кг составляла приблизительно 7,8 мкг/г, приблизительно 6,7 мкг/г, приблизительно 5,7 мкг/г соответственно, что указывает на дозозависимое снижение (фиг. 10c). Аномальную часть количества GAG в ткани легких мышей I2S-KO/hTfR-KI можно определять как составляющую приблизительно 9,0 мкг/г, т.е. количество, кото-

рое остается после вычитания концентрации GAG в ткани легких мышей дикого типа (приблизительно 1,5 мкг/г) из концентрации GAG в ткани легких контрольной группы (приблизительно 10,5 мкг/г). Таким образом, можно заключить, что приблизительно 30%, приблизительно 42% и приблизительно 53% GAG, аномально накопленных в ткани легких мышей I2S-KO/hTfR-KI, разрушались посредством введения I2S-антитела к hTfR в дозах 0,5, 1,0 и 2,0 мг/кг соответственно.

В сердце концентрация GAG составляла приблизительно 4,6 мкг/г в ткани сердца контрольной группы, тогда как концентрация GAG в ткани сердца группы введения 0,5, 1,0 и 2,0 мг/кг составляла приблизительно 2,2 мкг/г, приблизительно 2,0 мкг/г и приблизительно 1,5 мкг/г, соответственно, что указывает на дозозависимое снижение (фиг. 10d). Аномальную часть количества GAG в ткани сердца мышей I2S-KO/hTfR-KI можно определять как составляющую приблизительно 3,8 мкг/г, т.е. количество, которое остается после вычитания концентрации GAG в ткани сердца мышей дикого типа (приблизительно 0,8 мкг/г) из концентрации GAG в ткани сердца контрольной группы (приблизительно 4,6 мкг/г). Таким образом, можно заключить, что приблизительно 63%, приблизительно 70% и приблизительно 81% GAG, аномально накопленных в ткани сердца мышей I2S-KO/hTfR-KI, разрушались посредством введения I2S-антитела к hTfR в дозах 0,5, 1,0 и 2,0 мг/кг соответственно.

Приведенные выше результаты для печени, легких и сердца демонстрируют, что I2S-антитело к hTfR разрушает накопленные GAG не только в головном мозге, но также в других органах. Это указывает на то, что I2S-антитело к hTfR (в частности, I2S-антитело к hTfR 3), при введении пациентам с синдромом Хантера, в качестве фармацевтического средства при ферментной заместительной терапии, может восполнять фермент во всех органах пациента, включая головной мозг. Также показано, что I2S-антитело к hTfR может восполнять фермент во всех органах пациента, включая головной мозг, при его внутривенном введении.

Пример 23. Способ измерения GAG.

Измерение GAG, в целом, проводили следующим образом, используя количественный набор Wiselab™ sGAG (Euro-Diagnostica Inc.) в соответствии с прилагаемым руководством по эксплуатации. Образец или стандартный раствор (пустой или воду), по 50 мкл каждого, добавляли в 1,5 мл пробирку. В каждую пробирку добавляли 50 мкл раствора GuHCl и позволяли протекать реакции в течение 15 мин при комнатной температуре. Раствор SAT, 50 мкл, добавляли в каждую пробирку и позволяли протекать реакции в течение 15 мин при комнатной температуре. Получали смешанный раствор из воды/раствора SAT/стокового раствора альцианового синего (9/5/1), который добавляли в пробирки, в каждую по 750 мкл, и позволяли протекать реакции в течение 15 мин при комнатной температуре. Жидкую реакционную смесь, полученную таким образом, центрифугировали при $12500 \times g$ в течение 15 мин для того, чтобы удалять супернатант. В каждую пробирку добавляли 500 мкл DMSO, за чем следовало 15 мин встряхивание для смешивания при комнатной температуре, смесь центрифугировали для того, чтобы удалять супернатант. Раствор Gu-Prop добавляли в пробирки, по 500 мкл в каждую, и смешивали посредством встряхивания в течение 15 мин при комнатной температуре. Смешанный раствор, полученный таким образом, распределяли по лункам 96-луночного планшета, по 200 мкл в каждую, и измеряли поглощение лунок для каждой при 600 нм, используя считыватель планшетов. Калибровочную кривую получали для измерений растворов, содержащих известные концентрации GAG, и концентрации GAG определяли посредством интерполяции измерения каждого образца с привязкой к стандарту.

Пример 24. Получение слитых белков между гуманизированным антителом к hTfR и различными физиологически активными пептидами.

Эксперименты, которые осуществляли в приведенных выше примерах 1-22, показали, что I2S человека, соединенная с гуманизированным антителом к hTfR, проходит через гематоэнцефалический барьер, попадает в ткани головного мозга и проявляет активность I2S в головном мозге. После этого получали слитые белки между гуманизированным антителом к hTfR и различными физиологически активными пептидами, чтобы исследовать, проходят ли эти слитые белки через BBB и попадают ли в ткани головного мозга. Здесь выбирали эритропоэтин человека, арилсульфатазу А человека, PPT-1 человека, TPP-1 человека, α -L-идуронидазу человека, рецептор $\text{TNF}\alpha$ человека и N-сульфоглюкозаминсульфогидролазу человека (гепаран-N-сульфатазу) в качестве физиологически активных пептидов, подлежащих слиянию с гуманизированным антителом к hTfR. Экспрессирующие векторы, используемые для того, чтобы экспрессировать слитые белки между гуманизированным антителом к hTfR и физиологически активными пептидами, а также результирующие слитые белки получали в соответствии с приведенными далее примерами с 25 до 31.

Пример 25. Способ получения слитого белка между гуманизированным антителом к hTfR и эритропоэтином человека.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 258, которая содержала кДНК, кодирующую белок, состоящий из гуманизованного антитела к hTfR, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, и эритропоэтина человека (hEPO), имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 256 и соединенную через линкерную последовательность Gly-Ser на C-концевой стороне

тяжелой цепи антитела. Этот фрагмент ДНК кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 257, которая состоит из гуманизованного антитела к hTfR и hEPO, который соединен, через линкерную последовательность Gly-Ser, с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне. Фрагмент ДНК имеет на 5'-стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, действующий в качестве сигнала секреции, в этом порядке от 5'-конца, и последовательность NotI на 3'-стороне. Фрагмент ДНК расщепляли с использованием MluI и NotI и вставляли в вектор pE-нео между сайтами MluI и NotI для того, чтобы конструировать pE-нео(НС-hEPO).

Способом, описанным в примере 12, клетки CHO трансформировали с использованием pE-нео(НС-hEPO) и pE-hygr(LC3), которые конструировали в примере 11, получали клеточную линию, которая экспрессирует слитый белок между hEPO и гуманизованным антителом к hTfR. Клеточную линию обозначали как экспрессирующую hEPO-антитело к hTfR клеточную линию. Слитый белок между hEPO и гуманизованным антителом к hTfR, экспрессируемый этой клеточной линией, обозначали как EPO-антитело к hTfR.

Клетки экспрессирующей hEPO-антитело к hTfR клеточной линии разводили до плотности приблизительно 2×10^5 клеток/мл средой CD OptiCHO™, и 200 мл клеточной суспензии добавляли в 1 л коническую колбу и культивировали в течение от 6 до 7 суток во влажной среде при 37°C, 5% CO₂, 95% воздуха, при перемешивании со скоростью приблизительно 70 об/мин. Среду для культивирования собирали посредством центрифугирования и фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) для того, чтобы получать культуральный супернатант. В культуральный супернатант, собранный таким образом, добавляли пять объемов колонки 20 mM Tris буфера (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl, и загружали на колонку с белком А (объем колонки 1: мл, Bio-Rad Inc.), которую предварительно уравнивали с использованием трех объемов колонки буфера 20 mM Tris (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl. Затем подавали пять объемов колонки того же буфера для того, чтобы промывать колонку, адсорбированный EPO-anti-hTfR элюировали четырьмя объемами колонки 50 mM глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 mM NaCl. Элюат, содержащий EPO-антитело к hTfR, корректировали до pH 7,0 с использованием 1 M буфера Tris (pH 8,0) и затем буфер заменяли на PBS, используя мембрану Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.). Получаемый раствор использовали в качестве очищенного продукта EPO-антитела к hTfR.

