

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040195**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.28

(21) Номер заявки
201491346

(22) Дата подачи заявки
2013.01.10

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

**(54) УСИЛЕНИЕ ТРАНСПОРТА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ ЧЕРЕЗ
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР**

(31) 61/585,039

(32) 2012.01.10

(33) US

(43) 2014.11.28

(86) PCT/US2013/021041

(87) WO 2013/106577 2013.07.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙОДЖЕН МА ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Фаррингтон Грэхем К., Сиск Уилльям
(US)**

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

(56) WO-A1-2011127580

ABULROB ABEDELNASSER ET AL.:
"SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AS BLOOD-
BRAIN BARRIER DELIVERY VECTORS",
INTERNATIONAL CONGRESS SERIES,
EXCERPTA MEDICA, AMSTERDAM, NL,
1 January 2005 (2005-01-01), p. 212-223,
XP001536285, ISSN: 0531-5131, DOI: 10.1016/
J.ICS.2005.02.024, the whole document

BY YOULET ET AL.:
"Intracerebroventricular injection of an agonist-like
monoclonal antibody to adenosine A(2A) receptor
has antinociceptive effects in mice", JOURNAL OF
NEUROIMMUNOLOGY JAN 2011, vol. 230, № 1-2,
January 2011 (2011-01), p. 178-182, XP027595398,
ISSN: 1872-8421, the whole document
WO-A1-2011107507

YU Y JOY ET AL.: "Boosting
brain uptake of a therapeutic antibody
by reducing its affinity for a transcytosis
target", SCIENCE/SCIENCE TRANSLATIONAL
MEDICINE, WASHINGTON, DC: AAAS, US, vol.
3, № 84, 84ra44, 25 May 2011 (2011-05-25),
p. 1-8, XP008148394, ISSN: 1946-6242, DOI:
10.1126/SCITRANSLMED.3002230, cited in the
application, the whole document

(57) Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на обнаружении того факта, что димерный вариант антитела, проникающего через ГЭБ (например, TMEM30A (CDC-50A)-связывающее антитело FC5), как было обнаружено, значительно усиливает транспорт через ГЭБ по сравнению с моновалентным FC5 V_{HH}. В том числе в настоящем изобретении предложены молекулы, которые повышают транспорт фармакологически активных средств через гематоэнцефалический барьер, способы повышения транспорта через гематоэнцефалический барьер и способы лечения нарушений или заболеваний с неврологическим компонентом.

040195 B1

040195 B1

Уровень техники

Распределение макромолекул по всему организму в целом опосредовано диффузией, причем макромолекулы, содержащиеся в крови, диффундируют в ткани через эндотелиальные клетки, содержащие высокое количество отверстий, выстилающие капиллярную сосудистую сеть. В высоко васкуляризованном головном мозге не происходит свободная диффузия макромолекул. В эндотелиальных клетках капилляров головного мозга отсутствуют отверстия, наблюдаемые у клеток остальной части кровеносной системы, и они имеют плотные межклеточные контакты, характерные для высокоспециализированных эндотелиальных клеток. Эти плотные контакты предназначены для предотвращения свободной диффузии молекул, больших чем 400 кДа, от люминальной к аблюминальной поверхности капилляра. В дополнение к этому, капилляры содержат различные транспортные системы, такие как транспортеры органических анионов (OATS) и системы множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), которые активно устанавливают градиенты для транспортировки молекул, которые иначе могут диффундировать через эндотелиальные клетки. Комбинация ограничительных барьеров предотвращает поступление занесенных агентов, включая, например, токсины и вирусы, а также ограничивает диффузию терапевтических соединений. В дополнение к этому эти ограничительные гематоэнцефалические барьеры (ГЭБ) эффективно блокируют пассивную доставку потенциально терапевтических белков, пептидов и небольших молекул в паренхиму головного мозга в фармакологически терапевтических дозах.

Одна из успешных стратегий для обеспечения транспорта терапевтических молекул через эндотелиальные клетки ГЭБ заключалась в том, чтобы воспользоваться преимуществами рецептор-опосредованного транцитоза (RMT). В этой стратегии используются антитела или молекулы, которые связываются специфически с белками на эндотелиальных клетках ГЭБ, которые, как правило, вовлечены в транспорт молекул через эндотелиальные клетки ГЭБ. Такие антитела используются в качестве молекул-переносчиков для доставки соединенных с ними грузов, в то время как они подвергаются транцитозу через эндотелиальные клетки ГЭБ. Примеры применений этой технологии включают использование антител к трансферриновому рецептору и инсулиновым рецепторам (Yu et al., 2011, *Science Translational Medicine*, vol. 3). В этих двух случаях производили слияние RMT-антител на C-конце с доменами терапевтических белков и было показано, что они транспортируют молекулы через ГЭБ. К сожалению, широко используемые RMT-мишени - трансферриновые и инсулиновые рецепторы - в высокой степени и широко экспрессированы в многочисленных тканях. Эта широкая направленная экспрессия приводит к короткому периоду полувыведения из крови, что в свою очередь ограничивает время воздействия на эндотелиальные клетки ГЭБ и вследствие этого дозированное поступление молекулы в головной мозг. В дополнение к этому, эти антитела затрагивают особо важные для метаболизма функции клеток, вследствие этого создавая потенциальную угрозу безопасности.

Направляющие фрагменты с улучшенными свойствами, в которых используются молекулы, участвующие в активном транспорте через ГЭБ, для пересечения ГЭБ, например сайты связывания, полученные из молекул антител, которые проникают через ГЭБ, были бы очень полезными для доставки терапевтических средств в головной мозг.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на обнаружении того факта, что слитый белок, содержащий антитело, проникающее через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), например aTMMEM30A (CDC-50A)-связывающее антитело (такое как, например, однодоменное антитело FC5), как было обнаружено, значительно усиливает транспорт через ГЭБ по сравнению с моновалентным V_{HH} . Первоначальные экспериментальные исследования по связыванию и транспорту через эндотелиальные клетки ГЭБ показали, что FC5, однодоменное V_{HH} антитело ламы (sdAb), может облегчать транспорт через слой эндотелиальных клеток ГЭБ (см., например, патент США 7943129). Период полувыведения V_{HH} из крови, как известно, является кратким из-за низкого молекулярного веса и отсутствия Fc-домена (Jain, M., Kamal, N., Batra, S.K. (2007), *Trends in biotechnology* 25(7), 307-316; Batra, S.K., Jain, M., Wittel, U.A., Chauhan, S.C., Colcher, D. (2002), *Current opinion in biotechnology* 13(6), 603-608). На удивление период полувыведения из крови этого конструкта значительно увеличили за счет слияния однодоменного антитела, проникающего через ГЭБ, с N-концом человеческого Fc, что приводило к образованию конструкта, наподобие бивалентного антитела. При встраивании такого сайта связывания в Fc-конструкт образуется бивалентная молекула с потенциалом к бивалентному связыванию, при этом каждый связывающий фрагмент связывается с предполагаемой мишенью, например TMMEM30A, который экспрессируется на клеточной поверхности. Бивалентное связывание может привести к значительному изменению кажущейся аффинности связывания из-за эффекта avidности (Reynolds, J.A. (1979), *Biochemistry* 18(2), 264-269; Hubble, J. (1999), *Molecular immunology* 36(1), 13-18). Как продемонстрировано в данном документе, аффинность взаимодействия увеличивалась. Учитывая это увеличение аффинности, не ожидали обнаружить то, что присоединение Fc для образования бивалентной молекулы значительно увеличит транспорт через ГЭБ. Увеличение транспорта не ожидали потому что, хотя присоединение Fc-домена может продлить бета-фазу фармакокинетики в силу увеличения массы, что предотвращает почечную фильтрацию молекулы и способствует рециркуляции антитела *in vivo* за счет связывания с FcRn, дополнительное увеличение кажущейся аффинности могло также оказывать противоположный

эффект в силу выведения циркулирующих связывающих молекул после связывания с высоко экспрессированной мишенью. Однако к наибольшему удивлению, как продемонстрировано в данном документе, было обнаружено, что слитые белки в конформации "сайт связывания-Fc" (от амино- к карбоксильному концу, т.е. сайт связывания слит с N-концом Fc) имели более высокую активность, чем белки в конформации "Fc-сайт связывания" (сайт связывания слит с C-концом Fc). Эта соответствовало действительности, несмотря на то что слитые белки, состоящие из Fc-сайта связывания (сайт связывания слит с C-концом Fc), проявили более высокую степень связывания с эндотелиальными клетками в первоначальных экспериментальных исследованиях, выполненных *in vitro*. Также предложены моновалентные варианты конструкторов "сайт связывания-Fc".

В соответствии с этим в одном аспекте настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, содержащей по меньшей мере одно фармакологически активное средство и по меньшей мере один сайт связывания, например сайт связывания, обеспечивающий перенос через ГЭБ, который связывается с ТМЕМ30А, отличающейся тем, что по меньшей мере один сайт связывания, который связывается с ТМЕМ30А, слит i) непосредственно или ii) через промежуточную аминокислотную последовательность с N-концом Fc-фрагмента.

В одном варианте реализации связывающая молекула содержит по меньшей мере два сайта связывания.

В одном варианте реализации по меньшей мере один сайт связывания содержит аминокислотную последовательность FC5. В одном варианте реализации связывающая молекула содержит по меньшей мере два или по меньшей мере три (например, два или три) сайта связывания, которые связываются с ТМЕМ30А. В одном варианте реализации связывающая молекула содержит по меньшей мере три или по меньшей мере четыре (например, три или четыре) сайта связывания, которые связываются с ТМЕМ30А.

В одном варианте реализации по меньшей мере один сайт, обеспечивающий перенос через ГЭБ (например, сайт связывания, полученный из молекул антител, которые проникают через ГЭБ), слит на уровне гена непосредственно с Fc-фрагментом.

В одном варианте реализации по меньшей мере один сайт, обеспечивающий перенос через ГЭБ (например, сайт связывания, полученный из молекул антител, которые проникают через ГЭБ), слит на уровне гена с Fc-фрагментом через промежуточную аминокислотную последовательность, состоящую из пептидного линкера.

В одном варианте реализации по меньшей мере один сайт, обеспечивающий перенос через ГЭБ (например, сайт связывания, полученный из молекул антител, которые проникают через ГЭБ), слит на уровне гена с Fc-фрагментом через промежуточную аминокислотную последовательность, состоящую из пептидного линкера.

В одном варианте реализации два сайта, обеспечивающие перенос через ГЭБ (например, сайты связывания, полученные из молекул антител, которые проникают через ГЭБ), слиты с N-концом двух разных Fc-фрагментов всей Fc-области через аминокислотную последовательность, содержащую пептидный линкер.

В одном варианте реализации по меньшей мере один сайт, обеспечивающий перенос через ГЭБ (например, сайт связывания, полученный из молекул антител, которые проникают через ГЭБ), слит с N-концом молекулы scFc.

В одном варианте реализации по меньшей мере одно фармакологически активное средство слито с C-концом Fc-области.

В одном варианте реализации по меньшей мере одно фармакологически активное средство представляет собой небольшое химическое соединение.

В одном варианте реализации небольшое химическое соединение слито со связывающей молекулой по остатку цистеина. В одном варианте реализации остаток цистеина представляет собой встроенный остаток цистеина.

В одном варианте реализации по меньшей мере одно фармакологически активное средство представляет собой полипептид.

В одном варианте реализации по меньшей мере одно фармакологически активное средство содержит антигенсвязывающий сайт (например, антигенсвязывающий сайт, полученный из антитела, не проникающего через ГЭБ).

В одном варианте реализации фармакологически активное средство выбирают из группы, состоящей из молекулы scFv, молекулы Fab и однодоменного антитела.

В одном варианте реализации по меньшей мере одно фармакологически активное средство слито на уровне гена со связывающей молекулой.

В одном варианте реализации по меньшей мере одно фармакологически активное средство ковалентно связано со связывающей молекулой.

В одном варианте реализации сайт, обеспечивающий перенос через ГЭБ, слит на уровне гена через промежуточную аминокислотную последовательность, содержащую V_H-домен молекулы антитела.

В одном варианте реализации сайт, обеспечивающий перенос через ГЭБ, слит на уровне гена через промежуточную аминокислотную последовательность, содержащую V_L-домен молекулы антитела.

В одном варианте реализации по меньшей мере один сайт, обеспечивающий перенос через ГЭБ, слит на уровне гена с N-концом V_H -домена интактной молекулы антитела.

В одном варианте реализации по меньшей мере один сайт, обеспечивающий перенос через ГЭБ, слит на уровне гена с N-концом V_L -домена интактной молекулы антитела.

В одном варианте реализации два сайта, обеспечивающие перенос через ГЭБ, слиты на уровне гена с N-концом V_H -домена и V_L -домена интактной молекулы антитела.

В одном варианте реализации промежуточная аминокислотная последовательность дополнительно содержит пептидный линкер.

В одном варианте реализации фармацевтически активное средство выбирают из группы, состоящей из нейроактивного пептида, небольшого химического соединения и варибельной области антитела, которое связывается с мишенью в центральной нервной системе.

В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу лечения неврологического нарушения, включающему введение субъекту связывающей молекулы настоящего изобретения.

В одном варианте реализации неврологическое нарушение представляет собой болезнь накопления. В одном варианте реализации неврологическое нарушение представляет собой хроническую боль. В одном варианте реализации неврологическое нарушение представляет собой эпилепсию. В одном варианте реализации неврологическое нарушение представляет собой рассеянный склероз. В одном варианте реализации неврологическое нарушение представляет собой болезнь - протеинопатию. В одном варианте реализации нарушение представляет собой демиелинизирующее нарушение.

В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к использованию связывающей молекулы настоящего изобретения при производстве лекарственного препарата для лечения неврологического нарушения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 проиллюстрированы схематические изображения однодоменного антитела Fc5, состоящего из тяжелой цепи, (a) отдельно, (b) слитого либо на N-конце (FC5-Fc), либо (c) на C-конце (Fc-FC5) с agly Fc-доменом человеческого IgG1, а также возможных антителоподобных конструкторов, которые включают в качестве фармацевтически активного фрагмента домен, не проникающий через ГЭБ (d, e). Молекулы (f) и (g) иллюстрируют присоединение однодоменного антитела Fc5, состоящего из тяжелой цепи, к полной молекуле антитела; может произойти слияние однодоменного антитела, состоящего из тяжелой цепи, например, с V_L - или V_H -доменом или и тем, и другим доменом.

На фиг. 2a-c проиллюстрирован электрофорез 2,5 мкг каждого очищенного белка на 4-12% Bis-Tris SDS PAGE. На каждом геле отмечены стандарты молекулярного веса для SDS PAGE от 10-220 кДа. На панели А показана дорожка для электрофореза в невосстанавливающих (1) и восстанавливающих условиях (2) для FC5, на панели В показана дорожка в невосстанавливающих (1) и восстанавливающих условиях (2) для FC5-Fc и на панели С показана дорожка в невосстанавливающих (1) и восстанавливающих условиях (2) для Fc-FC5.

На фиг. 3 проиллюстрирована повышенная скорость транспорта Fc5Fc, FcFC5 и FC5 in vitro через трансформированные SV40 эндотелиальные клетки ГЭБ крысы по сравнению с контрольными антителами 12F6A (hIgG1), CRL2434 (mIgG1) и C37H (V_{HH} только).

Фиг. 4a-c. На панели 4(a) проиллюстрировано связывание Fc5-Fc (○), Fc-FC5 (■) или нерелевантного контрольного верблюжьего V_{HH} , слитого с N-концами huFc agly домена (V_{HH} -Fc) (A), с трансформированными SV40 эндотелиальными клетками ГЭБ крысы. На панели (4b) показано связывание Fc5-Fc (○) и Fc-FC5 (■) с крысиными эндотелиальными клетками ГЭБ первичной культуры. На панели 4c показано связывание Fc5-Fc с крысиным (□) или человеческим (◇) и Fc-FC5 с крысиным (▲) или человеческим (●) ТМЕМ30А с транзиторной экспрессией в клетках EBNA293.

Фиг. 5a-c. На панели 5a проиллюстрирована способность Fc5, ковалентно сшитого с даларгином (FC5-Dal), подавлять боль в модели Hargreaves на животных. Скорость отдергивания лапы выражают в виде процента максимально возможного эффекта (%MPE) на основе временного интервала 20 с. Отрицательный контроль показывает скорость отдергивания для противоположной невоспаленной контрольной лапы (●) и положительный контроль показывает высокую скорость отдергивания воспаленной лапы, когда крысе IV вводят только PBS (○). Эффективность однократной IV дозы (■) Fc5-Dal при 21 мг/кг сравнивается с тремя IV дозами Fc5-Dal при 7 мг/кг (□) в отношении подавления скорости отдергивания лапы в модели Hargreaves на животных. На панели 5b показана средняя площадь под кривой для ответа %MPE против времени, затраченного для каждой оцениваемой лапы. На панели 5c показаны дополнительные эксперименты для отрицательного контроля, в которых крысам вводили IV три дозы 7 мг/кг в моменты времени 0, 1 и 2 ч либо нерелевантного V_{HH} -Dal (серые маркеры-прямоугольники) или FC5 отдельно (маркеры-прямоугольники без заливки). Также показаны данные для противоположной контрольной лапы (маркеры-круги со сплошной заливкой). %MPE для подавления скорости отдергивания лапы определяют в модели Hargreaves на животных.