Пример 26. Способ получения слитого белка между гуманизованным антителом к hTfR и арилсульфатазой А человека.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 261, которая содержала кДНК, кодирующую белок, состоящий из гуманизованного антитела к hTfR, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, и арилсульфатазы А человека (hARSA), имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 259 и соединенную, через линкерную последовательность Gly-Ser, с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне. Этот фрагмент ДНК кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 260, которая состоит из гуманизованного антитела к hTfR и hARSA, которая соединена, через линкерную последовательность Gly-Ser, с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне. Фрагмент ДНК имеет на 5'-стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, действующий в качестве сигнала секреции, в этом порядке от 5'-конца, и последовательность NotI на 3'-стороне. Фрагмент ДНК расщепляли с использованием MluI и NotI и вставляли в вектор pE-нео между сайтами MluI и NotI для того, чтобы конструировать pE-нео(НС-hARSA).

Способом, описанным в примере 12, клетки CHO трансформировали с использованием pE-нео(НС-hARSA) и pE-hygr(LC3), которые конструировали в примере 11, получали клеточную линию, которая экспрессирует слитый белок между hARSA и гуманизованным антителом к hTfR. Клеточную линию обозначали как экспрессирующую hARSA-антитело к hTfR клеточную линию. Слитый белок между hARSA и гуманизованным антителом к hTfR, экспрессируемый этой клеточной линией, обозначали как ARSA-антитело к hTfR.

Клетки экспрессирующей hARSA-антитело к hTfR клеточной линии разводили до плотности приблизительно 2×10^5 клеток/мл средой CD OptiCHO™, и 200 мл клеточной суспензии добавляли в 1 л коническую колбу и культивировали в течение от 6 до 7 суток во влажной среде при 37°C, 5% CO₂, 95% воздуха, при перемешивании со скоростью приблизительно 70 об/мин. Среду для культивирования собирали посредством центрифугирования и фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) для того, чтобы получать культуральный супернатант. В культуральный супернатант, собранный таким образом, добавляли пять объемов колонки 20 mM Tris буфера (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl, и загружали на колонку с белком А (объем колонки: 1 мл, Bio-Rad Inc.), которую предварительно уравнивали с использованием трех объемов колонки буфера 20 mM Tris (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl. Затем подавали пять объемов колонки того же буфера для того, чтобы промывать колонку, адсорбированный ARSA-anti-hTfR элюировали четырьмя объемами колонки 50 mM глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 mM NaCl. Элюат, содержащий ARSA-антитело к hTfR, корректировали до pH 7,0 с использованием 1 M буфера Tris (pH 8,0) и затем буфер заменяли на PBS, используя мембрану Amicon Ultra 30

kDa (Millipore Inc.). Получаемый раствор использовали в качестве очищенного продукта ARSA-антитела к hTfR.

Пример 27. Способ получения слитого белка между гуманизированным антителом к hTfR и PPT-1 человека.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 264, которая содержала кДНК, кодирующую белок, состоящий из гуманизованного антитела к hTfR, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, и PPT-1 человека (hPPT-1), имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 262 и соединенную, через линкерную последовательность Gly-Ser, с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне. Этот фрагмент ДНК кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 263, которая состоит из гуманизованного антитела к hTfR и hPPT-1, которую соединяют, через линкерную последовательность Gly-Ser, с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне. Фрагмент ДНК имеет на 5'-стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, действующий в качестве сигнала секреции, в этом порядке от 5'-конца, и последовательность NotI на 3'-стороне. Фрагмент ДНК расщепляли с использованием MluI и NotI и вставляли в вектор pE-neo между сайтами MluI и NotI для того, чтобы конструировать pE-neo(НС-hPPT-1).

Способом, описанным в примере 12, клетки CHO трансформировали с использованием pE-neo(НС-hPPT-1) и pE-hygr(LC3), которые конструировали в примере 11, получали клеточную линию, которая экспрессирует слитый белок между hPPT-1 и гуманизированным антителом к hTfR. Клеточную линию обозначали как экспрессирующую hPPT-1-антитело к hTfR клеточную линию. Слитый белок между hPPT-1 и гуманизированным антителом к hTfR, экспрессируемый этой клеточной линией, обозначали как PPT-1-антитело к hTfR.

Клетки экспрессирующей hPPT-1-антитело к hTfR клеточной линии разводили до плотности приблизительно 2×10^5 клеток/мл средой CD OptiCHO™, и 200 мл клеточной суспензии добавляли в 1 л коническую колбу и культивировали в течение от 6 до 7 суток во влажной среде при 37°C, 5% CO₂, 95% воздуха, при перемешивании со скоростью приблизительно 70 об/мин. Среду для культивирования собирали посредством центрифугирования и фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) для того, чтобы получать культуральный супернатант. В культуральный супернатант, собранный таким образом, добавляли пять объемов колонки 20 mM Tris буфера (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl, и загружали на колонку с белком А (объем колонки: 1 мл, Bio-Rad Inc.), которую предварительно уравнивали с использованием трех объемов колонки буфера 20 mM Tris (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl. Затем подавали пять объемов колонки того же буфера для того, чтобы промывать колонку, адсорбированный PPT-1-anti-hTfR элюировали четырьмя объемами колонки 50 mM глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 mM NaCl. Элюат, содержащий PPT-1-антитело к hTfR, корректировали до pH 7,0 с использованием 1 M буфера Tris (pH 8,0) и затем буфер заменяли на PBS, используя мембрану Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.). Получаемый раствор использовали в качестве очищенного продукта PPT-1-антитела к hTfR.

Пример 28. Способ получения слитого белка между гуманизированным антителом к hTfR и TPP-1 человека.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 267, которая содержала кДНК, кодирующую белок, состоящий из гуманизованного антитела к hTfR, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, и TPP-1 человека (hTPP-1), имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 265 и соединенную, через линкерную последовательность Gly-Ser, с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне. Этот фрагмент ДНК кодирует слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 266, которая состоит из гуманизованного антитела к hTfR и hTPP-1, которая соединена, через линкерную последовательность Gly-Ser, с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне. Фрагмент ДНК имеет на 5'-стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, действующий в качестве сигнала секреции, в этом порядке от 5'-конца, и последовательность NotI на 3'-стороне. Фрагмент ДНК расщепляли с использованием MluI и NotI и вставляли в вектор pE-neo между сайтами MluI и NotI для того, чтобы конструировать pE-neo(НС-hTPP-1).

Способом, описанным в примере 12, клетки CHO трансформировали с использованием pE-neo(НС-hTPP-1) и pE-hygr(LC3), которые конструировали в примере 11, получали клеточную линию, которая экспрессирует слитый белок между hTPP-1 и гуманизированным антителом к hTfR. Клеточную линию обозначали как экспрессирующую hTPP-1-антитело к hTfR клеточную линию. Слитый белок между hTPP-1 и гуманизированным антителом к hTfR, экспрессируемый этой клеточной линией, обозначали как TPP-1-антитело к hTfR.

Клетки экспрессирующей hTPP-1-антитело к hTfR клеточной линии разводили до плотности приблизительно 2×10^5 клеток/мл средой CD OptiCHO™, и 200 мл клеточной суспензии добавляли в 1 л коническую колбу и культивировали в течение от 6 до 7 суток во влажной среде при 37°C, 5% CO₂, 95% воздуха, при перемешивании со скоростью приблизительно 70 об/мин. Среду для культивирования соби-

рали посредством центрифугирования и фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) для того, чтобы получать культуральный супернатант. В культуральный супернатант, собранный таким образом, добавляли пять объемов колонки 20 mM Tris буфера (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl, и загружали на колонку с белком А (объем колонки: 1 мл, Bio-Rad Inc.), которую предварительно уравнивали с использованием трех объемов колонки буфера 20 mM Tris (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl. Затем подавали пять объемов колонки того же буфера для того, чтобы промывать колонку, адсорбированный TPP-1-anti-hTfR элюировали четырьмя объемами колонки 50 mM глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 mM NaCl. Элюат, содержащий TPP-1-антитело к hTfR, корректировали до pH 7,0 с использованием 1 М буфера Tris (pH 8,0) и затем буфер заменяли на PBS, используя мембрану Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.). Получаемый раствор использовали в качестве очищенного продукта TPP-1-антитела к hTfR.

Пример 29. Способ получения слитого белка между гуманизированным антителом к hTfR и α -L-идурунидазой человека.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 270, которая содержала кДНК, кодирующую белок, состоящий из гуманизованного антитела к hTfR, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, и α -L-идурунидазы человека (hIDUA), имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 268 и соединенную, через линкерную последовательность Gly-Ser, с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне. Этот фрагмент ДНК кодирует слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 269, которая состоит из гуманизованного антитела к hTfR и hIDUA, которая соединена, через линкерную последовательность Gly-Ser, с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне. Фрагмент ДНК имеет на 5'-стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, действующий в качестве сигнала секреции, в этом порядке от 5'-конца, и последовательность NotI на 3'-стороне. Фрагмент ДНК расщепляли с использованием MluI и NotI, и вставляли в вектор pE-neo между сайтами MluI и NotI для того, чтобы конструировать pE-neo(НС-hIDUA).

Способом, описанным в примере 12, клетки CHO трансформировали с использованием pE-neo(НС-hIDUA) и pE-hygr(LC3), которые конструировали в примере 11, получали клеточную линию, которая экспрессирует слитый белок между hIDUA и гуманизированным антителом к hTfR. Клеточную линию обозначали как экспрессирующую hIDUA-антитело к hTfR клеточную линию. Слитый белок между hIDUA и гуманизированным антителом к hTfR, экспрессируемый этой клеточной линией, обозначали как IDUA-антитело к hTfR.

Клетки экспрессирующей hIDUA-антитело к hTfR клеточной линии разводили до плотности приблизительно 2×10^5 клеток/мл средой CD OptiCHO™, и 200 мл клеточной суспензии добавляли в 1 л коническую колбу и культивировали в течение от 6 до 7 суток во влажной среде при 37°C, 5% CO₂, 95% воздуха, при перемешивании со скоростью приблизительно 70 об/мин. Среду для культивирования собирали посредством центрифугирования и фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) для того, чтобы получать культуральный супернатант. В культуральный супернатант, собранный таким образом, добавляли пять объемов колонки 20 mM Tris буфера (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl, и загружали на колонку с белком А (объем колонки: 1 мл, Bio-Rad Inc.), которую предварительно уравнивали с использованием трех объемов колонки буфера 20 mM Tris (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl. Затем подавали пять объемов колонки того же буфера для того, чтобы промывать колонку, адсорбированный IDUA-anti-hTfR элюировали четырьмя объемами колонки 50 mM глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 mM NaCl. Элюат, содержащий IDUA-антитело к hTfR, корректировали до pH 7,0 с использованием 1 М буфера Tris (pH 8,0) и затем буфер заменяли на PBS, используя мембрану Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.). Получаемый раствор использовали в качестве очищенного продукта IDUA-антитела к hTfR.

Пример 30. Способ получения слитого белка между гуманизированным антителом к hTfR и рецептором TNF α человека.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 273, которая содержала кДНК, кодирующую белок, состоящий из гуманизованного антитела к hTfR, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, и рецептора TNF α человека (hTNF α R), имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 271 и соединенную, через линкерную последовательность Gly-Ser, с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне. Этот фрагмент ДНК кодирует слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 272, которая состоит из гуманизованного антитела к hTfR и hTNF α R, который соединяют, через линкерную последовательность Gly-Ser, с тяжелой цепью антитела на С-концевой стороне. Фрагмент ДНК имеет на 5'-стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, действующий в качестве сигнала секреции, в этом порядке от 5'-конца, и последовательность NotI на 3'-стороне. Фрагмент ДНК расщепляли с использованием MluI и NotI, и вставляли в вектор pE-neo между сайтами MluI и NotI для того, чтобы конструировать pE-neo(НС-hTNF α R).

Способом, описанным в примере 12, клетки CHO трансформировали с использованием pE-neo(НС-

hTNF α R) и pE-hygr(LC3), которые конструировали в примере 11, получали клеточную линию, которая экспрессирует слитый белок между hTNF α R и гуманизированным антителом к hTfR. Клеточную линию обозначали как экспрессирующую hTNF α R-антитело к hTfR клеточную линию. Слитый белок между hTNF α R и гуманизированным антителом к hTfR, экспрессируемый этой клеточной линией, обозначали как TNF α R-антитело к hTfR.

Клетки экспрессирующей hTNF α R-антитело к hTfR клеточной линии разводили до плотности приблизительно 2×10^5 клеток/мл средой CD OptiCHO™, и 200 мл клеточной суспензии добавляли в 1 л коническую колбу и культивировали в течение от 6 до 7 суток во влажной среде при 37°C, 5% CO₂, 95% воздуха, при перемешивании со скоростью приблизительно 70 об/мин. Среду для культивирования собирали посредством центрифугирования и фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) для того, чтобы получать культуральный супернатант. В культуральный супернатант, собранный таким образом, добавляли пять объемов колонки 20 mM Tris буфера (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl, и загружали на колонку с белком A (объем колонки: 1 мл, Bio-Rad Inc.), которую предварительно уравнивали с использованием трех объемов колонки буфера 20 mM Tris (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl. Затем подавали пять объемов колонки того же буфера для того, чтобы промывать колонку, адсорбированный hTNF α R-anti-hTfR элюировали четырьмя объемами колонки 50 mM глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 mM NaCl. Элюат, содержащий TNF α R-антитело к hTfR, корректировали до pH 7,0 с использованием 1 M буфера Tris (pH 8,0) и затем буфер заменяли на PBS, используя мембрану Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.). Получаемый раствор использовали в качестве очищенного продукта TNF α R-антитела к hTfR.

Пример 31. Способ получения слитого белка между гуманизированным антителом к hTfR и гепаран-N-сульфатазой человека.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 276, которая содержала кДНК, кодирующую белок, состоящий из гуманизованного антитела к hTfR, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, и гепаран-N-сульфатазы человека (hSGSH), имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 274 и соединенную, через линкерную последовательность Gly-Ser, с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне. Этот фрагмент ДНК кодирует слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 275, которая состоит из гуманизованного антитела к hTfR и hSGSH, которую соединяют, через линкерную последовательность Gly-Ser, с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне. Фрагмент ДНК имеет на 5'-стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, действующий в качестве сигнала секреции, в этом порядке от 5'-конца, и последовательность NotI на 3'-стороне. Фрагмент ДНК расщепляли с использованием MluI и NotI, и вставляли в вектор pE-neo между сайтами MluI и NotI для того, чтобы конструировать pE-neo(НС-hSGSH).