Фиг. 6a-d. Эффективность Fc-FC5-Dal оценивали в модели Hargreaves. Крысам вводили IV дозы при 2 мг/кг в момент времени 0 на панели 6a и в моменты времени 0 и 2 ч на панели 6B. На панелях 6C и 6D каждой крысе вводили IV дозы при 6,5 мг/кг в момент времени 0.

Фиг. 7a-d. В модели Hargreaves сравнивали эффективность Fc5-Fc-Dal с отрицательным контролем Fc-Dal. Крысам в момент времени 0 вводили IV разовую концентрацию Fc5-Fc-Dal или Fc-Dal при 0,5, 2,5 или 6,0 мг/кг. Данные представлены на панелях 7a и 7b в виде процента максимально возможного эффекта (MPE) за указанное время или на панелях 7c и 7d в виде относительной площади под кривой.

Подробное описание изобретения

Слитый белок, содержащий по меньшей мере одно однодоменное антитело, проникающее через ГЭБ, например, которое связывается с TMEM30A (CDC-50A) (как, например, один домен FC5), как было обнаружено, значительно усиливает транспорт через ГЭБ по сравнению с моновалентным V_{HH} . В частности, конформация "сайт связывания-Fc" (от амино- к карбоксильному концу) позволила продемонстрировать повышенную активность. Основываясь, по меньшей мере частично, на факте значительного повышения транспорта, в данном документе описаны молекулы, характеризующиеся повышенным транспортом через гематоэнцефалический барьер, способы повышения транспорта через гематоэнцефалический барьер и способы лечения с использованием таких молекул.

Перед дальнейшим описанием настоящего изобретения для удобства ниже описаны определенные выражения.

I. Определения.

Как используется в данном документе, выражение "белок" или "полипептид" относится к полимеру из двух или нескольких природных аминокислот или не природных аминокислот.

Выражение "аминокислота" включает аланин (Ala или A); аргинин (Arg или R); аспарагин (Asn или N); аспарагиновую кислоту (Asp или D); цистеин (Cys или C); глутамин (Gln или Q); глутаминовую кислоту (Glu или E); глицин (Gly или G); гистидин (His или H); изолейцин (Ile или I); лейцин (Leu или L); лизин (Lys или K); метионин (Met или M); фенилаланин (Phe или F); пролин (Pro или P); серин (Ser или S); треонин (Thr или T); триптофан (Trp или W); тирозин (Tyr или Y); и валин (Val или V). Нетрадиционные аминокислоты также находятся в пределах объема настоящего изобретения и включают норлейцин, омитин, норвалин, гомосерин и другие аналоги аминокислотных остатков, такие как описаны в Ellman et al., *Meth. Enzym.*, 202:301-336 (1991). Для создания таких не встречающихся в природе аминокислотных остатков можно использовать методики Noren et al., *Science*, 244:182 (1989); и Ellman et al. выше. Вкратце эти методики включают химическую активацию супрессорной tРНК с помощью не встречающегося в природе аминокислотного остатка с последующей транскрипцией и трансляцией РНК *in vitro*. Введение нетрадиционной аминокислоты также можно достичь с использованием методов химии пептидов, известных в настоящем уровне техники. Как используется в данном документе, выражение "полярная аминокислота" включает аминокислоты, которые имеют суммарный нулевой заряд, но имеют ненулевые частичные заряды в разных участках их боковых цепей (например, M, F, W, S, Y, N, Q, C). Эти аминокислоты могут участвовать в гидрофобных взаимодействиях и электростатических взаимодействиях. Как используется в данном документе, выражение "заряженная аминокислота" включает аминокислоты, которые могут иметь ненулевой суммарный заряд на боковых цепях (например, R, K, H, E, D). Эти аминокислоты могут участвовать в гидрофобных взаимодействиях и электростатических взаимодействиях.

Как используется в данном документе выражение "линкерный пептид" относится к аминокислотным последовательностям, которые соединяют или связывают две полипептидные последовательности, например которые связывают два полипептидных домена, причем в природе не встречается соединение или связывание этими аминокислотными последовательностями двух полипептидных доменов. В одном варианте реализации линкерный пептид является синтетическим. Как используется в данном документе выражение "синтетический" относится к аминокислотным последовательностям, которые не встречаются в природе.

Линкерные пептиды настоящего изобретения соединяют две аминокислотные последовательности через пептидные связи. В одном варианте реализации линкерный пептид соединяет фрагмент, проникающий через ГЭБ, со вторым фрагментом, например с доменом или областью Fc-фрагмента. В одном варианте реализации линкерный пептид настоящего изобретения соединяет фармакологически активный фрагмент со вторым фрагментом в линейную последовательность, например со вторым фрагментом, который представляет собой фрагмент, проникающий через ГЭБ, или доменом или областью Fc-фрагмента. В другом варианте реализации линкерный пептид соединяет два фармакологически активных фрагмента. В одном варианте реализации линкерный пептид соединяет или обеспечивает слияние на уровне гена одного или нескольких доменов или областей Fc-фрагментов с отличным от Fc фрагментом.

В отношении полипептидов "линейная последовательность" или "последовательность" представляет собой порядок аминокислот в полипептиде в направлении от амино- до карбоксильного конца, в которой остатки, соседствующие друг с другом, являются смежными в первичной структуре полипептида.

Как используется в данном документе, выражения "соединенный", "слитый" или "слияние" используются взаимозаменяемо. Эти выражения относятся к объединению более двух элементов или компонентов любыми способами, включая химическую конъюгацию или рекомбинантные способы. Как используется в данном документе, выражение "ковалентно слитый" или "ковалентно связанный" означает, что определенные фрагменты либо непосредственно ковалентно связаны друг с другом, либо же косвенно ковалентно соединены друг с другом через промежуточный фрагмент или фрагменты, такие как линкер-

ный пептид или фрагмент. В предпочтительном варианте реализации фрагменты ковалентно слиты. Одним из типов ковалентной связи является пептидная связь. Способы химической конъюгации (например, с использованием гетеробифункциональных сшивающих средств) известны в настоящем уровне техники. Слитые фрагменты могут также быть слиты на уровне гена. Как используется в данном документе, выражение "слиты на уровне гена", "связаны на уровне гена" или "слияние на уровне гена" относится к линейному, ковалентному соединению или присоединению двух или нескольких белков, полипептидов, или их фрагментов через отдельные пептидные остовы, посредством генетической экспрессии одной полинуклеотидной молекулы, кодирующей эти белки, полипептиды или фрагменты. Такое слияние на уровне гена приводит к экспрессии одной непрерывной генетической последовательности. Предпочтительные слияния на уровне генов происходят в рамке считывания, т.е. происходит слияние двух или больше открытых рамок считывания (ОРС) с образованием непрерывной более длинной ОРС, таким образом, что сохраняется правильная рамка считывания первоначальных ОРС. Таким образом, полученный в результате рекомбинантный слитый белок представляет собой один полипептид, содержащий два или более белковых сегмента, которые соответствуют полипептидам, кодируемым первоначальными ОРС (соединение этих сегментов таким образом обычно не встречается в природе). В данном случае один полипептид расщепляется на протяжении процессинга с получением димерных молекул, содержащих две полипептидные цепи.

Исследуемые полипептиды содержат по меньшей мере один фармакологически активный фрагмент. Фармакологически активный фрагмент относится к фрагменту, способному оказывать биологическое воздействие или принимать участие в биологических реакциях. Например, выражение "фармакологически активный фрагмент" относится к фармакологически активным молекулам или их участкам, которые связываются с компонентами биологической системы (например, белками в биологической жидкости, или на поверхности клеток, или в клеточном матриксе), и их связывание приводит к биологическому эффекту (например, который выражается в изменении активного фрагмента и/или компонента, с которыми он связывается (например, расщепление активного фрагмента и/или компонента, с которыми он связывается, передача сигнала или усиление или ингибирование биологического ответа в клетке или у субъекта)). Предпочтительными фармацевтически активными фрагментами являются терапевтические фрагменты.

Иллюстративные фармакологически активные фрагменты могут содержать, например, лекарственное средство, антигенсвязывающий фрагмент молекулы антитела или его участок (например, F(ab), scFv, V_H-домен или V_L-домен) (например, для обеспечения, индукции или блокирования биологического ответа), лиганд-связывающий участок рецептора или рецептор-связывающий участок лиганда, фермент и т.д. В одном варианте реализации фармакологически активный фрагмент содержит зрелую форму белка. В другом варианте реализации фармакологически активный фрагмент содержит участок непроцессированного белка, который сохраняет биологическую активность. Другие иллюстративные фармакологически активные фрагменты включают терапевтически полезные аминокислоты, пептиды, белки, нуклеиновые кислоты, включая, но без ограничений, полинуклеотиды, олигонуклеотиды, углеводы и липиды. Иллюстративные фармакологически активные фрагменты настоящего изобретения включают нейротрофические факторы, факторы роста, ферменты, антитела, нейромедиаторы, нейромодуляторы, антибиотики, противовирусные средства, противогрибковые средства, визуализирующие или детектируемые средства, изотопы и химиотерапевтические средства и т.п. Фармакологически активные фрагменты настоящего изобретения также включают лекарственные средства, пролекарства и прекурсоры, которые могут активироваться по доставке терапевтического средства в ткань-мишень. Подразумевается, что выражение "фармакологически активные фрагменты" не включает фрагмент, проникающий через ГЭБ. Фармакологически активные средства представляют собой фрагменты, не проникающие через ГЭБ.

Связывающие молекулы настоящего изобретения представляют собой "химерные" или "слитые" белки. Такие белки содержат первую аминокислотную последовательность, соединенную со второй аминокислотной последовательностью, соединение которых в природе не встречается. Аминокислотные последовательности, как правило, могут присутствовать в отдельных белках, которые объединяются в слитом полипептиде или они, как правило, могут присутствовать в одном и том же белке, но по-новому располагаются в слитом полипептиде. Химерный белок можно создать с использованием способов, хорошо известных в настоящем уровне техники, например, путем химического синтеза или путем создания и трансляции полинуклеотида, в котором пептидные области кодируются в желаемом взаиморасположении.

Полипептиды настоящего изобретения представляют собой связывающие молекулы, т.е. которые включают домены связывания или сайты связывания, полученные из антител, проникающих через ГЭБ. Антитело, проникающее через ГЭБ, облегчает проникновение через ГЭБ присоединенного к нему фрагмента. Иллюстративные сайты связывания антитела, проникающего через ГЭБ, описаны в патенте США 7943129. В одном варианте реализации антитело, проникающее через ГЭБ, связывается с ТМЕМ30А. Выражения "домен связывания" или "сайт связывания", как используется в данном документе, относятся к участку, области или сайту полипептида, который опосредует специфическое связывание с молекулой-мишенью (например, сайт связывания ТМЕМ30А или другой сайт, который облегчает про-

никновение через ГЭБ). Иллюстративные домены связывания включают антигенсвязывающий сайт (например, V_H - и/или V_L -домен) или молекулы, содержащие такой сайт связывания (например, антитело или однодоменное антитело).

Полипептиды настоящего изобретения являются моновалентными или поливалентными, что касается фрагмента, проникающего через ГЭБ, например, содержат по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или больше фрагментов, проникающих через ГЭБ.

Фармакологически активные фрагменты, как описано в данном документе, могут также содержать домены связывания или сайты связывания, например, которые получают из молекулы антитела (например, V_H - и/или V_L -домен из антитела, которое не проникает через ГЭБ), молекул, содержащих такой сайт связывания (например, антитело или однодоменное антитело), рецептор-связывающего домена лиганда, лиганд-связывающего домена рецептора или каталитического домена. Выражение "лиганд-связывающий домен", как используется в данном документе, относится к нативному рецептору (например, рецептору клеточной поверхности), или области, или их производному, сохраняющему, по меньшей мере, качественно лиганд-связывающую способность и предпочтительно биологическую активность соответствующего нативного рецептора. Выражение "рецептор-связывающий домен", как используется в данном документе, относится к нативному лиганду, или области, или их производному, сохраняющему, по меньшей мере, качественно рецептор-связывающую способность и предпочтительно биологическую активность соответствующего нативного лиганда.

В одном варианте реализации полипептиды настоящего изобретения представляют собой модифицированные антитела. Как используется в данном документе, выражение "модифицированное антитело" включает синтетические формы антител, которые изменены таким образом, что они не встречаются в природе, например антитела, которые включают по меньшей мере два участка тяжелой цепи, а не две полные тяжелые цепи (как, например, антитела с удаленными доменами или миниантитела); мультиспецифические формы антител (например, биспецифические, триспецифические и т.д.), измененные таким образом, чтобы связываться с двумя или более разными антигенами, например с ТМЕМ30А и терапевтически значимым целевым сайтом связывания), соединенные с Fc-фрагментами, доменами, областями или scFc-областями.

Как используется в данном документе, выражение "Fc-область" необходимо определить как участок полипептида, который соответствует Fc-области нативного иммуноглобулина, т.е. которая образуется путем димерной ассоциации соответствующих Fc-доменов (или Fc-фрагментов) двух его тяжелых цепей. Нативная Fc-область является гомодимерной и содержит две полипептидные цепи. В отличие от этого выражение "Fc-область, слитая на уровне гена" или "одноцепочечная Fc-область" (scFc-область), как используется в данном документе, относится к синтетической димерной Fc-области, состоящей из Fc-доменов (или Fc-фрагментов), соединенных на уровне гена в пределах одной полипептидной цепи (т.е. кодируемых одной непрерывной генетической последовательностью), как описано, например, в заявке на патент США 20110243966. В одном варианте реализации при использовании scFc-области связывающая молекула является моновалентной, что касается фрагмента, проникающего через ГЭБ.

Как используется в данном документе, выражение "Fc-домен" относится к участку одной тяжелой цепи иммуноглобулина, начинающейся с шарнирной области непосредственно выше сайта расщепления папаином (т.е. остаток 216 в IgG, учитывая, что первым остатком константной области тяжелой цепи является 114) и заканчивающейся на С-конце антитела. В соответствии с этим полный Fc-домен содержит, по меньшей мере, шарнирный домен, СН2-домен и СН3-домен. Как используется в данном документе, выражение "Fc-область" относится к димеризованным Fc-доменам, которые имеют сходство с Fc-областью нативных антител (например, несмотря на то, имеет ли она традиционную структуру из двух полипептидных цепей или выступает в качестве одноцепочечной Fc-области).

Как используется в данном документе, выражение "участок Fc-домена" или "Fc-фрагмент" включает аминокислотную последовательность Fc-домена или последовательность, полученную из Fc-домена. В определенных вариантах реализации Fc-фрагмент содержит по меньшей мере один из шарнирного (например, верхняя, средняя и/или нижняя шарнирная область) домена, СН2-домена, СН3-домена, СН4-домена или варианта, участка или их фрагмента. В других вариантах реализации Fc-фрагмент содержит полный Fc-домен (т.е. шарнирный домен, СН2-домен и СН3-домен). В одном варианте реализации Fc-фрагмент содержит шарнирный домен (или его участок), слитый с СН3-доменом (или его участком). В другом варианте реализации Fc-фрагмент содержит СН2-домен (или его участок), слитый с СН3-доменом (или его участком). В другом варианте реализации Fc-фрагмент состоит из СН3-домена или его участка. В другом варианте реализации Fc-фрагмент состоит из шарнирного домена (или его участка) и СН3-домена (или его участка). В другом варианте реализации Fc-фрагмент состоит из СН2-домена (или его участка) и СН3-домена. В другом варианте реализации Fc-фрагмент состоит из шарнирного домена (или его участка) и СН2-домена (или его участка). В одном варианте реализации в Fc-фрагменте отсутствует, по меньшей мере, участок СН2-домена (например, весь или часть СН2-домена).

В одном варианте реализации связывающая молекула настоящего изобретения содержит полную Fc-область, несмотря на то, присутствует ли она в виде одной полипептидной цепи (scFc-молекула) или в форме дикого типа в виде двух полипептидных цепей.

"Специфически связанные" относится к двум молекулам, образующим комплекс, который относительно стабилен в физиологических условиях. Специфическое связывание отличается высокой аффинностью и низкой и умеренной емкостью в отличие от неспецифического связывания, которое обычно характеризуется низкой аффинностью с умеренной и высокой емкостью. Как правило, связывание считается специфическим, если константа аффинности KA превышает $10^6 M^{-1}$ или более предпочтительно превышает $10^8 M^{-1}$. В случае необходимости можно уменьшить уровень неспецифического связывания, по сути не оказывая влияния на специфическое связывание, за счет варьирования условий связывания. Специалист в данной области техники использованием стандартных методик может оптимизировать соответствующие условия связывания, такие как концентрация молекул, ионная сила раствора, температура, время, достаточное для связывания, концентрация блокирующего средства (например, сывороточный альбумин, молочный казеин) и т.д.

В одном варианте реализации Fc-фрагмент настоящего изобретения содержит, по меньшей мере, участок Fc-молекулы, которая, как известно в настоящем уровне техники, требуется для связывания FcRn, называемого в данном документе связывающим партнером неонатального рецептора (FcRn). Связывающий партнер FcRn представляет собой молекулу или ее участок, который может специфически связываться FcRn-рецептором с последующим активным транспортом связывающего партнера FcRn через FcRn-рецептор.