Способом, описанным в примере 12, клетки CHO трансформировали с использованием pE-neo(НС-hSGSH) и pE-hygr(LC3), которые конструировали в примере 11, получали клеточную линию, которая экспрессирует слитый белок между hSGSH и гуманизированным антителом к hTfR. Клеточную линию обозначали как экспрессирующую hSGSH-антитело к hTfR клеточную линию. Слитый белок между hSGSH и гуманизированным антителом к hTfR, экспрессируемый этой клеточной линией, обозначали как SGSH-антитело к hTfR.

Клетки экспрессирующей hSGSH-антитело к hTfR клеточной линии разводили до плотности приблизительно 2×10^5 клеток/мл средой CD OptiCHO™, и 200 мл клеточной суспензии добавляли в 1 л коническую колбу и культивировали в течение от 6 до 7 суток во влажной среде при 37°C, 5% CO₂, 95% воздуха, при перемешивании со скоростью приблизительно 70 об/мин. Среду для культивирования собирали посредством центрифугирования и фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) для того, чтобы получать культуральный супернатант. В культуральный супернатант, собранный таким образом, добавляли пять объемов колонки 20 mM Tris буфера (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl, и загружали на колонку с белком A (объем колонки: 1 мл, Bio-Rad Inc.), которую предварительно уравнивали с использованием трех объемов колонки буфера 20 mM Tris (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl. Затем подавали пять объемов колонки того же буфера для того, чтобы промывать колонку, адсорбированный SGSH-anti-hTfR элюировали четырьмя объемами колонки 50 mM глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 mM NaCl. Элюат, содержащий SGSH-антитело к hTfR, корректировали до pH 7,0 с использованием 1 M буфера Tris (pH 8,0) и затем буфер заменяли на PBS, используя мембрану Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.). Получаемый раствор использовали в качестве очищенного продукта SGSH-антитела к hTfR.

Пример 32. Оценка переноса слитых белков между гуманизированным антителом к hTfR и различными физиологически активными пептидами в головной мозг.

Каждый очищенный продукт из EPO-антитела к hTfR, ARSA-антитела к hTfR, PPT-1-антитела к hTfR, TPP-1-антитела к hTfR, IDUA-антитела к hTfR, TNF α R-антитела к hTfR и SGSH-антитела к hTfR, полученных в примерах с 25 до 31, соответственно, внутривенно вводили один раз мышам hTfR-KI в дозе 3 мг/кг. В качестве контроля, препарат иммуноглобулина человека (Benesis: иммуноглобулин человека

для внутримышечной инъекции, Mitsubishi Tanabe Pharma Inc.) внутривенно инъецировали один раз мыши hTfR-KI (в возрасте от 17 до 28 недель) в дозе 3 мг/кг. Одну мышью hTfR-KI (самку в возрасте от 17 до 28 недель) использовали для введения каждого из слитых белков и контроля.

Через 8 ч после внутривенной инъекции каждую мышшь подвергали орошению всего организма физиологическим раствором и затем после орошения иссекали их ткани головного мозга. Затем иссеченные ткани головного мозга гомогенизировали с использованием T-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.), содержащего Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Inc.), и после центрифугирования собирали супернатант. Концентрацию слитого белка, содержащегося в собранном супернатанте гомогената измеряли с помощью следующего способа. Помимо того, использованное меченное биотином поликлональное антитело козы против Fc IgG человека получали посредством мечения биотином поликлонального антитела козы против Fc IgG человека (Bethyl Inc.) с использованием Biotin Labelling Kit-NH₂ (Dojindo Laboratories Inc.) в соответствии с прилагаемым руководством.

Кроме того, использованное меченное SULFO поликлональное антитело козы против Fc IgG человека получали посредством мечения SULFO поликлонального антитела козы против Fc IgG человека (Bethyl Inc.) с использованием MSD SULFO-TAG NHS-Ester (Meso scale Diagnostics Inc.) в соответствии с прилагаемым руководством.

В каждую лунку 96-луночного Streptavidin Gold Plate (Meso scale Diagnostics Inc.) добавляли 150 мкл блокирующего буфера SuperBlock в PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) и оставляли стоять в течение 1 ч при комнатной температуре для блокирования планшета. Меченное биотином поликлональное антитело козы против Fc IgG человека разводили до 0,5 мкг/мл блокирующим буфером SuperBlock в PBS. Меченное SULFO поликлональное антитело козы против Fc IgG человека разводили до 1,0 мкг/мл блокирующим буфером SuperBlock в PBS. Разведенные растворы меченного биотином антитела и меченного SULFO антитела, по 25 мкл каждого, смешивали с 25 мкл каждого образца и инкубировали в течение 1 ч для того, чтобы получать образцы для реакции антител.

Затем каждую лунку заблокированного планшета промывали с использованием 200 мкл PBS-T (Sigma Inc.), в лунку добавляли 25 мкл образца для реакции антител и инкубировали в течение 1 ч. После инкубации каждую лунку планшета промывали с использованием 200 мкл PBS-T, добавляли Read Buffer T (Meso scale Diagnostics Inc.) и в каждой лунке измеряли количество люминесценции на Sector™ Imager 6000 (Meso scale Diagnostics Inc.). Количество слитого белка, содержащегося на один грамм тканей головного мозга (г влажной массы) (концентрацию слитого белка в тканях головного мозга) вычисляли посредством получения калибровочной кривой на измерениях стандартных образцов, содержащих известные концентрации образца, и последующей интерполяции измерения каждого из образцов с привязкой к стандарту. Результат представлен в табл. 13.

Когда концентрацию иммуноглобулина человека, контрольного, в тканях головного мозга брали в качестве единичного значения, относительные значения концентрации EPO-антитела к hTfR, ARSA-антитела к hTfR, PPT-1-антитела к hTfR, TPP-1-антитела к hTfR, IDUA-антитела к hTfR, TNF α R-антитела к hTfR и SGSN-антитела к hTfR в тканях головного мозга составляли 4,33, 3,39, 4,87, 6,48, 5,62, 7,44 и 2,24, соответственно, что показывает, что эти физиологически активные пептиды, соединенные с антителом к hTfR, активно переносились в ткани головного мозга. Результат, таким образом, указывает на то, что эти физиологически активные белки, которые обычно не проходят через гематоэнцефалический барьер, можно заставить проходить через гематоэнцефалический барьер и попадать в ткани головного мозга посредством слияния их с антителом к hTfR.

Таким образом, вышеприведенные результаты показывают, что EPO-антитело к hTfR можно использовать в качестве терапевтического средства для ишемии головного мозга, ARSA-антитело к hTfR, арилсульфатазу А в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при метахроматической дегенерации белого вещества (метахроматической лейкодистрофии), PPT-1-антитело к hTfR в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при неврональном цероид-липофусцинозе или болезни Сантавуори-Халтия, TPP-1-антитело к hTfR в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при неврональном цероид-липофусцинозе или болезни Янского-Бильшовского, IDUA-антитело к hTfR в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при синдроме Гурлера или синдроме Гурлера-Шейе, SGSN-антитело к hTfR в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при синдроме Санфилиппо, IDUA-антитело к hTfR в качестве терапевтического средства для нарушений центральной нервной системы при синдроме Гурлера или синдроме Гурлера-Шейе и TNF α R-антитело к hTfR в качестве терапевтического средства для ишемии головного мозга и энцефалите. Помимо того, вышеприведенные результаты также показывают, что физиологически активные белки, представляющие интерес, которые обычно не проходят через гематоэнцефалический барьер, можно заставить проходить через гематоэнцефалический барьер и попадать в ткани головного мозга, посредством слияния их с антителом к hTfR.

Таблица 13

Концентрация слитых белков в тканях головного мозга (мкг/г влажной массы)

Слитый белок	Концентрация	Количество относительно контроля
Контроль	0.0199	1
EPO-антитело к hTfR	0.0862	4.33
ARSA-антитело к hTfR	0.0675	3.39
PPT-1-антитело к hTfR	0.0970	4.87
TRP-1-антитело к hTfR	0.129	6.48
IDUA-1-антитело к hTfR	0.112	5.62
TNF α R-антитело к hTfR	0.148	7.44
SGSH-антитело к hTfR	0.0445	2.24

Промышленная применимость

Антитело к hTfR по настоящему изобретению, когда слито с физиологически активными белками, низкомолекулярными соединениями и т.п., представляющим интерес, может делать их способными проходить через гематоэнцефалический барьер, и, следовательно, является высоко эффективным для обеспечения средства доставки физиологически активных белков в головной мозг, низкомолекулярных соединений и т.п., которые должны действовать в центральной нервной системе.

Список ссылочных позиций

- 1 - кровеносный сосуд;
- 2 - паренхима головного мозга;
- 3 - нейроноподобные клетки;
- 4 - клетки Пуркинью.

Список последовательностей произвольным текстом

- SEQ ID NO: 3: аминокислотная последовательность образцового линкера 1.
 SEQ ID NO: 4: аминокислотная последовательность образцового линкера 2.
 SEQ ID NO: 5: аминокислотная последовательность образцового линкера 3.
 SEQ ID NO: 6: аминокислотная последовательность 1 для CDR1 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 1.
 SEQ ID NO: 7: аминокислотная последовательность 2 для CDR1 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 1.
 SEQ ID NO: 8: аминокислотная последовательность 1 для CDR2 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 1.
 SEQ ID NO: 9: аминокислотная последовательность 2 для CDR2 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 1.
 SEQ ID NO: 10: аминокислотная последовательность для CDR3 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 1.
 SEQ ID NO: 11: аминокислотная последовательность 1 для CDR1 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 2.
 SEQ ID NO: 12: аминокислотная последовательность 2 для CDR1 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 2.
 SEQ ID NO: 13: аминокислотная последовательность 1 для CDR2 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 2.
 SEQ ID NO: 14: аминокислотная последовательность 2 для CDR2 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 2.
 SEQ ID NO: 15: аминокислотная последовательность для CDR3 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 2.
 SEQ ID NO: 16: аминокислотная последовательность 1 для CDR1 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 3.
 SEQ ID NO: 17: аминокислотная последовательность 2 для CDR1 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 3.
 SEQ ID NO: 18: аминокислотная последовательность 1 для CDR2 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 3.
 SEQ ID NO: 19: аминокислотная последовательность 2 для CDR2 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 3.
 SEQ ID NO: 20: аминокислотная последовательность для CDR3 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 3.
 SEQ ID NO: 21: аминокислотная последовательность 1 для CDR1 в легкой цепи антитела мыши к hTfR № 4.

мышь к hTfR № 9.

SEQ ID NO: 235: аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела мышь к hTfR № 9.

SEQ ID NO: 236: аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела мышь к hTfR № 10.

SEQ ID NO: 237: аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела мышь к hTfR № 10.

SEQ ID NO: 238: аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела мышь к hTfR № 11.

SEQ ID NO: 239: аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела мышь к hTfR № 11.

SEQ ID NO: 240: аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела мышь к hTfR № 12.

SEQ ID NO: 241: аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела мышь к hTfR № 12.

SEQ ID NO: 242: аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела мышь к hTfR № 13.

SEQ ID NO: 243: аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела мышь к hTfR № 13.

SEQ ID NO: 244: аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела мышь к hTfR № 14.

SEQ ID NO: 245: аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела мышь к hTfR № 14.

SEQ ID NO: 247: аминокислотная последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 1 (гуманизованная 6) и hI2S.

SEQ ID NO: 248: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 1 (гуманизованная 6) и hI2S, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 249: аминокислотная последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 2 (гуманизованная 6) и hI2S.

SEQ ID NO: 250: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 2 (гуманизованная 6) и hI2S, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 251: аминокислотная последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизованная 2) и hI2S, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 252: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизованная 2) и hI2S, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 253: нуклеотидная последовательность ДНК, в которой ген устойчивости к неомицину, фланкированный последовательностями loxP, помещали на 3'-стороне кДНК в кДНК, кодирующей химерный hTfR, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 254: нуклеотидная последовательность 5'-плеча направленного вектора, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 255: нуклеотидная последовательность 3'-плеча направленного вектора, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 257: аминокислотная последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизованная 2) и hEPO.

SEQ ID NO: 258: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизованная 2) и hEPO, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 260: аминокислотная последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизованная 2) и hARSA.

SEQ ID NO: 261: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизованная 2) и hARSA, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 263: аминокислотная последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизованная 2) и hPPT-1.

SEQ ID NO: 264: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизованная 2) и hPPT-1, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 266: аминокислотная последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизованная 2) и hPPP-1.

SEQ ID NO: 267: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизированная 2) и hTPP-1, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 269: аминокислотная последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизированная 2) и hIDUA.

SEQ ID NO: 270: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизированная 2) и hIDUA, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 272: аминокислотная последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизированная 2) и hTNF α R.

SEQ ID NO: 273: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR α № 3 (гуманизированная 2) и hTNF α R, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 275: аминокислотная последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизированная 2) и hSGSH.

SEQ ID NO: 276: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность слитого белка тяжелой цепи антитела к hTfR № 3 (гуманизированная 2) и hSGSH, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 277: аминокислотная последовательность одноцепочечного антитела к hTfR.

SEQ ID NO: 278: аминокислотная последовательность 2 для CDR2 в тяжелой цепи антитела мыши к hTfR № 6.

SEQ ID NO: 279: аминокислотная последовательность 2 для CDR2 в тяжелой цепи антитела мыши к hTfR № 8.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17, в качестве CDR1, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19, или аминокислотную последовательность Lys-Val-Ser в качестве CDR2 и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, в качестве CDR3; и переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89, в качестве CDR1, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90 или SEQ ID NO: 91, в качестве CDR2 и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 93, в качестве CDR3.

2. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором:

(а) аминокислотная последовательность каждой из CDR1, CDR2 и CDR3 имеет гомологию не ниже 80% с аминокислотной последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с п.1; или

(б) аминокислотная последовательность каждой из CDR1, CDR2 и CDR3 имеет гомологию не ниже 90% с аминокислотной последовательностью CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с п.1.

3. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 191, и в котором переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 205.

4. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором его переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 193; и в котором его переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 205.

5. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором его легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 196; и в котором его тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210.

6. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающее гомологией не ниже 80% с антителом к рецептору трансферрина человека по любому из пп.3-5 для аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи и аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи.

7. Антитело к рецептору трансферрина человека, обладающее гомологией не ниже 90% с антителом к рецептору трансферрина человека по любому из пп.3-5 для аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи и аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи.

8. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, в котором аминокислотные последовательности переменной области легкой цепи антитела и переменной области тяжелой цепи антитела выбраны из (1) или (2):

(1) вариабельная область легкой цепи, имеющая гомологию не ниже чем 80% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 191 и содержащая аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 16 в качестве CDR1, аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 18 в качестве CDR2, и аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20 в качестве CDR3, и

вариабельная область тяжелой цепи, имеющая гомологию не ниже чем 80% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 205 и содержащая аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 88 в качестве CDR1, аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 90 в качестве CDR2, и аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 92 в качестве CDR3;

(2) вариабельная область легкой цепи, имеющая гомологию не ниже чем 80% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 191 и содержащая аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 16 в качестве CDR1, аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 18 в качестве CDR2, и аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20 в качестве CDR3, и

вариабельная область тяжелой цепи, имеющая гомологию не ниже чем 80% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 205 и содержащая аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 89 в качестве CDR1, аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 90 в качестве CDR2, и аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 92 в качестве CDR3.

9. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, в котором аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи антитела и вариабельной области тяжелой цепи антитела выбраны из (1) или (2):

(1) вариабельная область легкой цепи, имеющая гомологию не ниже чем 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 191 и содержащая аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 16 в качестве CDR1, аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 18 в качестве CDR2, и аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20 в качестве CDR3, и

вариабельная область тяжелой цепи, имеющая гомологию не ниже чем 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 205 и содержащая аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 88 в качестве CDR1, аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 90 в качестве CDR2, и аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 92 в качестве CDR3;

(2) вариабельная область легкой цепи, имеющая гомологию не ниже чем 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 191 и содержащая аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 16 в качестве CDR1, аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 18 в качестве CDR2, и аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20 в качестве CDR3, и

вариабельная область тяжелой цепи, имеющая гомологию не ниже чем 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 205 и содержащая аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 89 в качестве CDR1, аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 90 в качестве CDR2, и аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 92 в качестве CDR3.

10. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, где антитело имеет аффинность как ко внеклеточной области рецептора трансферрина человека, так и ко внеклеточной области рецептора трансферрина обезьяны.

11. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.10, в котором константа диссоциации его комплекса со внеклеточной областью рецептора трансферрина человека не превышает 1×10^{-8} М и константа диссоциации его комплекса со внеклеточной областью рецептора трансферрина обезьяны не превышает 5×10^{-8} М.

12. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')₂ или F(ab').

13. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, где антитело представляет собой одноцепочечное антитело, выбранное из группы, состоящей из scFab, scF(ab'), scF(ab')₂ и scFv.

14. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, в котором его легкую цепь и тяжелую цепь соединяют через линкерную последовательность.

15. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, в котором тяжелую цепь соединяют, через линкерную последовательность, с легкой цепью на ее С-концевой стороне.

16. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, в

котором легкую цепь соединяют, через линкерную последовательность, с тяжелой цепью на ее С-концевой стороне.

17. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.14-16, в котором линкерная последовательность состоит из от 8 до 50 аминокислотных остатков.

18. Антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.17, в котором линкерную последовательность выбирают из группы, состоящей из аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly, аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, и аминокислотной последовательности, состоящей из трех последовательно соединенных аминокислотных последовательностей, каждая приведена в SEQ ID NO: 3.

19. Слитый белок, содержащий антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18 и аминокислотную последовательность другого белка (А), соединенную с легкой цепью антитела на ее С-концевой стороне или N-концевой стороне, где другой белок (А) представляет собой белок, который должен попадать внутрь головного мозга и проявлять свою функцию в мозге.

20. Слитый белок по п.19, в котором другой белок (А) представляет собой белок, от которого нельзя ожидать функционирования в головном мозге при простом внутривенном введении.

21. Слитый белок, содержащий антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент и другой белок (А), в котором антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18 и в котором другой белок (А) соединяют с легкой цепью антитела к рецептору трансферрина человека на ее С-концевой стороне или N-концевой стороне, и где другой белок (А) представляет собой белок, который должен попадать внутрь головного мозга и проявлять свою функцию в мозге.

22. Слитый белок по п.21, в котором другой белок (А) представляет собой белок, от которого нельзя ожидать функционирования в головном мозге при простом внутривенном введении.

23. Слитый белок по любому из пп.19-22, в котором другой белок (А) соединяют, через линкерную последовательность, с легкой цепью на ее С-концевой стороне или N-концевой стороне.

24. Слитый белок по п.23, в котором линкерная последовательность состоит из от 1 до 50 аминокислотных остатков.

25. Слитый белок по п.24, в котором линкерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих от 1 до 10 из них, которые последовательно соединены.

26. Слитый белок, содержащий антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18 и аминокислотную последовательность другого белка (А), соединенную с тяжелой цепью антитела на ее С-концевой стороне или N-концевой стороне, где другой белок (А) представляет собой белок, который должен попадать внутрь головного мозга и проявлять свою функцию в мозге.

27. Слитый белок по п.26, в котором другой белок (А) представляет собой белок, от которого нельзя ожидать функционирования в головном мозге при простом внутривенном введении.

28. Слитый белок, содержащий антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент и другой белок (А), в котором антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18 и в котором другой белок (А) соединяют с тяжелой цепью антитела к рецептору трансферрина человека на ее С-концевой стороне или N-концевой стороне, и где другой белок (А) представляет собой белок, который должен попадать внутрь головного мозга и проявлять свою функцию в мозге.

29. Слитый белок по п.28, в котором другой белок (А) представляет собой белок, от которого нельзя ожидать функционирования в головном мозге при простом внутривенном введении.

30. Слитый белок по любому из пп.26-29, в котором другой белок (А) соединяют, через линкерную последовательность, с тяжелой цепью на ее С-концевой стороне или N-концевой стороне.

31. Слитый белок по п.30, в котором линкерная последовательность состоит из от 1 до 50 аминокислотных остатков.

32. Слитый белок по п.30, в котором линкерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5, и аминокислотных после-

довательностей, состоящих от 1 до 10 из них, которые последовательно соединены.

33. Слитый белок по любому из пп.19-32, в котором другой белок (А) представляет собой человеческий белок.

34. Слитый белок по любому из пп.19-33, в котором другой белок (А) выбирают из группы, состоящей из фактора роста нервов (NGF), лизосомальных ферментов, цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), нейротрофического фактора глиальной клеточной линии (GDNF), нейротрофина-3, нейротрофина-4/5, нейротрофина-6, нейрегулина-1, эритропоэтина, дарбэпоэтина, активина, основного фактора роста фибробластов (bFGF), фактора роста фибробластов 2 (FGF2), эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста андов PD-1, ферментов, обладающих разрушающей β -амилоид активностью, антитела к β -амилоиду, антитела к BACE, антитела к EGFR, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к HER2 и антитела к TNF- α .

35. Слитый белок по любому из пп.19-33, в котором другой белок (А) представляет собой лизосомальный фермент, где лизосомальный фермент выбирают из группы, состоящей из α -L-идурунидазы, идуронат-2-сульфатазы, глюкоцереброзидазы, β -галактозидазы, активаторного белка GM2, β -гексозаминидазы А, β -гексозаминидазы В, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы, α -маннозидазы, β -маннозидазы, галактозилцерамидазы, сапозина С, арилсульфатазы А, α -L-фукозидазы, аспартилглюкозаминидазы, α -N-ацетилгалактозаминидазы, кислой сфингомиелиназы, α -галактозидазы А, β -глюкуронидазы, гепаран-N-сульфатазы, α -N-ацетилглюкозаминидазы, ацетил КоА: α -глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, N-ацетилглюкозамин-6-сульфатсульфатазы, кислой церамидазы, амило-1,6-глюкозидазы, сиалидазы, пальмитоил-протеин-тиоэстеразы 1, трипептидилпептидазы 1, гиалуронидазы 1, CLN1 и CLN2.

36. Слитый белок по любому из пп.19-33, в котором другой белок (А) представляет собой идуронат-2-сульфатазу.

37. Слитый белок по п.32, в котором другой белок (А) представляет собой идуронат-2-сульфатазу человека и в котором легкая цепь гуманизированного антитела к hTfR имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 196 и в котором тяжелую цепь гуманизированного антитела к hTfR соединяют, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с идуронат-2-сульфатазой человека, и полноразмерная соединенная тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 251.