Связывающие партнеры FcRn настоящего изобретения охватывают молекулы, которые могут специфически связываться FcRn-рецептором, включая целый IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты, которые включают всю область связывания FcRn-рецептора. В другом варианте реализации домен или область Fc-фрагмента связывающей молекулы настоящего изобретения модифицируют таким образом, что происходит слабое, минимальное связывание или вообще не происходит связывания с FcRn. Область Fc-участка IgG, которая связывается с FcRn-рецептором, была описана на основе рентгеноструктурного анализа (Burmeister et al., 1994, Nature, 372:379). Главная площадь контакта Fc с FcRn находится недалеко от места соединения CH2- и CH3-доменов. Все контакты Fc-FcRn находятся в пределах одной тяжелой цепи Ig. Связывающие партнеры FcRn включают целый IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты IgG, которые включают всю область связывания FcRn. Главные контактные сайты включают аминокислотные остатки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 CH2-домена и аминокислотные остатки 385-387, 428, и 433-436 CH3-домена. Все ссылки на нумерацию аминокислот иммуноглобулинов, или фрагментов иммуноглобулинов, или областей основаны на Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.

Fc-область IgG можно модифицировать в соответствии с хорошо известными методиками, такими как сайт-направленный мутагенез и т.п., для получения модифицированного IgG или Fc-фрагментов или их участков, которые будут связываться FcRn. Такие модификации включают модификации вдали от контактных сайтов FcRn, а также модификации в пределах контактных сайтов, которые сохраняют или даже усиливают связывание с FcRn. Например, в человеческом IgG1 Fc (Fc γ 1) могут замещаться следующие одиночные аминокислотные остатки без значительной потери Fc-связывающей аффинности к FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A и K447A, где, например, P238A представляет пролин дикого типа, замещенный аланином в положении с номером 238.

Некоторые из вышеприведенных мутаций могут придавать Fc-фрагменту новые функциональные свойства. Например, один вариант реализации включает N297A с удалением высококонсервативного сайта N-гликозилирования. Эффект этой мутации заключается в уменьшении степени гликозилирования, вследствие чего снижается эффекторная функция и/или иммуногенность. В качестве дополнительного примера новых функциональных свойств, возникающих в результате мутаций, описанных выше, в некоторых случаях можно больше повысить аффинность к FcRn, чем аффинность дикого типа. Эта повышенная аффинность может отражать повышенную скорость "ассоциации", сниженную скорость "диссоциации" или как повышенную скорость "ассоциации", так и сниженную скорость "диссоциации". Мутации, которые, как считается, придают повышенную аффинность к FcRn, включают T256A, T307A, E380A и N434A (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem., 276:6591).

В одном варианте реализации связывающий партнер FcRn представляет собой полипептид, включающий последовательность PKNSSMISNTP (SEQ ID NO:), и в некоторых случаях дополнительно включающий последовательность, выбранную из HQLSGTQ (SEQ ID NO:), HQNLSDGK (SEQ ID NO:), HQNISDGK (SEQ ID NO:) или VISSHLGQ (SEQ ID NO:) (патент США № 5739277).

Специалисты в данной области техники знакомы со многими другими Fc-мутантами или их аналогами, которые характеризуются измененной эффекторной функцией и/или FcRn-связыванием. В допол-

нение к этому способы химической модификации константных областей иммуноглобулинов (например, пегилирование) или их фрагментов (см., например, Aslam и Dent, 1998, *Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences* Macmillan Reference, London) хорошо известны в настоящем уровне техники, например в заявке на патент США 20120003210.

В одном варианте реализации Fc-фрагмент, домен или область, к которой присоединяют фрагмент, проникающий через ГЭБ, подвергают агликозилированию с использованием способов, известных в настоящем уровне техники, например, путем подвергания мутациям остатков, которые обычно являются гликозилированными или путем изменения экспрессии полипептида таким образом, что гликозилирование не происходит. В качестве примера один конкретный вариант реализации включает мутацию N297A, приводящую к удалению высококонсервативного сайта N-гликозилирования. В другом варианте реализации Fc-фрагмент включает мутацию в положении 299, например мутацию T299, приводящую к замене другой аминокислоты, как описано в патенте США 7863419. В дополнение к аланину могут замещаться другие аминокислоты на аминокислоты дикого типа в положениях, описанных выше, или которые, как известно в настоящем уровне техники, подавляют функцию Fc.

В другом варианте реализации в исследуемые связывающие молекулы могут вводиться мутации, раскрытые в Armour, K.L., Clark, M.R., Hadley, A.G., Williamson L.M. (1999), *Eur. J. Immunol.*, 29:2613-2624.

Мутации могут вводиться по отдельности в Fc, приводя к образованию нескольких сотен Fc-фрагментов, отличных от нативного Fc. Дополнительно могут совместно вводиться комбинации двух, трех или более этих отдельных мутаций, приводя к образованию в сотни раз больше потенциальных Fc-областей. Более того мутации может подвергаться один из Fc-фрагментов конструктора настоящего изобретения, а другой Fc-фрагмент может совсем не подвергаться мутации или они оба могут подвергаться мутации, но с использованием разных мутаций.

Также в химерном белке настоящего изобретения предполагается использовать пептидомиметики, по меньшей мере, участка константной области иммуноглобулина, например пептидомиметик Fc-фрагмента или пептидомиметик связывающего партнера FcRn. В одном варианте реализации пептидомиметик идентифицируют с использованием фагового дисплея или посредством скрининга химической библиотеки (см., например, McCafferty et al., 1990, *Nature*, 348:552; Kang et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88:4363; EP 0589877 B1).

В другом варианте реализации Fc-область настоящего изобретения (например, scFc-область) содержит, по меньшей мере, участок Fc-молекулы, который, как известно в настоящем уровне техники, требуется для связывания FcγR.

В одном варианте реализации Fc-область настоящего изобретения (например, scFc-область) содержит, по меньшей мере, участок Fc-молекулы, который, как известно в настоящем уровне техники, требуется для связывания белка A. В другом варианте реализации Fc-область настоящего изобретения (например, scFc-область) содержит, по меньшей мере, участок Fc-молекулы, который, как известно в настоящем уровне техники, требуется для связывания белка G. В одном варианте реализации такая молекула не связывается с FcRn.

Как изложено в данном документе, специалисту в настоящем уровне техники будет понятно, что можно также модифицировать Fc-домен за счет включения одной или нескольких аминокислотных замен (замещений, присоединений или делеций) таким образом, что он будет отличаться по аминокислотной последовательности от Fc-фрагмента дикого типа. В настоящем уровне техники известны многие такие замены или изменения. В определенных иллюстративных вариантах реализации Fc-фрагмент сохраняет эффекторную функцию (например, связывание FcγR) и в определенных вариантах реализации Fc-фрагмент характеризуется отсутствием или снижением эффекторной функции.

Fc-домены или фрагменты полипептида настоящего изобретения можно получить из любого изотипа (A, E, G или M) и можно получить из разных иммуноглобулиновых молекул. Например, Fc-домен или фрагмент полипептида может содержать CH2- и/или CH3-домен, полученный из молекулы IgG1, и шарнирную область, полученную из молекулы IgG3. В другом примере Fc-домен или фрагмент может содержать химерную шарнирную область, частично полученную из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG3. В другом примере Fc-домен или фрагмент может содержать химерную шарнирную область, частично полученную из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG4.

Полипептиды, содержащие линкерные пептиды настоящего изобретения, можно получить с использованием методик, которые известны в настоящем уровне техники. В одном варианте реализации полипептиды настоящего изобретения "получают с помощью рекомбинантной ДНК", т.е. получают с использованием технологии рекомбинантной ДНК. В данном документе более подробно изложены иллюстративные методики получения полипептидов настоящего изобретения.

Как используется в данном документе, выражение "фармацевтически приемлемый носитель" означает химическую композицию или соединение, с которым можно комбинировать активный ингредиент и который после комбинации можно использовать для введения активного ингредиента субъекту. Как используется в данном документе, выражение "физиологически приемлемый" сложный эфир или соль означает сложный эфир или соль из активного ингредиента, который совместим с любыми другими ингре-

диентами фармацевтической композиции, который не оказывает вредного воздействия на субъекта, которому необходимо вводить композицию. Как используется в данном документе, "фармацевтически приемлемый носитель" также включает, но без ограничений, один или несколько из следующего перечня: вспомогательные вещества; поверхностно-активные вещества; диспергирующие средства; инертные разбавители; средства для гранулирования и дезинтегрирующие средства; связывающие средства; смазывающие средства; подсластители; ароматизирующие средства; окрашивающие средства; консерванты; физиологически разлагаемые композиции, такие как желатин; водные растворы и растворители; масляные растворы и растворители; суспендирующие средства; диспергирующие или увлажняющие средства; эмульгирующие средства, смягчительные средства; буферы; соли; загустители; наполнители; эмульгирующие средства; антиоксиданты; стабилизаторы; и фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные материалы. Другие "дополнительные ингредиенты", которые можно включить в фармацевтические композиции настоящего изобретения, известны в настоящем уровне техники и описаны, например, в Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., который включен в данный документ посредством ссылки.

Как используется в данном документе, "эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для получения терапевтического ответа.

Как используется в данном документе, выражение "протеинопатия" относится к нарушениям, которые отличаются наличием неправильно упакованных белков или агрегированных белков, причем нарушения имеют генетический компонент.

II. Антитела, проникающие через ГЭБ.

В одном варианте реализации фрагмент, проникающий через ГЭБ, представляет собой фрагмент, который описан патенте США 7943129. Например, в одном варианте реализации фрагмент, проникающий через ГЭБ, содержит аминокислотную последовательность, изложенную в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58 (FC5), SEQ ID NO: 86 (FC44) и SEQ ID NO: 87 (FC7), как изложено в патенте США 7943129. В одном варианте реализации фрагмент, проникающий через ГЭБ, представляет собой FC5-фрагмент. FC5 представляет собой антитело, состоящее из тяжелых цепей (НСА, также называемое антителом, состоящим из двух тяжелых цепей, V_{H} или однодоменным антителом), полученное из верблюдовых. По сравнению со стандартными иммуноглобулинами IgG-типа, состоящими из четырех цепей, которые также продуцируются верблюдовыми, в этих антителах отсутствуют легкие цепи и СН1-домены стандартных иммуноглобулинов. Одним из отличительных признаков этих встречающихся в природе антител, состоящих из тяжелых цепей, является численно преобладающее присутствие Glu, Arg и Gly соответственно в положениях 44, 45 и 47 (нумерация по Kabat) на границе с V_L их варибельного домена (обозначенного V_{H}). Те же самые положения в варибельном домене тяжелой цепи стандартных антител, состоящих из четырех цепей (обозначенных V_{H}), почти исключительно заняты Gly, Leu и Trp. Считается, что эти различия отвечают за высокую растворимость и стабильность варибельного домена (V_{H}) верблюжьего НСА по сравнению с относительной нерастворимостью V_{H} -домена стандартных антител, состоящих из четырех цепей. Двумя более ключевыми признаками верблюжьих V_{H} -доменов являются их сравнительно более длинный CDR3 и высокая частота встречаемости цистеиновых пар в CDR. Оказывается, что цистеиновые пары опосредуют образование дисульфидного мостика и следовательно вовлечены в модуляцию поверхностной топологии антигенсвязывающего центра. В кристаллической структуре комплекса верблюжьего sdAb-лизоцима жесткая петля, выступающая из sdAb и частично стабилизированная дисульфидной связью CDR, выходит за пределы антигенсвязывающего центра и глубоко проникает в активный сайт лизоцима (Desmyter et al., Nature Struct. Biol., 3, 803-811 (1996)).

В одном варианте реализации антитело, проникающее через ГЭБ, связывается с TMEM30A (C6orf67, CDC50A). Иллюстративные фрагменты, которые связываются с TMEM30A, известны или могут быть получены с использованием способов, хорошо известных в настоящем уровне техники. Например, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность TMEM30A или ее участок, можно использовать для получения антител, которые специфически распознают аминокислотную последовательность TMEM30A, или для скрининга связывающих фрагментов, которые специфически связываются с TMEM30A, из библиотеки сайтов связывания. Сайты связывания из таких антител или полученных из библиотек можно использовать в связывающей молекуле настоящего изобретения. Аминокислотная последовательность TMEM30A показана ниже.

10	20	30	40	50	60
MAMNYNAKDE	VDGGPPCAPG	GTAKTRRPDN	TAFKQQLPA	WQFILTAGTV	LPIFFIIGLI
	70	80	90	100	110
FIPIGIGIFV	TSNNIREIEI	DYTGTEPSSP	CNKCLSPDVT	PCFCTINFTL	EKSFEQNVFM
	130	140	150	160	170
YYGLSNFYQN	HRRYVKSRDD	SQLNGDSSAL	LNPSKECEPY	RRNEDKPIAP	CGAIANSMFN
	190	200	210	220	230
DTLEFLFLIGN	DSYPIPIALK	KKGIAWWTDK	NVKFRNPPGG	DNLEERFKGT	TKPVNWLKPV
	250	260	270	280	290
YMLDSDPDNN	GFINEFIVW	MRTAALPTFR	KLYRLIERKS	DLHPTLPAGR	YSLNVTYNYF
	310	320	330	340	350
VHYFDGRKRM	ILSTISWMMG	KNPFLGIAYI	AVGSISFLLG	VVLLVINHKY	RNSSNTADIT

Полипептиды настоящего изобретения могут содержать варибельную область или ее участок (например, V_L - и/или V_H -домен), полученный из антитела, которое связывается с ТМЕМ30А, с использованием принятых в настоящем уровне техники протоколов. Например, варибельный домен можно получить из антитела, которое продуцирует не относящееся к человеку млекопитающее, например мышь, морскую свинку, примата, кролика или крысу, путем иммунизации млекопитающего антигеном или его фрагментом. См. Harlow и Lane выше, который включен посредством ссылки во всех отношениях. Иммуноглобулин можно получить путем многократных подкожных или внутривенных инъекций соответствующего антигена (например, очищенных опухлеассоциированных антигенов или клеток или клеточных экстрактов, содержащих такие антигены) и адьюванта. Эта иммунизация, как правило, вызывает иммунный ответ, который включает продукцию антиген-реактивных антител активированными спленоцитами или лимфоцитами.

Тогда как варибельную область можно получить из поликлональных антител, собранных из сыворотки иммунизированного млекопитающего, часто желательнее выделить отдельные лимфоциты из селезенки, лимфоузлов или периферической крови для обеспечения гомогенных препаратов моноклональных антител (МАТ), из которых получают желаемую варибельную область. Для получения поликлональных антител, как правило, используют кроликов или морских свинок. Для получения моноклональных антител, как правило, используют мышей. Моноклональные антитела к фрагменту можно получить путем инъекции фрагмента антигена мышам, получения "гибридом" и скрининга гибридом на антитело, которое специфически связывается с антигеном. В этом широко известном процессе (Kohler et al. (1975), Nature, 256:495) происходит слияние относительно короткоживущих или подвергающихся гибели лимфоцитов мыши, которой вводили антиген, с линией immortalized опухлевых клеток (например, линия миеломных клеток), таким образом, с получением гибридных клеток или "гибридом", которые как являются immortalized, так и способны продуцировать антитело, генетически кодируемое В-клеткой. Полученные в результате гибриды разделяют на отдельные генетические штаммы за счет селекции, разведения и повторного выращивания, при этом каждый отдельный штамм содержит специфические гены для образования одного антитела. Они продуцируют антитела, которые являются гомогенными по отношению к желаемому антигену и применительно к их чистому генетическому происхождению их называют "моноклональными".

Клетки гибридомы, полученные таким образом, можно сеять и выращивать в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживание не слитых, родительских миеломных клеток. Для специалистов в данной области техники будет понятно, что для образования, селекции и выращивания гибридом коммерчески доступны из множества источников реактивы, линии клеток и среды и составлены стандартизованные протоколы на надлежащем уровне. В целом культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, анализируют на продукцию моноклональных антител к желаемому антигену. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют путем иммунопреципитации или путем *in vitro* анализа, такого как радиоиммунный анализ (РИА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). После идентификации клеток гибридомы, которые продуцируют антитела с желаемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, можно субклонировать клоны с использованием методик предельного разведения и выращивать с использованием стандартных способов (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, p. 59-103 (Academic Press, 1986)). Дополнительно будет понятно, что из культуральной среды, асцитической жидкости или сыворотки можно выделить

моноклональные антитела, секретируемые субклонами, с помощью стандартных методик очистки, таких как, например, аффинная хроматография (например, аффинная хроматография на белке-А, белке-Г или белке-Л), гидроксипатитная хроматография, гель-электрофорез или диализ.

В некоторых случаях можно проводить скрининг антител на связывание со специфической областью или желаемым фрагментом антигена без связывания с другими неперекрывающимися фрагментами антигена. Последний скрининг можно осуществить путем определения связывания антитела с коллекцией делеционных мутантов антигена и определения, какой делеционный мутант связывается с антителом. Связывание можно оценить, например, с помощью вестерн-блоттинга или ИФА. Наименьший фрагмент, который, как показано, специфически связывается с антителом, определяет эпитоп антитела. Альтернативно специфичность эпитопа можно определить путем конкурентного анализа, в котором тестируемое и контрольное антитело конкурируют за связывание с антигеном. Если тестируемые и контрольные антитела конкурируют, тогда они связываются с одинаковым эпитопом или эпитопами, которые располагаются достаточно близко, так что связывание одного антитела препятствует связыванию другого.

ДНК, кодирующую желаемое моноклональное антитело, можно без труда выделить и секвенировать с использованием любых стандартных методик, описанных выше для выделения последовательностей доменов константной области (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). Выделенные и субклонированные клетки гибридомы выступают в качестве предпочтительного источника такой ДНК. Конкретнее, выделенную ДНК (которая может быть синтетической, как описано в данном документе) можно использовать для клонирования желаемых последовательностей варибельной области для встраивания в полипептиды настоящего изобретения.

В других вариантах реализации сайт связывания получают из полностью человеческого антитела. Человеческие или по сути человеческие антитела могут вырабатываться у трансгенных животных (например, мышей), которые неспособны к продукции эндогенных иммуноглобулинов (см., например, патенты США № 6075181, 5939598, 5591669 и 5589369, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки). Например, было описано, что гомозиготная делеция области антитела, связывающей тяжелые цепи, у химерных мышей и мышей с терминальной мутацией приводит к полному ингибированию эндогенной продукции антител. Перенос генной матрицы иммуноглобулина человека таким мышам с терминальной мутацией будет приводить к продукции человеческих антител при антигенной стимуляции. Другие предпочтительные способы выработки человеческих антител с использованием мышей SCID раскрыты в патенте США № 5811524, который включен в данный документ посредством ссылки. Будет понятно, что также можно выделить связанный с этими человеческими антителами генетический материал и производить с ним манипуляции, как описано в данном документе.

Еще одни высокоэффективные способы выработки рекомбинантных антител раскрыты Newman, *Biotechnology*, 10:1455-1460 (1992). Конкретно этот метод приводит к выработке приматизированных антител, которые содержат варибельные домены обезьяны и человеческие константные последовательности. Этот источник включен в данный документ посредством ссылки в ее полноте. Более того этот метод также описан в принадлежащих одному и тому же правообладателю патентах США № 5658570, 5693780 и 5756096, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

В другом варианте реализации путем микроманипуляции можно отобрать лимфоциты и выделить варибельные гены. Например, мононуклеары периферической крови можно выделить из иммунизированного млекопитающего и культивировать в течение примерно 7 суток *in vitro*. Можно провести скрининг культур на специфические антитела, которые удовлетворяют критериям скрининга. Можно выделить клетки из положительных лунок. Отдельные Ig-продуцирующие В-клетки можно выделить с помощью FACS или за счет идентификации в анализе комплемент-опосредованного образования гемолитических бляшек. С Ig-продуцирующими В-клетками можно производить микроманипуляции в пробирке, а гены V_H и V_L можно амплифицировать с использованием, например, RT-PCR. Гены V_H и V_L можно клонировать в вектор для экспрессии антитела и трансфицировать в клетки (например, эукариотические или прокариотические клетки) для экспрессии.

Альтернативно варибельные (V) домены можно получить из библиотек последовательностей варибельных генов из предпочтительного животного. Для идентификации элементов, которые имеют желаемые характеристики связывания, можно провести скрининг библиотек, экспрессирующих произвольные комбинации доменов, например V_H - и/или V_L -доменов, с использованием желаемого антигена. Способы такого скрининга хорошо известны в настоящем уровне техники. Например, репертуары генов антител можно клонировать в λ вектор экспрессии на основе бактериофага λ (Huse, WD et al. (1989), *Science*, 247:1275). В дополнение к этому, можно провести скрининг клеток (Francisco et al. (1994), *PNAS*, 90:10444; Georgiou et al. (1997), *Nat. Biotech.*, 15:29; Boder, Wittrup (1997), *Nat. Biotechnol.*, 15:553; Boder et al. (2000), *PNAS*, 97:10701; Daugherty, P. et al. (2000), *J. Immunol. Methods.*, 243:211) или вирусов (например, Hoogenboom, HR. (1998), *Immunotechnology* 4:1; Winter et al. (1994), *Annu Rev Immunol*, 12:433; Griffiths, A.D. (1998), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9:102), экспрессирующих антитела на их поверхности.

Специалисты в данной области техники также поймут, что ДНК, кодирующую варибельные домены антител, можно также получить из библиотек антител, экспрессированных в фаге, дрожжах или бак-

териях, с использованием способов, известных в настоящем уровне техники. Иллюстративные способы изложены, например, в EP 368684 B1; патенте США № 5969108; Hoogenboom et al. (2000), *Immunol. Today*, 21:371; Nagy et al. (2002), *Nat. Med.*, 8:801; Huie et al. (2001), *PNAS*, 98:2682; Lui et al. (2002), *J. Mol. Biol.*, 315:1063, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. В нескольких публикациях (например, Marks et al. (1992), *Bio/Technology*, 10:779-783) в качестве стратегии для конструирования больших фаговых библиотек была описана продукция высокоаффинных человеческих антител за счет рекомбинации цепей, а также комбинаторного инфицирования и *in vivo* рекомбинации. В другом варианте реализации для замены бактериофага можно использовать рибосомный дисплей в качестве платформы дисплея (см., например, Hanes et al. (1998), *PNAS*, 95:14130; Hanes, Pluckthun (1999), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 243:107; He, Taussig. (1997), *Nuc. Acids Res.*, 25:5132; Hanes et al. (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18:1287; Wilson et al. (2001), *PNAS*, 98:3750; или Irving et al. (2001), *J. Immunol. Methods*, 248:31).

Иллюстративные библиотеки для скрининга представляют собой библиотеки человеческих вариативных генов. Также можно использовать V_L - и V_H -домены из источника, не относящегося к человеку. Библиотеки могут быть наивными, полученными от иммунизированных субъектов или полусинтетическими (Hoogenboom, Winter (1992), *J. Mol. Biol.*, 227:381; Griffiths et al. (1995), *EMBO J.*, 13:3245; de Kruif et al. (1995), *J. Mol. Biol.*, 248:97; Barbas et al. (1992), *PNAS*, 89:4457). В одном варианте реализации для создания библиотеки молекул нуклеиновых кислот, имеющих большую гетерогенность, можно вводить мутации в иммуноглобулиновые домены (Thompson et al. (1996), *J. Mol. Biol.*, 256:77; Lamminmaki et al. (1999), *J. Mol. Biol.*, 291:589; Caldwell, Joyce (1992), *PCR Methods Appl.*, 2:28; Caldwell, Joyce (1994), *PCR Methods Appl.*, 3:S136). Для отбора высокоаффинных вариантов можно использовать стандартные методики скрининга. В другом варианте реализации для повышения авидности антител можно осуществлять замены в последовательностях V_H и V_L , например, с использованием информации, полученной от кристаллических структур, с использованием методик, известных в настоящем уровне техники.

Другая иллюстративная библиотека представляет собой библиотеку верблюжьих антител, которая содержит однодоменные антитела. Иллюстративные однодоменные молекулы включают выделенный вариативный домен тяжелой цепи (V_H) антитела, т.е. вариативный домен тяжелой цепи без вариативного домена легкой цепи, и выделенный вариативный домен легкой цепи (V_L) антитела, т.е. вариативный домен легкой цепи без вариативного домена тяжелой цепи. Иллюстративные однодоменные антитела, которые используются в связывающих молекулах настоящего изобретения, включают, например, вариативный домен тяжелой цепи антитела верблюдовых (примерно от 118 до 136 аминокислотных остатков), как описано в Hamers-Casterman et al., *Nature*, 363:446-448 (1993); и Dumoulin et al., *Protein Science*, 11:500-515 (2002). Другие иллюстративные однодоменные антитела включают отдельно V_H - или V_L -домены, также известные как Dabs® (Domantis Ltd., Cambridge, UK). Другие же однодоменные антитела включают антитела акулы (например, Ig-NAR акулы). Ig-NAR акулы содержат гомодимер одного вариативного домена (V-NAR) и пять C-подобных константных доменов (C-NAR), отличающиеся тем, что разнообразие сконцентрировано в удлиненной CDR3-области, отличающейся по длине на 5-23 остатка. У видов верблюдовых (например, лам) вариативная область тяжелой цепи, называемая V_{HH} , образует весь антигенсвязывающий домен. Главные различия между вариативными областями V_{HH} верблюдовых и областями, полученными из стандартных антител (V_H), включают

- (a) большее количество гидрофобных аминокислот на контактной поверхности V_H легкой цепи по сравнению с соответствующей областью на V_{HH} ,
- (b) более длинный CDR3 в V_{HH} , и
- (c) частую встречаемость дисульфидной связи между CDR1 и CDR3 в V_{HH} .

Способы получения однодоменных связывающих молекул описаны в патентах США № 6005079 и 6765087, оба из которых включены в данный документ посредством ссылки. Иллюстративные однодоменные антитела, содержащие V_{HH} -домены, включают Nanobodies® (Ablynx NV, Ghent, Belgium).

Более того последовательности вариативных областей, обладающие полезными свойствами для получения полипептидов настоящего изобретения, можно получить из множество разных источников. Например, как обсуждалось выше, множество последовательностей человеческих генов доступны в форме открытых для общего доступа банков. Были опубликованы многие последовательности антител и генов, кодирующих антитела (например, антитела, которые, как известно, обладают клинически полезными свойствами), и с использованием принятых в настоящем уровне техники методик из этих последовательностей можно синтезировать подходящие последовательности вариативных областей (например, последовательности V_L и V_H).

В другом варианте реализации домен связывания полипептида настоящего изобретения состоит из V_H -домена, например, полученного у верблюдовых, который является стабильным в отсутствие V_L -цепи (Hamers-Casterman et al. (1993), *Nature*, 363:446; Desmyter et al. (1996), *Nat. Struct. Biol.*, 3:803; Decantere et al. (1999), *Structure*, 7:361; Davies et al. (1996), *Protein Eng.*, 9:531; Kortt et al. (1995), *J. Protein Chem.*, 14:167).

Полипептид настоящего изобретения может содержать вариативный домен или CDR(s), получен-

ные из полностью мышинового, полностью человеческого, химерного, гуманизированного, нечеловекообразных приматов или приматизированного антитела. С использованием принятых в настоящем уровне техники методик можно изменить антитела, не относящиеся к человеческим, или их фрагменты, или домены для снижения их иммуногенности. Гуманизированные антитела представляют собой антитела, полученные из антител, не относящихся к человеческим, которые модифицировали так, чтобы они сохранили или в значительной степени сохранили свойства связывания исходного антитела, но которые являются менее иммуногенными для людей, чем исходные антитела, не относящиеся к человеческим. В случае гуманизированных антител-мишеней этого можно достичь различными способами, включая

(a) пересадку полных вариабельных доменов, не относящихся к человеческим, в человеческие константные области для создания химерных антител-мишеней;

(b) пересадку по меньшей мере части одной или нескольких не относящихся к человеческим областей, определяющих комплементарность (CDR), в каркас человеческого антитела и константные области с или без сохранения особо важных остатков каркаса;

(c) трансплантацию полных вариабельных доменов, не относящихся к человеческим, но "маскируя" их с помощью фрагмента, характерного для человеческого антитела, за счет замены поверхностных остатков.

Такие способы раскрыты в Morrison et al. (1984), PNAS, 81:6851-5; Morrison et al. (1988), Adv. Immunol., 44:65-92; Verhoeyen et al. (1988), Science, 239:1534-1536; Padlan (1991), Molec. Immun., 28:489-498; Padlan (1994), Molec. Immun., 31:169-217; и патентах США № 5585089, 5693761 и 5693762, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Для уменьшения иммуногенности полипептида настоящего изобретения также можно использовать деиммунизацию. Как используется в данном документе, выражение "деиммунизация" включает модификацию Т-клеточных эпитопов (см., например, WO 9852976 A1, WO 0034317 A2). Например, анализируют последовательности V_H и V_L и составляют "карту" человеческих Т-клеточных эпитопов из каждой V-области, на которой показана локализация эпитопов по отношению к областям, определяющим комплементарность (CDR), и другим ключевым остаткам в пределах последовательности. Для того чтобы идентифицировать альтернативные аминокислотные замены с низким риском изменения активности конечного антитела, анализируют отдельные Т-клеточные эпитопы из карты Т-клеточных эпитопов. Конструируют ряд альтернативных последовательностей V_H и V_L , содержащих комбинации аминокислотных замен, и эти последовательности впоследствии встраивают в ряд полипептидов настоящего изобретения, которые тестируют на функциональность. Как правило, составляют и тестируют от 12 до 24 вариантов антител. Полные гены тяжелых и легких цепей, содержащие модифицированные человеческие V- и C-области, затем клонируют в векторы экспрессии и последующие плазмиды вводят в линии клеток для получения полного антитела. Антитела затем сравнивают в соответствующих биохимических и биологических анализах и идентифицируют оптимальный вариант.

В одном варианте реализации вариабельные домены, используемые в полипептиде настоящего изобретения, изменяют за счет по меньшей мере частичной замены одного или нескольких CDR. В другом варианте реализации в некоторых случаях могут изменять вариабельные домены, например, за счет частичной замены каркасной области и изменения последовательности. При составлении гуманизированной вариабельной области CDR можно получить из антитела того же класса или даже подкласса, что и антитело, из которого получают каркасные области, однако подразумевается, что CDR будут получены из антитела другого класса и предпочтительно из антитела из другого вида. Возможно, не понадобится заменять все CDR на полные CDR из донорской вариабельной области для переноса антигенсвязывающей способности одного вариабельного домена на другой. Скорее, возможно, только понадобится перенос тех остатков, которые необходимы для поддержания активности связывающего домена. Учитывая объяснения, изложенные в патентах США № 5585089, 5693761 и 5693762, вполне в пределах компетенции специалистов в данной области техники находится получение функционального антигенсвязывающего сайта со сниженной иммуногенностью либо за счет проведения обычного исследования, либо за счет тестирования методом проб и ошибок.

FC5, который является иллюстративным TМЕМ30А-связывающим фрагментом, можно встроить в полипептид настоящего изобретения. Аминокислотная последовательность FC5 изложена ниже.

```

E V Q L Q A S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G F K I T H Y T M
G W F R Q A P G K E R E F V S R I T W G G D N T F Y S N S V K G R F
T I S R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A D Y Y C A A G S T S
T A T P L R V --- D Y W G K G T Q V T V S S

```

III. Выборочные линкерные пептиды.

Полипептиды настоящего изобретения в некоторых случаях включают по меньшей мере один линкерный пептид. В одном варианте реализации в полипептиде полипептида настоящего изобретения присутствуют два или более линкерных пептидов. В другом варианте реализации полипептид настоящего изобретения содержит 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 линкерных пептидов.

Линкерные пептиды настоящего изобретения могут встречаться один раз в заданном положении

или могут встречаться многократно (т.е. последовательность линкерного пептида может повторяться x раз в последовательности) в заданном положении в рекомбинантном полипептиде. Например, в одном варианте реализации линкерный пептид настоящего изобретения повторяется в заданном положении в полипептиде от 1 до 10 раз (включительно). В другом варианте реализации линкерный пептид встречается в заданном положении в полипептиде 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз.

Линкерные пептиды настоящего изобретения могут иметь разную длину. В одном варианте реализации длина линкерного пептида настоящего изобретения составляет от примерно 5 до примерно 75 аминокислот. В другом варианте реализации длина линкерного пептида настоящего изобретения составляет от примерно 5 до примерно 50 аминокислот. В другом варианте реализации длина линкерного пептида настоящего изобретения составляет от примерно 10 до примерно 40 аминокислот. В другом варианте реализации длина линкерного пептида настоящего изобретения составляет от примерно 15 до примерно 35 аминокислот. В другом варианте реализации длина линкерного пептида настоящего изобретения составляет от примерно 15 до примерно 20 аминокислот. В другом варианте реализации длина линкерного пептида настоящего изобретения составляет 15 аминокислот.

Линкерные пептиды так часто используются в белковой инженерии, что они стали стандартными компонентами сборки в синтетической биологии (см., например, Anderson, J.C. et al., *Journal of Biological Engineering*, 2010, 4:1; и веб-сайт [partsregistry](http://partsregistry.org), на котором приводится перечень стандартных биологических компонентов, используемых в генетических конструктах).

Некоторые примеры текущих, принятых в настоящем уровне техники применений для линкерных пептидов включают применения в молекулах scFv (Freund et al., *FEBS*, 1993, 320:97); одноцепочечных иммуноглобулиновых молекулах (Shu et al., 1993, *PNAS, USA*, 90:7995); миниантителах (Hu et al., 1996, *Cancer Res.*, 56:3055); CH2-антителах с удаленными доменами (Mueller, B.M. et al., 1990, *PNAS, USA*, 87:5702); одноцепочечных биспецифических антителах (Schlerethe et al., 2005, *Cancer Res.*, 65:2882); полноразмерных IgG-подобных биспецифических антителах (Marvin, J.S. et al., 2005, *Acta Pharmacol Sin* 26:649; источники, цитированные в данном документе, а также Michaelson, J.S. et al., 2009, *MABs.*, 1:128; и Orcutt K.D. et al., 2010, *Protein Eng Des Sel.*, 23:221); слитых белках scFv (deGraaf et al., 2002, *British Journal of Cancer*, 86:811); разработке анализов комплементации фрагментов белка (Remy, I. et al., 2007, *Bio-Techiques*, 42:137).