38. Слитый белок по п.32, в котором другой белок (А) представляет собой идуронат-2-сульфатазу человека и содержит легкую цепь гуманизированного антитела к hTfR, которая имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 196; и тяжелую цепь гуманизированного антитела к hTfR, которая имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 210, которую соединяют, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность Gly-Ser, с идуронат-2-сульфатазой человека, приведенной в SEQ ID NO: 246.

39. Слитый белок по п.32, в котором другой белок (А) представляет собой идуронат-2-сульфатазу человека и содержит конъюгат, состоящий из идуронат-2-сульфатазы человека, соединенной через линкерную последовательность Gly-Ser с тяжелой цепью на ее С-концевой стороне; и легкую цепь, где аминокислотная последовательность конъюгата приведена в SEQ ID NO: 251 и аминокислотная последовательность легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 196.

40. Фрагмент ДНК, который кодирует аминокислотную последовательность антитела к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18.

41. Фрагмент ДНК, который кодирует аминокислотную последовательность слитого белка по любому из пп.19-39.

42. Экспрессирующий вектор, содержащий фрагмент ДНК по п.40 или 41, который встроен в него.

43. Клетка млекопитающего, трансформированная экспрессирующим вектором по п.42, для продуцирования антитела к рецептору трансферрина человека или слитого белка.

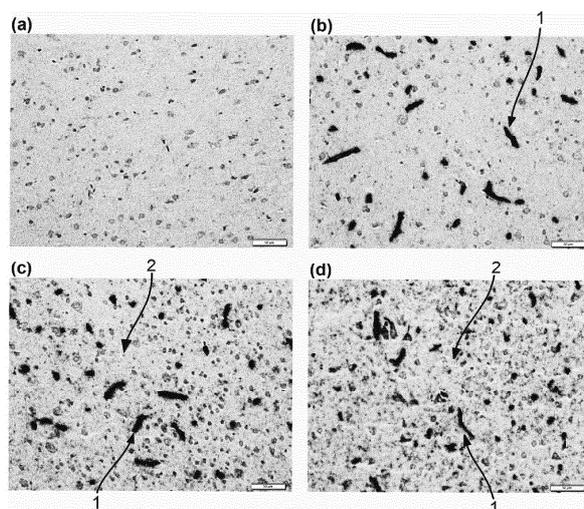
44. Комплекс антитела к рецептору трансферрина человека и фармакологически активного соединения, где комплекс вводят пациенту с заболеванием центральной нервной системы парентерально, в котором легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18 соединяют с низкомолекулярным фармакологически активным соединением, которому нужно позволять проходить через гематоэнцефалический барьер и проявлять свою функцию в головном мозге пациента с заболеванием центральной нервной системы.

45. Комплекс антитела к рецептору трансферрина человека и фармакологически активного соединения по п.44, в котором фармакологически активное соединение представляет собой какое-либо одно, выбранное из группы, состоящей из лекарственного средства против злокачественной опухоли, терапевтического средства для болезни Альцгеймера, терапевтического средства для болезни Паркинсона, терапевтического средства для хореи Гентингтона, терапевтического средства для шизофрении, антидепрессанта, терапевтического средства для рассеянного склероза, терапевтического средства для амиотрофического бокового склероза, терапевтического средства для опухолей центральной нервной системы, включая опухоль головного мозга, терапевтического средства для лизосомальной болезни накопления с

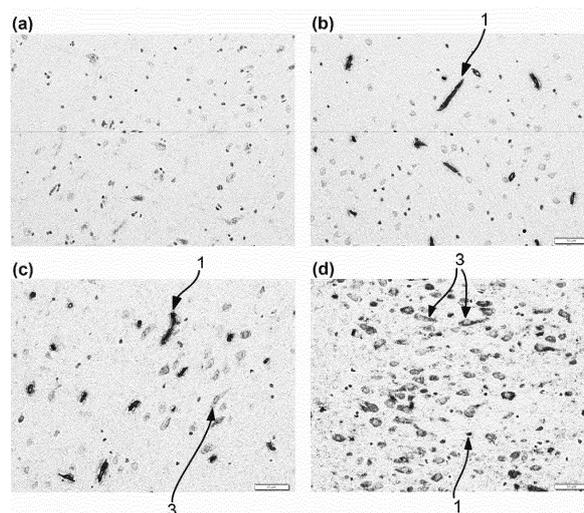
сопутствующей энцефалопатией, терапевтического средства для гликогеноза, терапевтического средства для мышечной дистрофии, терапевтического средства для ишемии головного мозга, терапевтического средства для прионных заболеваний, терапевтического средства для травматических нарушений центральной нервной системы, терапевтического средства для вирусных и бактериальных заболеваний центральной нервной системы, фармацевтического средства, используемого для восстановления после хирургического вмешательства в головной мозг, фармацевтического средства, используемого для восстановления после хирургического вмешательства в спинной мозг, миРНК, антисмысловой ДНК и пептида.

46. Применение антитела к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-18 для обеспечения прохождения другого белка (А) или низкомолекулярного фармакологически активного соединения через гематоэнцефалический барьер и проявления его функции в головном мозге.

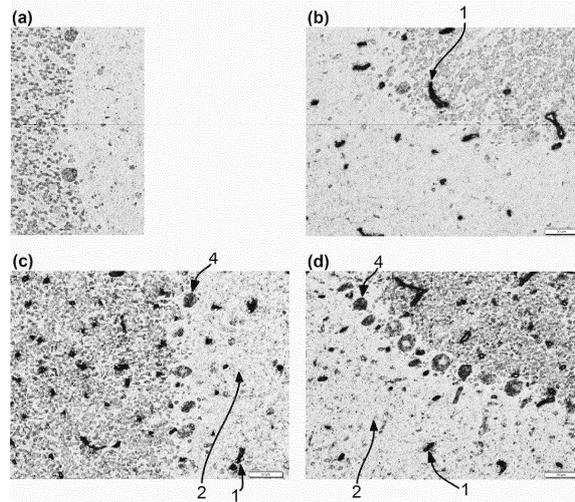
47. Применение антитела к рецептору трансферрина человека или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-18 для получения лекарственного средства для парентерального введения для лечения состояния заболевания центральной нервной системы.