Другие иллюстративные линкерные пептиды включают те пептиды, которые восстанавливают кислоту (например, как раскрыто в PCT/US11/66947), и их можно использовать в настоящих связывающих молекулах.

Линкерные пептиды можно присоединять к N- или к C-концу (или к обоим) полипептидов, к которым их присоединяют.

IV. Иллюстративные фармацевтически активные фрагменты.

В зависимости от болезни, или нарушения, или состояния, на которые нацелено лечение, можно успешно доставлять *in vivo* множество грузов с лекарственными средствами, например фармакологически активными средствами или эквивалентно фармацевтически активными фрагментами с использованием связывающих молекул настоящего изобретения, например связывающих молекул, содержащих сайты, обеспечивающие перенос через ГЭБ в соответствии с настоящим изобретением, например нацеленные на TMEM30A. Как используется в данном документе, выражения "фармацевтически активный фрагмент" и "фармакологическое соединение" должны относиться к любому фрагменту или соединению, приносящему пользу в лечении или уменьшению неблагоприятных последствий болезни или нарушения. Например, лечение может быть направлено на болезни или нарушения, включая нейродегенеративные болезни, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз (БАС, болезнь Лу Герига), эпилепсия, вызывающая боль, болезни накопления и рассеянный склероз.

Иллюстративные фармацевтически активные молекулы включают фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF) и инсулиноподобный фактор роста (IGF). В дополнение к этому другими соединениями, которые, как было показано, имеют терапевтический потенциал и могут доставляться с помощью антител настоящего изобретения, являются нейропептиды, включая, но без ограничений, вещество P, нейропептид Y, даларгин, альфа-синуклеин, вазоактивный интестинальный пептид (ВИП), гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), дофамин, холецистокинин (ХЦК), эндорфины, энкефалины и тиреотропин-релизинг-гормон (ТРГ). Дополнительно иллюстративные терапевтические средства могут включать цитокины, анксиолитические средства, противосудорожные средства, полинуклеотиды и трансгены, включая, например, малые интерферирующие РНК, которые можно использовать для таких нервных нарушений, включая, но без ограничений, психические болезни, такие как, например, тревожность, депрессия, шизофрения и нарушения сна, а также эпилепсии, судорожные расстройства, инсульт и цереброваскулярные нарушения, энцефалит и менингит, нарушения памяти и познавательных способностей, острая или хроническая боль (например, не поддающаяся лечению) и физическая травма.

В одном варианте реализации фармацевтически активный фрагмент содержит антигенсвязывающий сайт, который не связывается с TMEM30A. В определенных вариантах реализации полипептиды настоя-

шего изобретения имеют по меньшей мере один сайт связывания, специфичный к молекуле-мишени, отличной от ТМЕМ30А, которая опосредует биологический эффект. В одном варианте реализации сайт связывания регулирует активацию или ингибирование реакций в клетках (например, за счет связывания с рецептором клеточной поверхности, за счет того что в результате происходит прохождение активирующего или ингибирующего сигнала). В одном варианте реализации сайт связывания способен инициировать передачу сигнала, который приводит к гибели клетки (например, за счет клеточного пути, индуцированного сигналом, за счет фиксации комплемента или воздействия на груз (например, токсичный груз), который присутствует на связывающей молекуле) или который влияет на болезнь или нарушение у субъекта (например, за счет того что он опосредует или стимулирует уничтожение клеток, стимулирует фибринолиз, или стимулирует образование сгустка, или влияет на количество вещества, которое будет биодоступным). В другом варианте реализации полипептиды настоящего изобретения имеют по меньшей мере один сайт связывания, специфичный к антигену, который хотят элиминировать частично или полностью, например антиген клеточной поверхности или растворимый антиген).

В других же вариантах реализации полипептид настоящего изобретения связывается с молекулой, которая обладает полезными свойствами для лечения неврологической болезни или нарушения. Например, полипептид может связываться с антигеном, который присутствует на нервной клетке (например, нейрон, глиальная клетка или а). В определенных вариантах реализации антиген, связанный с неврологическим нарушением, может быть связан с аутоиммунным или воспалительным нарушением, описанным выше. Как используется в данном документе, выражение "неврологическая болезнь или нарушение" включает нарушения или состояния у субъекта, отличающиеся тем, что нервная система в равной степени дегенерирует (например, нейродегенеративные нарушения, а также нарушения, при которых нервная система не в состоянии развиваться надлежащим образом или не в состоянии регенерировать после повреждения, например повреждения спинного мозга). Примеры неврологических нарушений, которые можно диагностировать, предотвращать или лечить с помощью способов и композиций настоящего изобретения, включают, но без ограничений, рассеянный склероз, болезнь Хантингтона, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, нейропатическую боль, травматическое повреждение головного мозга, синдром Гийена-Барре и хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (ХВДП).

Дополнительные иллюстративные фармакологически активные фрагменты обсуждаются дополнительно ниже.

i. Антигенсвязывающие участки.

В определенных вариантах реализации фармацевтически активный фрагмент содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий участок (сайт связывания), например, антитела или однодоменного антитела. В одном варианте реализации антигенсвязывающий участок направляет композицию в клетки или ткань определенного типа клеток.

В других вариантах реализации сайт связывания фармацевтически активного фрагмента настоящего изобретения может содержать антигенсвязывающий участок или фрагмент. Выражение "антигенсвязывающий участок" относится к полипептидному фрагменту иммуноглобулина, антителу или варианту антитела, который связывает антиген или конкурирует с интактным антителом (т.е. с интактным антителом, из которого их получили) за связывание антигена (т.е. специфическое связывание). Например, антигенсвязывающие фрагменты можно получить из антител или вариантов антител, описанных выше.

Антигенсвязывающие участки можно получить с помощью рекомбинантных или биохимических способов, которые хорошо известны в настоящем уровне техники. Иллюстративные антиген-связывающие фрагменты включают V_H и/или V_L (если и той, и другой вариабельной области отдельно достаточно для связывания антигена), F_v , Fab , Fab' и $(Fab')_2$.

В других вариантах реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения может содержать сайт связывания из одноцепочечной связывающей молекулы (например, одноцепочечной вариабельной области или $scFv$). Методики, описанные для получения одноцепочечных антител (патент США № 4694778; Bird, Science, 242:423-442 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:5879-5883 (1988); и Ward et al., Nature, 334:544-554 (1989)), можно адаптировать для получения одноцепочечных связывающих молекул. Одноцепочечные антитела образуются за счет соединения фрагментов тяжелой и легкой цепи FV -области через аминокислотный мостик, что приводит к образованию одноцепочечного антитела. Также можно использовать методики для сборки функциональных Fv -фрагментов у *E. coli* (Skerra et al., Science, 242:1038-1041 (1988)).

В определенных вариантах реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит один или несколько сайтов связывания или областей, содержащих или состоящих из последовательности одноцепочечной вариабельной области ($scFv$). Последовательности одноцепочечной вариабельной области включают один полипептид, имеющий один или несколько антигенсвязывающих сайтов, например V_L -домен, соединенный через линкерный пептид с V_H -доменом. V_L - и/или V_H -домены можно получить из антител, известных в настоящем уровне техники, или их вариантов. Молекулы $ScFv$ можно сконструировать в ориентации V_H -линкер- V_L или ориентации V_L -линкер- V_H .

В определенных вариантах реализации молекула $scFv$, используемая в фармацевтически активном фрагменте настоящего изобретения, представляет собой стабилизированную молекулу $scFv$. В одном

варианте реализации стабилизированная молекула scFv может содержать линкерный пептид, размещенный между V_H -доменом и V_L -доменом, и отличается тем, что V_H - и V_L -домены соединяются посредством дисульфидной связи между аминокислотой в V_H - и аминокислотой в V_L -домене. В других вариантах реализации стабилизированная молекула scFv может содержать scFv-линкер, имеющий оптимизированную длину или композицию. В других же вариантах реализации стабилизированная молекула scFv может содержать V_H - или V_L -домен, имеющий по меньшей мере одну стабилизирующую(ие) аминокислотную(ые) замену(ы). Еще в одном варианте реализации стабилизированная молекула scFv может иметь по меньшей мере два вышеперечисленных стабилизирующих признака.

Стабилизированные молекулы ScFv имеют улучшенную стабильность белка или придают улучшенную стабильность белку полипептиду, с которым они функционально связаны. Иллюстративные стабилизированные молекулы ScFv, которые могут присутствовать в полипептидах настоящего изобретения, описаны в заявке на патент США № 11/725970, поданной 19 марта 2007 г., которая включена в данный документ посредством ссылки в ее полноте.

В определенных иллюстративных вариантах реализации фармацевтически активные фрагменты настоящего изобретения включают по меньшей мере одну молекулу scFv, которая функционально связана через линкерный пептид с С-концом и/или N-концом Fc-области.

В одном варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит по меньшей мере одну CDR из антитела, которое распознает желаемую мишень. В другом варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит по меньшей мере две CDR из антитела, которое распознает желаемую мишень. В другом варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит по меньшей мере три CDR из антитела, которое распознает желаемую мишень. В другом варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит по меньшей мере четыре CDR из антитела, которое распознает желаемую мишень. В другом варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит по меньшей мере пять CDR из антитела, которое распознает желаемую мишень. В другом варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит все шесть CDR из антитела, которое распознает желаемую мишень. В одном варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит полную аминокислотную последовательность молекулы антитела, которая распознает желаемую мишень (например, в случае биспецифической, четырехвалентной молекулы антитела).

Иллюстративные антитела, из которых можно получить сайты связывания для использования в фармацевтически активном фрагменте настоящего изобретения, известны в настоящем уровне техники. Например, антитела, которые в настоящее время одобрены FDA для использования в лечении, можно использовать для получения сайтов связывания. В одном варианте реализации иллюстративный сайт связывания получают из антитела к Lingo (см., например, PCT/US2008/000316).

В других аспектах фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения может содержать модифицированную молекулу антитела или антигенсвязывающий сайт (или их участки), полученные из модифицированной формы антитела. Такие иллюстративные формы включают, например, миниантитела, диатела, триотела, нанотела, camelids, Dabs, четырехвалентные антитела, интрадиатела (например, Jendreyko et al., 2003, J. Biol. Chem., 278:47813), слитые белки (например, слитые белки антитело-цитокин, белки, слитые, по меньшей мере, с участком Fc-рецептора) и биспецифические антитела. Другие модифицированные антитела описаны, например, в патенте США № 4745055; EP 256654; Faulkner et al., Nature, 298:286 (1982); EP 120694; EP 125023; Morrison, J., Immun., 123:793 (1979); Kohler et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77:2197 (1980); Raso et al., Cancer Res., 41:2073 (1981); Morrison et al., Ann. Rev. Immunol., 2:239 (1984); Morrison, Science, 229:1202 (1985); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:6851 (1984); EP 255694, EP 266663 и WO 88/03559. Реаранжированные иммуноглобулиновые цепи также известны. См., например, патент США № 4444878, WO 88/03565 и EP 68763 и источники, цитированные в данном документе.

В другом варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит антигенсвязывающий сайт или область, которая представляет собой диатело или антигенсвязывающий сайт, полученный из него. Диатела представляют собой димерные, четырехвалентные молекулы, причем каждая молекула состоит из полипептида, похожего на молекулы ScFv, но обычно имеет короткий линкер из аминокислотных остатков (например, менее чем 10 и предпочтительно 1-5), соединяющих оба переменных домена таким образом, что V_L - и V_H -домены на одной и той же полипептидной цепи не могут взаимодействовать. Вместо этого V_L - и V_H -домены одной полипептидной цепи взаимодействуют с V_H - и V_L -доменами (соответственно) на второй полипептидной цепи (см., например, WO 02/02781). В одном варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит диатело, которое функционально связано с N-концом и/или С-концом по меньшей мере одной Fc-области, слитой на уровне гена (т.е. scFc-области).

В определенных вариантах реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит сайт связывания антитела, не обеспечивающий перенос через ГЭБ (например, однодоменная связывающая молекула, которая не связывает ТЕМЕ30А, такая как однодоменное антитело).

ii. Связывающие молекулы неиммуноглобулиновой природы.

В определенных других вариантах реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит один или несколько сайтов связывания, полученных из связывающих молекул неиммуноглобулиновой природы. Как используется в данном документе, выражение "неиммуноглобулиновой природы связывающие молекулы" представляют собой связывающие молекулы, чьи сайты связывания включают аминокислотную последовательность, полученную из полипептида, отличного от иммуноглобулина. Примеры связывающих молекул, содержащих сайты связывания, полученные не из молекул антител, включают сайты, связывающие рецептор, и сайты, связывающие лиганд, которые обсуждаются более подробно ниже.

Фармацевтически активные фрагменты неиммуноглобулиновой природы могут содержать аминокислотные последовательности, которые получают из представителя суперсемейства иммуноглобулинов, который не является иммуноглобулином (например, T-клеточный рецептор или белок клеточной адгезии (например, CTLA-4, N-CAM, телокин)). В других вариантах реализации аминокислотные последовательности могут составлять топологию белка, которая не основана на укладке цепи иммуноглобулинов (например, такая как у белков с анкириновым повтором или фибронектинов), но которая тем не менее способна специфически связываться с мишенью.

Фармацевтически активные фрагменты неиммуноглобулиновой природы можно идентифицировать путем отбора или выделения варианта, связывающего мишень, из библиотеки связывающих молекул, имеющих разнообразные сайты связывания, полученные искусственным способом. С использованием полностью произвольных подходов (например, ПЦР пониженной точности, перетасовка экзонов или направленная эволюция) или при помощи принятых в данной области техники стратегий конструирования можно составить разнообразные библиотеки. Например, положения аминокислот, которые обычно вовлекаются, когда сайт связывания взаимодействует со своей родственной молекулой-мишенью, можно рандомизировать путем вставки вырожденных кодонов, тринуклеотидов, произвольных пептидов или полных петель в соответствующих положениях в пределах нуклеиновой кислоты, которая кодирует сайт связывания (см., например, публикацию заявки на патент США 20040132028). Локализацию положений аминокислот можно идентифицировать путем исследования кристаллической структуры сайта связывания в комплексе с молекулой-мишенью. Возможные положения для рандомизации включают петли, плоские поверхности, спирали и связывающие полости сайта связывания. В определенных вариантах реализации аминокислоты в пределах сайта связывания, которые являются вероятными кандидатами для введения разнообразия, можно идентифицировать по их гомологии с укладкой цепи иммуноглобулинов. Например, для создания библиотеки молекул, связывающих фибронектин, можно рандомизировать остатки в пределах CDR-подобных петель фибронектина (см., например, Koide et al., *J. Mol. Biol.*, 284: 1141-1151 (1998)). Другие участки сайта связывания, которые можно рандомизировать, включают плоские поверхности. Отбор можно производить с помощью принятых в данной области техники способов, таких как фаговый дисплей, дрожжевой дисплей или рибосомный дисплей.

В одном варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит сайт связывания из молекулы, связывающей фибронектин. Молекулы, связывающие фибронектин (например, молекулы, содержащие домены фибронектина типа I, II или III), демонстрируют CDR-подобные петли, которые в отличие от иммуноглобулинов не зависят от внутрицепочечных дисульфидных связей. Способы получения полипептидов на основе фибронектина описаны, например, в WO 01/64942 и в патентах США № 6673901, 6703199, 7078490 и 7119171, которые включены в данный документ посредством ссылки. В одном иллюстративном варианте реализации полипептидом на основе фибронектина является AdNectin® (Adnexus Therapeutics, Waltham, MA).

В другом варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит сайт связывания из Affibody® (Abcam, Cambridge, MA). Аффитела получают из иммуноглобулин-связывающих доменов стафилококкового белка A (SPA) (см. например, Nord et al., *Nat. Biotechnol.*, 15:772-777 (1997)). Способы получения сайтов связывания аффитела описаны в патентах США 6740734 и 6602977; и в WO 00/63243, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

В другом варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит сайт связывания из Anticalin® (Pieris AG, Friesing, Germany). Антикалины (также известные как липокалины) являются представителями разнообразного семейства белков, имеющих структуру типа β-бочонка, чья функция заключается в связывании молекул-мишеней в области бочонка/петли. Сайты связывания липокалина можно сконструировать путем рандомизации последовательностей петель, соединяющих цепи бочонка (см. например, Schlehuber et al., *Drug Discov. Today*, 10:23-33 (2005); Beste et al., *PNAS*, 96:1898-1903 (1999)). Сайты связывания антикалина, которые используются в связывающих молекулах настоящего изобретения, можно получить исходя из полипептидов семейства липокалинов, которые подвергаются мутациям в четырех сегментах, которые соответствуют положениям последовательностей линейной полипептидной последовательности, содержащей аминокислоты в положениях от 28 до 45, от 58 до 69, от 86 до 99 и от 114 до 129 билин-связывающего белка (BBP) *Pieris brassica*. Другие способы получения сайтов связывания антикалина описаны в WO 99/16873 и WO 05/019254, каждый из которых

включен в данный документ посредством ссылки.

В другом варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит сайт связывания из богатого цистеином полипептида. Богатые цистеином домены, которые используются в практике настоящего изобретения, как правило, не образуют структуру α -спирали, β -листа или β -бочонка. Как правило, дисульфидные связи способствуют укладке домена в трехмерную структуру. Обычно богатые цистеином домены имеют по меньшей мере две дисульфидные связи, чаще по меньшей мере три дисульфидные связи. Иллюстративным богатым цистеином полипептидом является А-домен белка. А-домены (иногда называемые "повторы типа комплемента") содержат примерно 30-50 или 30-65 аминокислот. В некоторых вариантах реализации домены включают примерно 35-45 аминокислот и в некоторых случаях примерно 40 аминокислот. В пределах 30-50 аминокислот находится примерно 6 остатков цистеина. Из шести цистеинов дисульфидные связи, как правило, обнаруживаются между следующими цистеинами: С1 и С3, С2 и С5, С4 и С6. Домен составляет лиганд-связывающий фрагмент. Остатки цистеина домена связываются посредством дисульфидной связи с образованием компактного, стабильного, функционально независимого фрагмента. Кластеры этих повторов составляют лиганд-связывающий домен, и дифференциальная кластеризация может придавать специфичность по отношению к связыванию лиганда. Иллюстративные белки, содержащие А-домены, включают, например, компоненты комплемента (например, С6, С7, С8, С9 и фактор I), сериновые протеазы (например, энтеропептидазу, матриптазу и корин), трансмембранные белки (например, ST7, LRP3, LRP5 и LRP6) и эндцитируемые рецепторы (например, сортилин-подобный рецептор, LDL-рецептор, VLDLR, LRP1, LRP2 и ApoER2). Способы получения А-доменных белков с желаемой специфичностью связывания раскрыты, например, в WO 02/088171 и WO 04/044011, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

В других вариантах реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения содержит сайт связывания из повторяющегося белка. Повторяющиеся белки представляют собой белки, которые содержат последовательные копии небольших (например, от примерно 20 до примерно 40 аминокислотных остатков) структурных единиц или повторов, которые складываются вместе с образованием непрерывных доменов. За счет регуляции количества повторов в белке можно модифицировать повторяющиеся белки, чтобы они подходили для определенного целевого сайта связывания. Иллюстративные повторяющиеся белки включают сконструированные белки с анкириновым повтором (т.е. DARPin®, Molecular Partners, Zurich, Switzerland) (см., например, Binz et al., *Nat. Biotechnol.*, 22:575-582 (2004)) или богатые лейцином повторяющиеся белки (т.е. LRRP) (см., например, Pancer et al., *Nature*, 430:174-180 (2004)). Все установленные до настоящего времени третичные структуры единиц с анкириновым повтором имеют общую характерную особенность, состоящую из Р-шпильки с последующими двумя антипараллельными а-спиралями, и заканчивающуюся петлей, соединяющей данную единицу повтора со следующей. Домены, построенные из единиц с анкириновым повтором, образуются путем укладки единиц повтора с образованием протяженной и изогнутой структуры. Сайты связывания LRRP входят в состав адаптивной иммунной системы морских миног и других бесчелюстных рыб и имеют сходство с антителами в том отношении, что они образуются путем рекомбинации ряда генов богатых лейцином повторов на протяжении созревания лимфоцитов. Способы получения сайтов связывания DARPin или LRRP описаны в WO 02/20565 и WO 06/083275, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Другие сайты связывания неиммуноглобулиновой природы, которые можно использовать в связывающих молекулах настоящего изобретения, включают сайты связывания, полученные из Src-гомологичных доменов (например, SH2- или SH3-доменов), PDZ-доменов, бета-лактамазы, высокоаффинных ингибиторов протеазы или небольших белковых каркасов, соединенных дисульфидной связью, таких как токсины скорпиона. Способы получения сайтов связывания, полученных из этих молекул, были раскрыты в данном уровне техники (см., например, Silverman et al., *Nat. Biotechnol.*, 23(12):1493-4 (2005); Panni et al., *J. Biol. Chem.*, 277:21666-21674 (2002); Schneider et al., *Nat. Biotechnol.*, 17:170-175 (1999); Legendre et al., *Protein Sci.*, 11:1506-1518 (2002); Stoop et al., *Nat. Biotechnol.*, 21:1063-1068 (2003); и Vita et al., *PNAS*, 92:6404-6408 (1995)). Другие же сайты связывания можно получить из домена связывания, выбранного из группы, состоящей из EGF-подобного домена, Kingle-домена, PAN-домена, Gla-домена, SRCR-домена, домена Кунитца/ингибитора трипсина поджелудочной железы быка, домена ингибитора сериновой протеазы типа Kazal, домена Trefoil (Р-типа), домена С-типа фактора фон Виллебранда, анафилатоксин-подобного домена, CUB-домена, повтора тиреоглобулина типа I, домена LDL-рецептора класса А, Sushi-домена, Link-домена, домена тромбоспондина типа I, иммуноглобулин-подобного домена, лектинового домена С-типа, MAM-домена, домена А-типа фактора фон Виллебранда, домена соматомедина В, корового домена WAP-типа, содержащего 4 дисульфидные связи, С-домена F5/8-типа, домена гемопексина, EGF-подобного домена типа ламинина, C2-домена, CTLA-4-домена и других таких доменов, известных специалистам в данной области техники, а также производных и/или их вариантов. Дополнительные полипептиды неиммуноглобулиновой природы включают Avimers® (Avidia, Inc., Mountain View, CA; см. публикацию международной заявки PCT № WO 06/055689 и публи-

кацию патента США 2006/0234299), Telobodies® (Biotech Studio, Cambridge, MA), Evibodies® (Evogenix, Sydney, Australia; см. патент США № 7166697) и Microbodies® (Nascacell Technologies, Munich, Germany).

iii. Связывающие участки рецепторов или лигандов.

В других аспектах фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения представляет собой лиганд-связывающий участок рецептора и/или рецептор-связывающий участок лиганда.

В других иллюстративных вариантах реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения может содержать один или несколько лиганд-связывающих доменов или рецептор-связывающих доменов, полученных из одного или нескольких из следующих белков.

а. Цитокины и рецепторы цитокинов.

Цитокины оказывают плейотропный эффект на пролиферацию, дифференцировку и функциональную активацию лимфоцитов. В слитых белках настоящего изобретения можно использовать различные цитокины или их рецептор-связывающие участки. Иллюстративные цитокины включают интерлейкины (например, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13 и ИЛ-18), колониестимулирующие факторы (КСФ) (например, гранулоцитарный КСФ (Г-КСФ), гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ) и моноцитарно-макрофагальный КСФ (М-КСФ)), фактор некроза опухоли (ФНО) альфа и бета, антиген цитотоксического Т-лимфоцита 4 (CTLA-4) и интерфероны, такие как интерферон- α , β или γ (патенты США № 4925793 и 4929554).

Рецепторы цитокинов, как правило, состоят из лиганд-специфической альфа-цепи и обычной бета-цепи. Иллюстративные рецепторы цитокинов включают рецепторы для ГМ-КСФ, ИЛ-3 (патент США № 5639605), ИЛ-4 (патент США № 5599905), ИЛ-5 (патент США № 5453491), рецептор ИЛ-10, IFN γ (EP 0240975) и семейство рецепторов ФНО (например, ФНО α (например, TNFR-1 (EP 417563), TNFR-2 (EP 417014)-рецептор лимфотоксина бета).

б. Адгезивные белки.

Адгезивные молекулы представляют собой мембраносвязанные белки, которые позволяют клеткам взаимодействовать друг с другом. В слитый белок настоящего изобретения можно встраивать различные адгезивные белки, включая хоминг-рецепторы лейкоцитов и клеточные адгезивные молекулы или их рецептор-связывающие участки. Хоминг-рецепторы лейкоцитов экспрессируются на клеточных поверхностях лейкоцитов на протяжении воспаления и включают β -1 интегрины (например, VLA-1, 2, 3, 4, 5 и 6), которые опосредуют связывание с компонентами внеклеточного матрикса, и β 2-интегрины (например, LFA-1, LPAM-1, CR3 и CR4), которые связывают молекулы клеточной адгезии (CAM) на сосудистом эндотелии. Иллюстративные CAM включают ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 и MAdCAM-1. Другие CAM включают молекулы семейства селектина, включая E-селектин, L-селектин и P-селектин.

с. Хемокины.

В слитый белок настоящего изобретения можно также встраивать хемокины, хемотаксические белки, которые стимулируют миграцию лейкоцитов по направлению к очагу инфекции. Иллюстративные хемокины включают макрофагальные белки воспаления (MIP-1-а и MIP-1-Р), хемотаксический фактор нейтрофилов и RANTES (хемокин, регулируемый активацией, экспрессируемый и секретлируемый нормальными Т-клетками).

д. Гормоны.

Иллюстративные гормоны роста для использования в качестве фармакологически активных фрагментов в слитых белках настоящего изобретения включают ренин, гормон роста человека (ГРЧ; патент США № 5834598), N-метионил гормон роста человека; гормон роста крупного рогатого скота; фактор, стимулирующий выделение гормона роста; паратиреоидный гормон (ПТГ); тиреотропный гормон (ТТГ); тироксин; проинсулин и инсулин (патенты США № 5157021 и 6576608); фолликулостимулирующий гормон (ФСГ); кальцитонин, лютеинизирующий гормон (ЛГ), лептин, глюкагоны; бомбезин; соматропин; миоллеров ингибирующий фактор; релаксин и прорелаксин; гонадотропин-ассоциированный пептид; пролактин; плацентарный лактоген; белок ОВ; или миоллеров ингибирующий фактор.

е. Рецепторы и лиганды.

В одном варианте реализации фармацевтически активный фрагмент настоящего изобретения объединяет сайт(ы) связывания лиганда или рецептора (например, внеклеточный домен (ECD) рецептора) по меньшей мере с одной Fc-областью, слитой на уровне гена (т.е. scFc-областью). В определенных вариантах реализации сайт связывания или домен лиганд-связывающего участка рецептора можно получить из рецептора, связанного антителом или вариантом антитела. В других вариантах реализации лиганд-связывающий участок рецептора получают из рецептора, выбранного из группы, состоящей из рецептора суперсемейства иммуноглобулинов (Ig) (например, растворимого Т-клеточного рецептора, например mTCR® (Medigene AG, Munich, Germany), рецептора суперсемейства ФНО-рецепторов, описанных выше (например, растворимого рецептора ФНО α иммуноадгезина), рецептора семейства рецепторов глиального нейротрофического фактора (GDNF) (например, GFR α 3), рецептора суперсемейства сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR), рецептора суперсемейства рецептоных тирозинкиназ (ТК), рецептора суперсемейства лиганд-зависимых (LG) рецепторов, рецептора суперсемейства хемокиновых рецепторов, суперсемейства ИЛ-1/толл-подобных рецепторов (TLR) и суперсемейства цитокиновых рецепторов.

В других вариантах реализации сайт связывания или домен рецептор-связывающего участка лиганда можно получить из лиганда, связанного антителом или вариантом антитела. Например, лиганд может связывать рецептор, выбранный из группы, состоящей из рецептора суперсемейства иммуноглобулинов (Ig), рецептора суперсемейства ФНО-рецепторов, рецептора суперсемейства сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR), рецептора суперсемейства рецепторных тирозинкиназ (ТК), рецептора суперсемейства лиганд-зависимых (LG) рецепторов, рецептора суперсемейства хемокиновых рецепторов, суперсемейства ИЛ-1/толл-подобных рецепторов (TLR) и суперсемейства цитокиновых рецепторов. В одном иллюстративном варианте реализации сайт связывания рецептор-связывающего участка лиганда получают из лиганда, принадлежащего супер семейству лигандов ФНО (например, CD40L).

В слитые белки настоящего изобретения можно встроить факторы роста или их рецепторы (их рецептор-связывающие или лиганд-связывающие участки). Иллюстративные факторы роста включают фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и его изоформы (патент США № 5194596); факторы роста фибробластов (FGF), включая aFGF и bFGF; предсердный натрийуретический фактор (ANF); факторы роста гепатоцитов (HGF; патенты США № 5227158 и 6099841), нейротрофические факторы, такие как нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), лиганды нейротрофического фактора глиальных клеток (например, GDNF, нейротурин, артемин и персефин), нейротрофин-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT-4, NT-5 или NT-6), или фактор роста нервов, такой как NGF-β фактор роста тромбоцитов (PDGF) (патенты США № 4889919, 4845075, 5910574 и 5877016); трансформирующие факторы роста (ФНО), такие как ФНО-альфа и ФНО-бета (WO 90/14359), остеиндуктивные факторы, включая костный морфогенетический белок (BMP); инсулиноподобные факторы роста-I и -II (IGF-I и IGF-II; патенты США № 6403764 и 6506874); эритропоэтин (EPO); тромбопоэтин (TPO; фактор стволовых клеток (SCF), тромбопоэтин (TPO, с-Mpl лиганд) и полипептиды Wnt (патент США № 6159462).

Иллюстративные рецепторы факторов роста, которые можно использовать в качестве фармакологически активных фрагментов настоящего изобретения, включают рецепторы EGF; рецепторы VEGF (например, Flt1 или Flk1/KDR), рецепторы PDGF (WO 90/14425); рецепторы HGF (патенты США № 5648273 и 5686292) и нейротрофические рецепторы, включая низкоаффинный рецептор (LNGFR), также называемый p75^{NTR} или p75, который связывает NGF, BDNF и NT-3, и высокоаффинные рецепторы, которые являются представителями семейства trk рецепторных тирозинкиназ (например, trkA, trkB (EP 455460), trkC (EP 522530)).

f. Лекарственные средства.

В другом варианте реализации фармакологически активное средство представляет собой лекарственное вещество, которое используется в лечении, терапии, предотвращении или диагностике болезни или используется по-другому для улучшения физического или психического самочувствия. Такие лекарственные средства могут быть химическими соединениями, и такие иллюстративные соединения описаны более подробно в данном документе.

Настоящее изобретение можно применить для доставки других средств для лечения нарушений, оказывающих влияние на нервную систему, и его можно также применить в диагностических целях. Предпочтительные классы средств для лечения нарушений ЦНС включают

- лекарственные средства, оказывающие воздействие на синаптические и эффекторные окончания; общие и местные анальгетики и анестетики, такие как опиоидные анальгетики и антагонисты; снотворные средства и седативные средства;
- лекарственные средства для лечения психических нарушений, таких как депрессия, шизофрения; противосудорожные средства и противосудорожные средства;
- болезнь Хантингтона, старение и болезнь Альцгеймера;
- нейропротекторные средства (такие как антагонисты возбуждающих аминокислот и нейротропные факторы) и нейрорегенеративные средства;
- трофические факторы, такие как нейротрофический фактор головного мозга, цилиарный нейротрофический фактор или фактор роста нервов;
- лекарственные средства, направленные на лечение повреждения ЦНС или инсульта;
- лекарственные средства для лечения наркозависимости и злоупотребления наркотиками;
- аутокоиды и противовоспалительные лекарственные средства;
- химиотерапевтические средства от паразитарных инфекций и заболеваний бактериального происхождения;
- иммунодепрессивные средства и противоопухолевые лекарственные средства;
- гормоны и антагонисты гормонов;
- тяжелые металлы и антагонисты тяжелых металлов;
- антагонисты неметаллических токсичных средств;
- цитостатики для лечения рака;
- диагностические вещества для использования в медицинской радиологии;
- иммуноактивные и иммунореактивные средства радиотерапии; и
- множество других средств, таких как трансмиттеры, агонисты и антагонисты их соответствующих рецепторов, их соответствующие прекурсоры или метаболиты;

антибиотики, антиспазматики, антигистаминные средства, противотошнотные средства, релаксанты, возбуждающие средства, "смысловые" и "антисмысловые" олигонуклеотиды, церебральные дилататоры, психотропные средства, противоманиакальные средства, вазодилататоры и вазоконстрикторы, антигипертензивные средства, средства для лечения мигрени, снотворные средства, гипер- или гипогликемические средства, минеральные или питательные средства, лекарственные средства против ожирения, анаболики и противоастматические средства.