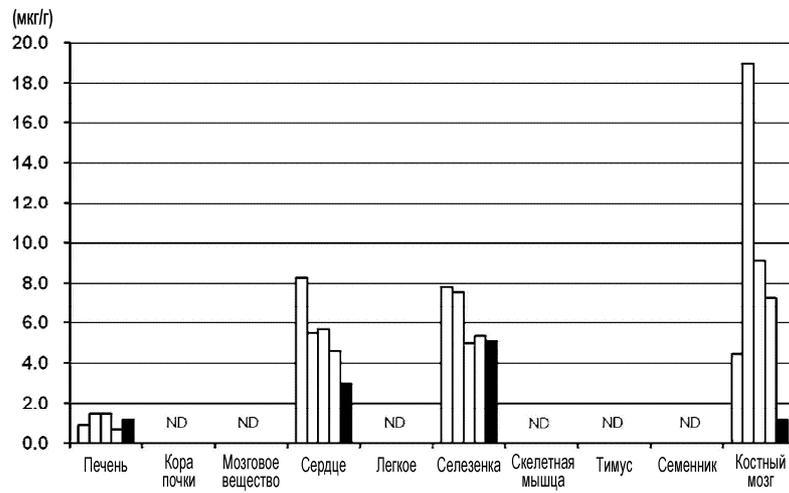
Фиг. 1



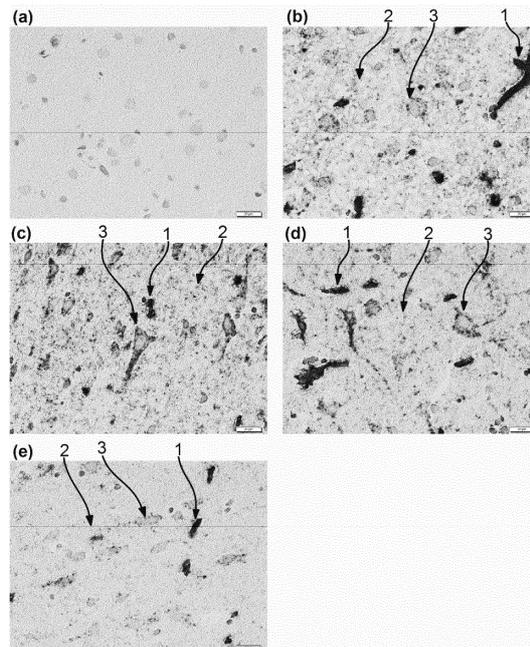
Фиг. 2



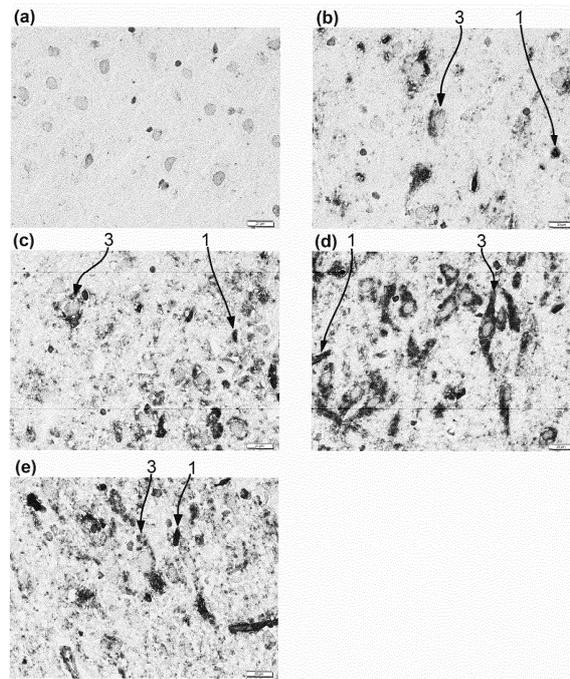
Фиг. 3



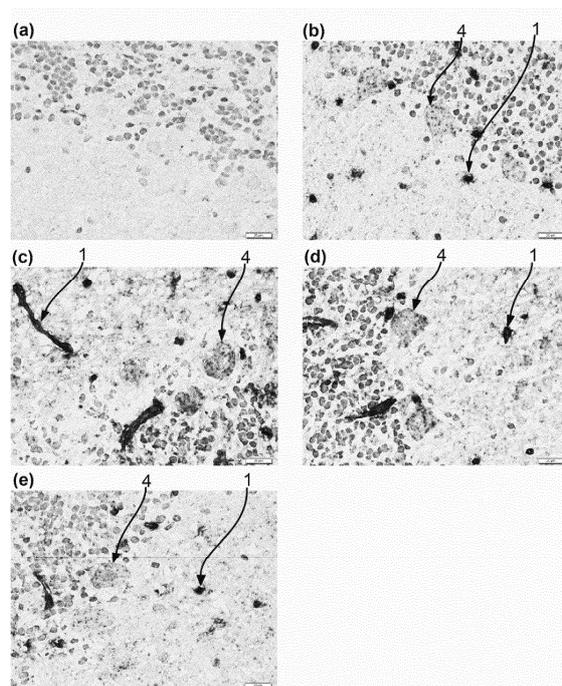
Фиг. 4



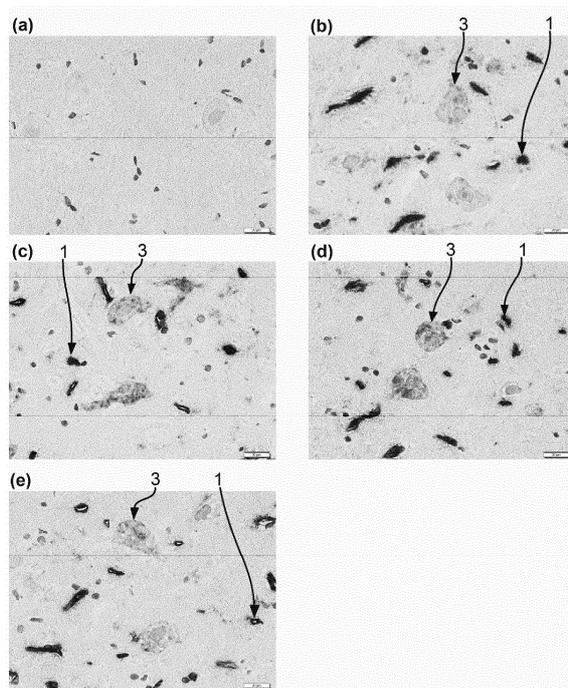
Фиг. 5



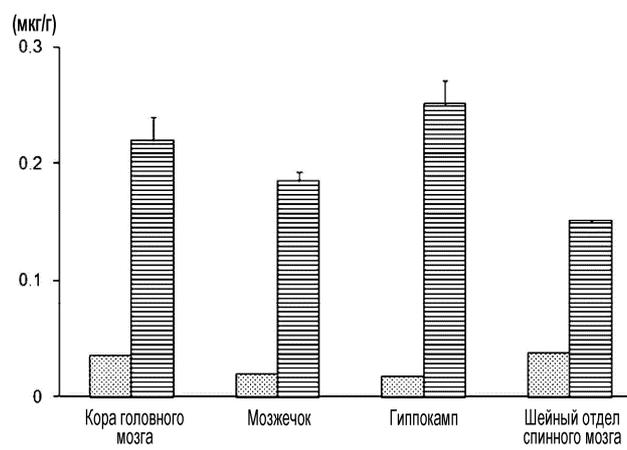
Фиг. 6



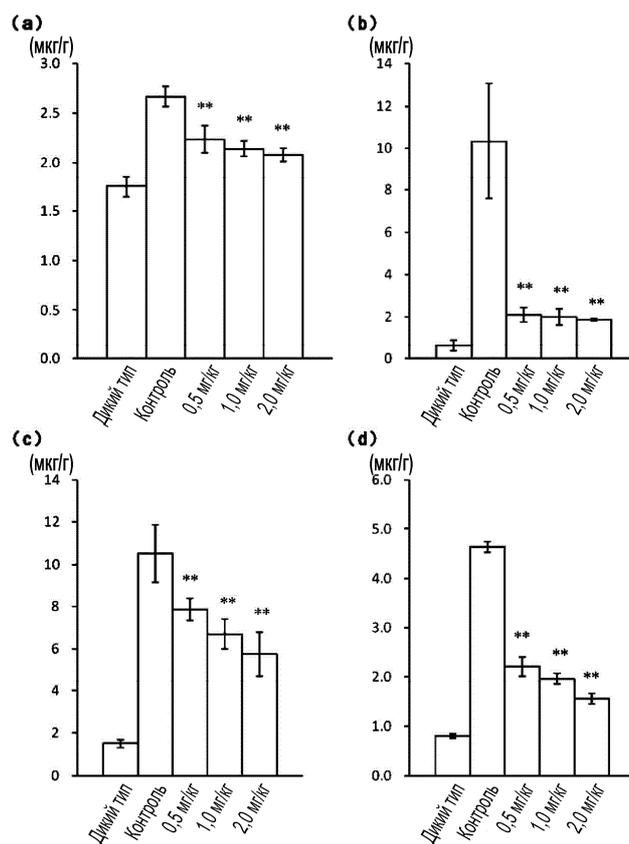
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