Типичными активными ингредиентами (например, лекарственными средствами) может быть любое вещество, оказывающее воздействие на нервную систему или используемое для диагностических исследований нервной системы. Они описаны в Gilman et al. (1990), "Goodman and Gilman's - Фармакологические Основы Терапии", Pergamon Press, New York и включают следующие средства:

ацетилхолиновые и синтетические холиновые сложные эфиры, встречающиеся в природе холиномиметические алкалоиды и их синтетические родственные соединения: антихолинэстеразные средства, средства, возбуждающие ганглии, атропин, скополамин и родственные антимускариновые лекарственные средства, катехоламины и симпатомиметические лекарственные средства, такие как эпинефрин, норэпинефрин и дофамин, адренергические агонисты, антагонисты адренергических рецепторов, трансмиттеры, такие как ГАМК, глицин, глутамат, ацетилхолин, дофамин, 5-гидрокситриптамин и гистамин, нейроактивные пептиды;

анальгетики и анестетики, такие как опиоидные анальгетики и антагонисты; средства для премедикации и анестезирующие средства, такие как бензодиазепины, барбитураты, антигистаминные средства, фенотиазины и бутилфеноны; опиоиды; противорвотные средства; антихолинэргические лекарственные средства, такие как атропин, скополамин или гликопирролат; кокаин; производные хлорала; этхлорвинол; глутетимид; метиприлон; мепробамат; паральдегид; дисульфирам; морфин, фентанил и налоксон;

антитуссивные средства центрального действия;

психиатрические лекарственные средства, такие как фенотиазины, тioxсантены и другие гетероциклические соединения (например, галоперидол); трициклические антидепрессанты, такие как дезимипрамин и имипрамин; атипичные антидепрессанты (например, флуоксетин и тразодон), ингибиторы моноаминоксидазы, такие как изокарбоксазид; соли лития; анксиолитики, такие как хлордиазепоксид и диазепам;

противоэпилептические средства, включая гидантоины, противоконвульсивные барбитураты, иминостильбены (такие как карбамазепин), сукцинимиды, вальпроевая кислота, оксазолидиндионы и бензодиазепины;

противопаркинсонические лекарственные средства, такие как L-ДОФА/КАРБИДОПА, апоморфин, амантадин, эрголины, селегилины, ропинирол, бромокриптина мезилат и антихолинэргические средства; противоспазматические средства, такие как баклофен, диазепам и дантролен;

нейропротекторные средства, такие как антагонисты возбуждающих аминокислот, нейротрофические факторы и нейротрофический фактор головного мозга, цилиарный нейротрофический фактор или фактор роста нервов; нейротрофин (NT) 3 (NT3); NT4 и NT5; ганглиозиды; нейрогенеративные средства;

лекарственные средства для лечения наркозависимости и злоупотребления наркотиками, включающие антагонисты опиоидных рецепторов и антидепрессанты;

аутокоиды и противовоспалительные лекарственные средства, такие как гистамин, брадикинин, каллидин и их соответствующие агонисты и антагонисты;

химиотерапевтические средства от паразитарных инфекций и заболеваний бактериального происхождения;

противоопухолевые лекарственные средства, включая алкилирующие средства (например, нитрозомочевины) и антиметаболиты; хлорметины, этиленамины и метилмеламины; алкилсульфонаты; аналоги фолиевой кислоты; аналоги пиримидинов, аналоги пуринов, алкалоиды барвинка; и антибиотики.

Настоящее изобретение также полезно для доставки противотошнотных средств, релаксантов, возбуждающих средств, "смысловых" и "антисмысловых" олигонуклеотидов, церебральных дилататоров, психотропных средств, вазодилататоров и вазоконстрикторов, антигипертензивных средств, средств для лечения мигрени, гипер- или гипогликемических средств, минеральных или питательных средств, лекарственных средств против ожирения, анаболиков и противоастматических средств, противовоспалительных лекарственных средств, таких как фенилбутазон, индометацин, напроксен, ибупрофен, флурбипрофен, диклофенак, дексаметазон, преднизон и преднизолон; церебральных вазодилататоров, таких как солонксидин, винкамин, нафтидрофурила оксалат, ко-дэргокрин мезилат, цикланделат, папаверин, никотиновая кислота, противоинфекционных средств, таких как эритромицина стеарат и цефалексин, адренокортикотропного гормона, аденозиндезаминазы, рибонуклеазы, щелочной фосфатазы, ангиотензина, антител, аргиназы, аргининдезаминазы, аспарагиназы, церулеина, кальцитонина, хомотрипсина, холецистокинина, факторов свертывания крови, динорфинов, эндорфинов, энкефалинов, эритропоэтина, интерферона, катакальцина, мотилина, нейропептида Y, нейротензина, не встречающихся в природе опиоидов, окситоцина, раболя, паратиреоидного гормона, пептидов пролактина, растворимого CD-4, соматомедина,

соматостатина, соматотропина, супероксиддисмутазы, тиреотропного гормона, тканевого активатора плазминогена, трипсина, вазопрессина и аналогов таких пептидов, а также других подходящих ферментов, гормонов, белков, полипептидов, конъюгатов фермент-белок, конъюгатов антитело-гаптен, вирусных эпитопов и т.д.

V. Иллюстративные структуры полипептидов.

Иллюстративные структуры связывающих молекул настоящего изобретения показаны на прилагаемых фигурах. Например, фиг. 1 включает варианты реализации, в которых не иллюстрируется фармацевтически активный фрагмент (например, скелеты FC5Fc и FcFC5, к которым можно присоединять фармацевтически активные фрагменты), а также варианты реализации, в которых фармацевтически активный фрагмент представляет собой сайт связывания антитела. Например, в одном варианте реализации скелет связывающей молекулы настоящего изобретения (т.е. а конструкт, к которому можно присоединить фармацевтически активный фрагмент) содержит два фрагмента, обеспечивающих перенос через ГЭБ, которые ковалентно соединены (например, слиты на уровне гена) с Fc-областью, доменом или фрагментом. Фрагменты, обеспечивающие перенос через ГЭБ, могут соединяться непосредственно или через линкерный пептид. В предпочтительном варианте реализации фрагменты, обеспечивающие перенос через ГЭБ, могут соединяться с N-концом Fc-области, домена или фрагмента. В одном варианте реализации дополнительные связывающие фрагменты (например, фармакологически активные фрагменты, не относящиеся к ТМЕМ30А, в форме молекул scFv) могут также соединяться с C-концом Fc-области, домена или фрагмента.

В другом варианте реализации дополнительные фрагменты, обеспечивающие перенос через ГЭБ, могут соединяться с C-концом Fc-области, домена или фрагмента. Фрагменты, обеспечивающие перенос через ГЭБ, могут соединяться непосредственно или через линкерный пептид.

В другом варианте реализации связывающая молекула настоящего изобретения содержит фрагмент, проникающий через ГЭБ, который на N-конце слит с V_H -доменом интактной молекулы антитела. В другом варианте реализации связывающая молекула настоящего изобретения содержит фрагмент, проникающий через ГЭБ, который на N-конце слит с V_L -доменом интактной молекулы антитела. Еще в одном варианте реализации связывающая молекула настоящего изобретения содержит два фрагмента, обеспечивающих перенос через ГЭБ, которые на C-конце слиты с интактной молекулой антитела. Фрагменты, обеспечивающие перенос через ГЭБ, могут соединяться непосредственно или через линкерный пептид.

Понятно, что к любым из этих конструктов можно присоединить фармацевтически активные фрагменты (или дополнительные фармакологически активные фрагменты) с использованием способов, известных в настоящем уровне техники.

В одном варианте реализации полипептиды настоящего изобретения содержат только один фармацевтически активный фрагмент (с образованием молекулы, которая является мономерной по отношению к фармацевтически активному фрагменту, но которая является мультимерной (например, димерной) по отношению к фрагментам, обеспечивающим перенос через ГЭБ). В другом варианте реализации полипептид настоящего изобретения содержит несколько фармакологически активных фрагментов, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше фармакологически активных фрагментов. Фармацевтически активные фрагменты могут быть одинаковые или разные.

В одном варианте реализации настоящего изобретения фармацевтически активный фрагмент функционально связан через линкерный пептид с N-концом Fc-домена, области или фрагмента. В другом варианте реализации фармакологически активный фрагмент функционально связан через линкерный пептид с C-концом Fc-домена, области или фрагмента.

В других вариантах реализации два или больше фармацевтически активных фрагментов последовательно соединены друг с другом (например, через линкерный пептид). В одном варианте реализации тандемный повтор фармацевтически активных фрагментов функционально связан через линкерный пептид либо с C-концом, либо с N-концом Fc-области, домена или фрагмента.

Другие способы конъюгирования, соединения и связывания белков с фармакологически активными соединениями хорошо известны в данной области. Например, см. Wu, A.M., Senter, P.D., Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates, *Nat. Biotechnol.*, 2005 September, 23(9):1137-46; Trail, P.A., King, H.D., Dubowchik, G.M., Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer, *Cancer Immunol Immunother.*, 2003 May, 52(5):328-37; Saito, G., Swanson, J.A., Lee, K.D., Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003 Feb., 10, 55(2):199-215. Точно так же можно обеспечить настоящие антитела в комбинации с липосомой, наночастицами или другими аналогичными носителями, нагруженными фармацевтически активным соединением. Способы получения таких композиций известны в данной области (см., например, Sugano et al., Antibody Targeting of Doxorubicin-loaded Liposomes Suppresses the Growth and Metastatic Spread of Established Human Lung Tumor Xenografts in Severe Combined Immunodeficient Mice *Cancer Research*, 60, 6942-6949, Dec. 15, 2000; и Martin et al., *Nanomaterials in Analytical Chemistry*, *Analytical Chemistry News&Features*, May 1, 1998, p. 322A-327A).

Во многих эффекторных молекулах отсутствуют подходящие функциональные группы, с которыми могут соединяться связывающие полипептиды. В одном варианте реализации эффекторная молекула,

например, лекарственное средство или пролекарство, присоединяется к полипептиду через связывающую молекулу. В одном варианте реализации связывающая молекула содержит химическую связь, которая обеспечивает активацию цитотоксичности в определенном месте. Подходящие химические связи хорошо известны в настоящем уровне техники и включают дисульфидные связи, кислотно-лабильные связи, фотоллабильные связи, пептидаза-лабильные связи, тиоэфирные связи, которые образовались между сульфгидрильными и малеинимидовыми группами, и эстераза-лабильные связи. Наиболее предпочтительно, чтобы связывающая молекула содержала дисульфидную связь или тиоэфирную связь. В соответствии с настоящим изобретением связывающая молекула предпочтительно содержит реакционноспособную химическую группу. Особенно предпочтительными реакционноспособными химическими группами являются сложноэфирные группы N-сукцинимидила и сложноэфирные группы N-сульфосукцинимидила. В предпочтительном варианте реализации реакционноспособная химическая группа может ковалентно связываться с эффектором посредством образования дисульфидных связей между тиоловыми группами. В одном варианте реализации эффекторную молекулу модифицируют таким образом, чтобы она включала тиоловую группу. Специалист в данной области техники понимает, что, тиоловая группа содержит атом серы, связанный с атомом водорода и, как правило, в данном уровне техники также называется сульфгидрильной группой, которую можно обозначить как "--SH" или "RSH".

В одном варианте реализации для соединения эффекторной молекулы с полипептидом настоящего изобретения можно использовать связывающую молекулу. Связывающая молекула может быть расщепляемой или нерасщепляемой. В одном варианте реализации расщепляемая связывающая молекула представляет собой редокс-расщепляемую связывающую молекулу, так что связывающая молекула расщепляется в условиях с более низким окислительно-восстановительным потенциалом, как, например, в цитоплазме и других областях с более высокой концентрацией молекул со свободными сульфгидрильными группами. Примеры связывающих молекул, которые могут расщепляться вследствие изменения окислительно-восстановительного потенциала, включают молекулы, содержащие дисульфидные связи. Стимул, который способствует расщеплению, может появляться при внутриклеточном поглощении связывающего белка настоящего изобретения, при котором более низкий окислительно-восстановительный потенциал цитоплазмы облегчает расщепление связывающей молекулы. В другом варианте реализации снижение pH запускает высвобождение майтанзиноидного груза в клетку-мишень. Снижение pH вовлечено во многие физиологические и патологические процессы, такие как миграция эндосом, опухолевый рост, воспаление и ишемия миокарда. pH падает от физиологического 7,4 до 5-6 в эндосомах или 4-5 в лизосомах. Примеры кислоточувствительных связывающих молекул, которые можно использовать для адресной доставки в лизосомы или эндосомы раковых клеток, включают молекулы с поддающимися кислотному гидролизу связями, такими как те, что обнаружены в ацеталах, кеталах, ортоэфирах, гидразонах, трилах, *cis*-аконитилах или тиокарбамоилах (см., например, Willner et al. (1993), *Bioconj. Chem.*, 4:521-7; патенты США № 4569789, 4631190, 5306809 и 5665358). Другие иллюстративные кислоточувствительные связывающие молекулы включают дипептидные последовательности Phe-Lys и Val-Lys (King et al. (2002), *J. Med. Chem.*, 45:4336-43). Стимулом к расщеплению при внутриклеточном поглощении может служить перенос в эндосомальные компартменты с низким pH (например, лизосомы). Другие иллюстративные поддающиеся кислотному гидролизу связывающие молекулы представляют собой молекулы, которые содержат две или более поддающихся кислотному гидролизу связей для присоединения двух или более майтанзиноидов (King et al. (1999), *Bioconj. Chem.*, 10:279-88; WO 98/19705).

Расщепляемые связывающие молекулы могут быть чувствительными к расщепляющим средствам биологического происхождения, которые ассоциированы с определенной клеткой-мишенью, например, лизосомальным или опухолеассоциированным ферментам. Примеры связывающих молекул, которые могут расщепляться ферментативным путем, включают, но без ограничений, пептиды и сложные эфиры. Иллюстративные расщепляемые ферментами связывающие молекулы включают молекулы, которые чувствительны к опухолеассоциированным протеазам, таким как катепсин В или плазмин (Dubowchik et al. (1999), *Pharm. Ther.*, 83:67-123; Dubowchik et al. (1998), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8:3341-52; de Groot et al., (2000), *J. Med. Chem.*, 43:3093-102; de Groot et al. (1999), 42:5277-83). Сайты расщепления катепсина В включают дипептидные последовательности валин-цитруллин и фенилаланин-лизин (Doronina et al. (2003), *Nat. Biotech.*, 21(7):778-84); Dubowchik et al. (2002), *Bioconj. Chem.*, 13:855-69). Другие иллюстративные расщепляемые ферментами сайты включают сайты, которые образуются олигопептидными последовательностями, состоящие из 4-16 аминокислот (например, Suc- β -Ala-Leu-Ala-Leu), которые распознаются протеазами типа *trypsin* (*trypsin proteases*), такими как олигопептидаза Тимета (Thimet Oligopeptidase (TOP)), фермент, который предпочтительно вырабатывают нейтрофилы, макрофаги и другие гранулоциты.

В определенных отдельных аспектах связывающий полипептид настоящего изобретения является мультиспецифическим, например, имеет по меньшей мере один сайт связывания, который связывается с первой молекулой или эпитопом молекулы и по меньшей мере второй сайт связывания, который связывается со второй молекулой или со вторым эпитопом первой молекулы. Мультиспецифические связывающие молекулы настоящего изобретения могут содержать по меньшей мере два сайта связывания. В определенных вариантах реализации по меньшей мере два сайта связывания мультиспецифических свя-

звующих молекул настоящего изобретения представляют собой сайты, обеспечивающие перенос через ГЭБ.

VI. Синтез связывающих молекул.

После отбора структуры полипептида настоящего изобретения для получения полипептида доступно множество способов. Такие способы включают, но без ограничений, методы химического синтеза и методы экспрессии рекомбинантной ДНК.

В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к конструкту на основе нуклеиновой кислоты, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептидную молекулу настоящего изобретения. Понятно, что из-за вырожденности кода множество последовательностей нуклеиновых кислот будут кодировать аминокислотную последовательность данного полипептида. Желаемый полинуклеотид можно получить с использованием способов, известных в настоящем уровне техники (например, путем твердофазного синтеза ДНК *de novo* или путем ПЦР-мутационного ранее полученного полинуклеотида, кодирующего целевой полипептид).

Олигонуклеотид-опосредованный мутагенез является одним из способов получения замены, вставки внутри рамки считывания или изменения (например, измененный кодон) для введения кодона, кодирующего аминокислотную замену (например, во фрагмент Gc-варианта). Например, исходную ДНК полипептида изменяют за счет гибридизации олигонуклеотида, кодирующего желаемую мутацию, с одноцепочечной ДНК-матрицей. После гибридизации для синтеза полной второй комплементарной цепи матрицы используют ДНК-полимеразу, которая встраивает олигонуклеотидный праймер. В одном варианте реализации для получения полинуклеотида, кодирующего полипептид настоящего изобретения, достаточно генной инженерии, например ПЦР-мутационного на основе праймера, чтобы внести изменение согласно определениям в данном документе.

Для получения рекомбинанта полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, встраивают в соответствующее средство экспрессии, т.е. вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции встроенной кодирующей последовательности, или в случае вектора на основе РНК-вируса - необходимые элементы для репликации и трансляции.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, встраивают в вектор в надлежащую рамку считывания. Вектор экспрессии затем трансфицируют в подходящую клетку-мишень, в которой будет экспрессироваться полипептид. Методы трансфекции, известные в настоящем уровне техники, включают, но без ограничений, преципитацию фосфатом кальция (Wigler et al., 1978, Cell, 14:725) и электропорацию (Neumann et al., 1982, EMBO J., 1:841). Для экспрессии полипептида, описанного в данном документе, в эукариотических клетках можно использовать множество векторных систем, использующих механизмы экспрессии хозяина. В одном варианте реализации эукариотическая клетка - это клетка животного, включая клетки млекопитающих (например, клетки CHO, ВНК, Cos, HeLa). При экспрессии полипептида в эукариотической клетке ДНК, кодирующая полипептид, может также кодировать сигнальную последовательность, которая обеспечивает секрецию полипептида. Специалист в данной области техники поймет, что тогда, когда происходит трансляция белка, происходит отщепление сигнальной последовательности клеткой к образованию зрелого полипептида. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к зрелым полипептидам, содержащим линкерный пептид настоящего изобретения. Альтернативно, в случае если сигнальная последовательность не включена, полипептид можно выделить путем лизиса клеток.

Полипептид настоящего изобретения также может синтезироваться в трансгенном животном, таком как грызун, коза, овца, свинья или корова. Выражение "трансгенные животные" относится к животным, не относящимся к человеку, в геноме которых был встроен чужеродный ген. Этот ген присутствует в зародышевых тканях, но передается от родителя к потомству. Экзогенные гены вводят в эмбрионы на стадии одной клетки (Brinster et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82:4438). Способы получения трансгенных животных известны в настоящем уровне техники, включая трансгенику, с помощью которой получают иммуноглобулиновые молекулы (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78:6376; McKnight et al., 1983, Cell, 34:335; Brinster et al., 1983, Nature, 306:332; Ritchie et al., 1984, Nature 312:517; Baldassarre et al., 2003, Theriogenology, 59:831; Robl et al., 2003, Theriogenology, 59:107; Malassagne et al., 2003, Xenotransplantation, 10(3):267).

Векторы экспрессии могут кодировать метки, которые облегчают очистку или идентификацию полипептидов, полученных с помощью рекомбинантных методов. Примеры включают, но без ограничений, вектор pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J., 2:1791), с помощью которого кодирующую последовательность полипептида, описанного в данном документе, можно лигировать в вектор в рамку считывания с областью, кодирующей lac, таким образом, чтобы получить гибридный белок; векторы pGEX можно использовать для экспрессии белков с меткой - глутатион-S-трансферазой (GST). Эти белки обычно растворимы и могут быть легко очищены из клеток путем адсорбции на глутатион-агарозных гранулах с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы включают сайты расщепления (например, PreCission Protease (Pharmacia, Peapack, N. J.)) для облегчения удаления метки после очистки.

В целях настоящего изобретения можно использовать многочисленные различные принятые в на-

стоящем уровне техники векторные системы экспрессии.

Эти векторы экспрессии, как правило, способны реплицироваться в организмах-хозяевах либо как эписомы, либо как составляющая часть хромосомной ДНК хозяина. Векторы экспрессии могут содержать последовательности для контроля экспрессии, включая, но без ограничений, промоторы (например, эндогенные или гетерологичные промоторы), энхансеры, сигнальные последовательности, сплайс-сигнальные последовательности, энхансерные элементы и последовательности для терминации транскрипции. Предпочтительно последовательности для контроля экспрессии представляют собой эукариотические промоторные системы, присутствующие в векторах, которые способны обеспечить трансформацию или трансфекцию эукариотических клеток-хозяев. В векторах экспрессии могут также использоваться ДНК-элементы, которые получают из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус Vaccinia, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV), цитомегаловирус (CMV) или вирус SV40. Другие векторы включают использование полицистронных систем с внутренним сайтом связывания рибосомы.

Для обнаружения клеток, трансформированных с помощью желаемых последовательностей ДНК, векторы экспрессии обычно содержат селективные маркеры (например, маркеры устойчивости к ампициллину, устойчивости к гигромицину, устойчивости к тетрациклину или устойчивости к неомицину) (см., например, Itakura et al., патент США 4704362). Можно провести селекцию клеток, в которых произошла интеграция ДНК в хромосомы, за счет введения одного или нескольких маркеров, которые обеспечивают возможность селекции трансфицированных клеток-хозяев. Маркер может придавать ауксотрофному хозяину свойства, характерные для прототрофов, устойчивость к биоцидам (например, антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Ген селектируемого маркера можно либо непосредственно присоединять к последовательностям ДНК, которые необходимо экспрессировать, или вводить в ту же самую клетку путем котрансформации.

В других предпочтительных вариантах реализации полипептиды настоящего изобретения можно экспрессировать с использованием полицистронных конструктов. В этих экспрессирующих системах из одного полицистронного конструкта можно получить многочисленные представляющие интерес генные продукты, как, например, многочисленные полипептиды мультимерных связывающих белков. Для обеспечения относительно высоких уровней полипептидов настоящего изобретения в эукариотических клетках-хозяевах в этих системах преимущественно используется сайт внутренней посадки рибосомы (IRES). Сходные последовательности IRES раскрыты в патенте США № 6193980, который также включен в данный документ. Специалисты в данной области техники поймут, что для эффективного получения полного набора полипептидов, раскрытых в настоящей заявке, можно использовать такие экспрессирующие системы.

В более общем смысле, как только получили вектор или последовательность ДНК, кодирующую полипептид, можно вводить вектор экспрессии в соответствующую клетку-хозяина. Т.е. клетку-хозяина можно трансформировать. Введение плазмиды в клетку-хозяина можно осуществить посредством различных методов, хорошо известных специалисту в данной области техники. Они включают, но без ограничений, трансфекцию (включая электрофорез и электропорацию), слияние протопластов, преципитацию фосфатом кальция, слияние клеток с заключенной ДНК, микроинъекцию и инфицирование интактным вирусом. См., Ridgway, A.A.G., "Mammalian Expression Vectors", chapter 24.2, p. 470-472, Vectors, Rodriguez and Denhardt, eds. (Butterworths, Boston, Mass., 1988). Наиболее предпочтительно введение плазмиды в клетку-хозяина осуществлять посредством электропорации. Трансформированные клетки выращивают в условиях, подходящих для получения легких цепей и тяжелых цепей, и анализируют синтез тяжелых и/или легких цепей. Иллюстративные методы анализа включают твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА), радиоиммунный анализ (РИА) или флюоресцентно-активируемую клеточную сортировку (FACS), иммуногистохимию и т.п.

Как используется в данном документе, выражение "трансформация" следует использовать в широком смысле в отношении введения ДНК в реципиентную клетку-хозяина, которое изменяет генотип и вследствие этого приводит к изменению реципиентной клетки.

В том же ключе "клетки-хозяева" относятся к клеткам, которые были трансформированы с помощью векторов, сконструированных с использованием методов рекомбинантной ДНК, и кодирующие по меньшей мере один гетерологичный ген. При описаниях процессов выделения полипептидов из рекомбинантных хозяев, выражения "клетка" и "культура клеток" используются взаимозаменяемо для обозначения источника полипептида, если, конечно, не указано иное. Другими словами, выделение полипептида из данных "клеток" может означать выделение либо из всех осажденных клеток, либо из культуры клеток, содержащей как среду, так и суспендированные клетки.

Источником линии клеток-хозяев, используемых для экспрессии белка, наиболее предпочтительно являются млекопитающие; специалисты в данной области техники обладают способностью, чтобы предпочтительно определить отдельные линии клеток-хозяев, которые являются наиболее подходящими для экспрессии в них желаемого генного продукта. Иллюстративные линии клеток-хозяев включают, но без ограничений, DG44 и DUXB11 (линии клеток яичника китайского хомячка, DHFR-минус), HELA (карцинома шейки матки человека), CV1 (линия клеток почки обезьяны), COS (производное CV1 с антигеном

SV40 T), R1610 (фибробласты китайского хомячка), BALBC/3T3 (фибробласты мышцы), НАК (линия клеток почки хомячка), SP2/O (миелома мышцы), P3x63-Ag3.653 (миелома мышцы), BFA-1c1BPT (эндотелиальные клетки быка), RAJ1 (человеческие лимфоциты) и 293 (почка человека). СНО-клетки являются особенно предпочтительными. Линии клеток-хозяев, как правило, доступны из коммерческих источников, американской коллекции тканевых культур или из опубликованной литературы.

Гены, кодирующие полипептиды настоящего изобретения, также можно экспрессировать не только в клетках млекопитающих, но и в других клетках, таких как бактериальные, дрожжевые или растительные. В этом отношении будет понятно, что также можно трансформировать различные одноклеточные микроорганизмы, такие как бактерии; т.е. те микроорганизмы, которые способны расти в культурах или за счет брожения. Бактерии, которые чувствительны к трансформации, включают представителей *enterobacteriaceae*, таких как штаммы *Escherichia coli* или *Salmonella*; *Bacillaceae*, таких как *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* и *Haemophilus influenzae*. Дополнительно понятно, что при экспрессии в бактериях полипептиды, как правило, становятся частью телец включения. Полипептиды необходимо выделить, подвергнуть очистке и затем из них необходимо собрать функциональные молекулы.

В дополнение к прокариотам также можно использовать эукариотические микроорганизмы. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, наиболее широко используются среди эукариотических микроорганизмов, хотя обычно доступно множество других штаммов. Для экспрессии в *Saccharomyces*, например, широко используется плазида YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)). Эта плазида уже содержит ген TRP1, который обеспечивает селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, которые утратили способность расти в присутствии триптофана, например ATCC № 44076 или PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)).

Наличие повреждения *trp1*, характерного для генома дрожжевой клетки-хозяина, создает эффективные условия для обнаружения трансформации путем выращивания в отсутствие триптофана. Также можно использовать другие дрожжи-хозяева, такие как *Pichia*. Также по желанию используют векторы экспрессии дрожжей, имеющие последовательности для контроля экспрессии (например, промоторы), точку начала репликации, стоп-кодона и т.п. Типичные промоторы включают 3-фосфоглицераткиназу и другие гликолитические ферменты. Индуцибельные промоторы дрожжей включают в числе прочих промоторы гена алкогольдегидразы, изоцитохрома С и ферменты, отвечающие за утилизацию метанола, мальтозы и галактозы.

Альтернативно полипептид-кодирующие нуклеотидные последовательности можно встраивать в трансгены для введения в геном трансгенного животного и последующей экспрессии в молоке трансгенного животного (см., например, Deboer et al., US 5741957, Rosen, US 5304489 и Meade et al., US 5849992). Подходящие трансгены включают кодирующие последовательности для полипептидов, которые функционально связаны с промотором и энхансером из гена, специфичного для молочной железы, такого как казеин или бета-лактоглобулин.

Производство *in vitro* позволяет в промышленном масштабе получить большие количества желаемых полипептидов. Методы культивирования клеток млекопитающих в больших масштабах в условиях тканевой культуры известны в настоящем уровне техники и включают гомогенную суспензионную культуру, например, в аэролитном реакторе или в реакторе с непрерывным перемешиванием или культуру иммобилизованных или заключенных клеток, например, в полые волокна, микрокапсулы, на агарозных микрогранулах или керамических картриджах. При необходимости и/или желании растворы полипептидов можно очистить с использованием общепринятых методов хроматографии, например гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе или (иммуно-)аффинной хроматографии, например, после избирательного биосинтеза полипептида с синтетической шарнирной областью или до или после этапа НИС-хроматографии, описанной в данном документе. Для облегчения последующей очистки в некоторых случаях можно присоединять или включать в состав полипептидной последовательности последовательность с аффинной меткой (например, меткой His(6)).

Специалист в данной области техники сможет легко синтезировать меньшие пептиды для использования в связи с настоящим изобретением. Стандартные методики получения синтетических пептидов хорошо известны в настоящем уровне техники. Пептиды можно синтезировать с использованием способа твердофазного пептидного синтеза (SPPS) Merrifield (*J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149 (1964), который включен в данный документ посредством ссылки) или с использованием стандартных способов решения, хорошо известных в настоящем уровне техники (см., например, Bodanzsky, M., *Principles of Peptide Synthesis* 2nd revised ed. (Springer-Verlag, 1988 и 1993), который включен в данный документ посредством ссылки). Альтернативно можно использовать методы одновременного синтеза множества пептидов (SMPS), хорошо известные в настоящем уровне техники. Пептиды полученные по способу Merrifield можно синтезировать с использованием автоматизированных синтезаторов пептидов, такие как Applied Biosystems 431 A-01 Peptide Synthesizer (Mountain View, Calif) или с использованием ручного способа пептидного синтеза, описанных Houghten, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 82:5131 (1985), который включен в данный документ посредством ссылки.

Пептиды можно синтезировать с использованием аминокислот или аминокислотных аналогов, актив-

ные группы которых при необходимости защищают с использованием, например, *t*-бутилкарбонатной (*t*-BOC) группы или флуоренилметоксикарбонильной (Fmoc) группы. Аминокислоты и аминокислотные аналоги можно коммерчески приобрести (Sigma Chemical Co.; Advanced Chemtec) или синтезировать с использованием способов, известных в настоящем уровне техники. Пептиды, синтезированные с использованием твердофазного метода, могут связываться со смолами, включая 4-метилбензгидрилами́н (МВНА), 4-(оксиметил)-фенилацетамидометил и сополимер стирола с 1% дивинилбензола с 4-гидроксиметилфеноксиметильной якорной группой (смола Ванга), все из которых коммерчески доступны, или с полимером *p*-нитробензофеноксима (оксимная смола), который можно синтезировать, как описано De Grado, Kaiser, J. Org. Chem. 47:3258 (1982), который включен в данный документ посредством ссылки.

VII. Очистка связывающих молекул.

После экспрессии полипептиды настоящего изобретения можно очистить в соответствии со стандартными методиками в данном уровне техники, включая, например, фракционирование сульфатом аммония, аффинную колоночную хроматографию, ВЭЖХ-очистку, гель-электрофорез и т.п. (см. в целом Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Вновь синтезированный пептид можно также очистить с использованием способа, такого как обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ), или других способов разделения на основе размера или заряда пептида. Кроме того, очищенный пептид можно охарактеризовать с использованием этих и других хорошо известных способов, таких как аминокислотный анализ и масс-спектрометрия.

Для фармацевтических целей предпочтительно использовать по сути чистые белки с гомогенностью по меньшей мере примерно от 90 до 95% и наиболее предпочтительно использовать белки с гомогенностью от 98 до 99% или больше.

VIII. Способы введения.

Специалистам в данной области техники хорошо известны или они без труда определяют способы получения и введения полипептидов настоящего изобретения субъекту.

Композиции для введения субъекту включают молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую связывающую молекулу настоящего изобретения (для применений в качестве генной терапии), а также полипептидные молекулы.

Способы введения включают, но без ограничений, внутрикожные, внутримышечные, внутривенные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и оральные пути. Конъюгаты можно вводить с помощью любого подходящего пути, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем поглощения через эпителиальные или кожно-слизистые выстилающие оболочки (например, слизистая оболочка полости рта, слизистая оболочка прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить совместно с другими фармакологически активными средствами. Введение может быть системным или местным.

При определенных обстоятельствах фармацевтические композиции настоящего изобретения, возможно, желательно вводить непосредственно в центральную нервную систему любым подходящим путем, включая внутривентрикулярные и подболобочные инъекции; внутривентрикулярные инъекции может облегчать внутривентрикулярный катетер, например, присоединенной к резервуару, такому как резервуар Оммайя.

Ингаляционное или назальное введение также можно использовать, например, за счет использования ингалятора или распылителя и состава с аэрозольным средством.

В другом варианте реализации конъюгаты можно доставлять в системе контролируемого высвобождения. В одном варианте реализации можно использовать помпу (см. Langer выше; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng., 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgety, 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl., J. Med., 321:574 (1989)). Еще в одном варианте реализации систему контролируемого высвобождения можно помещать вблизи терапевтической мишени, т.е. головного мозга, и, таким образом, потребуется только фракция системной дозы (см., например, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, p. 115-138 (1984)).

Другие системы контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer (Science, 249:1527-1533 (1990)).

Субъект представляет собой предпочтительно животное, включая, но без ограничений, животные, такие как коровы, свиньи, лошади, куры, кошки, собаки и т.д., и представляет собой предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека.

Обычно подходящие фармацевтические композиции для инъекции могут содержать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), в некоторых случаях стабилизирующее средство (например, человеческий альбумин) и т.д. Однако в других способах, совместимых с идеей настоящего изобретения, полипептиды могут доставляться непосредственно в место нахождения популяции нежелательных клеток, вследствие этого увеличивая степень воздействия терапевтического средства на пораженную ткань.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгли-

коль, растительные масла, такие как оливковое масло и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевые и буферные среды. В рассматриваемом изобретении фармацевтически приемлемые носители включают, но без ограничений, 0,01-0,1 М и предпочтительно 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% солевой раствор. Другие общепринятые растворы для парентерального введения включают натрий-фосфатные растворы, раствор Рингера с декстрозой, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или жирные масла. Растворы для внутривенного введения включают жидкость и добавки питательных веществ, добавки электролитов, такие как на основе раствора Рингера с декстрозой и т.п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства и инертные газы и т.п.

Более конкретно фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного использования, включают стерильные водные растворы (в случае растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъеклируемых растворов или дисперсий. В таких случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы обеспечить возможность введения без труда через шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и предпочтительно защищенной против контаминации микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или диспергирующая среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерол, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащее жидкое состояние можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ.

Предотвращение действия микроорганизмов можно достичь с помощью различных противобактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлоробутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях в композицию предпочтительно включать изотонические средства, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированное поглощение инъеклируемых композиций можно обеспечить за счет включения в композицию средства, которое задерживает поглощение, например, алюминия моностеарата и желатина.

В любом случае стерильные инъеклируемые растворы можно получить за счет включения активного соединения (например, полипептида самого по себе или в комбинации с другими активными средствами) в требуемом количестве в соответствующем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных в данном документе, при необходимости с последующей стерилизацией путем фильтрации. В целом дисперсии получают за счет включения активного соединения в стерильный раствор, который содержит основную диспергирующую среду и другие требуемые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъеклируемых растворов предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и лиофильная сушка, которая позволяет получить порошок из активного ингредиента с любым дополнительным желаемым ингредиентом из его раствора, предварительно простерилизованного фильтрацией. Препараты для инъекций подвергают обработке, помещают в контейнеры, такие как ампулы, пакеты, бутылки, шприцы или флаконы, и герметизируют в стерильных условиях в соответствии со способами, известными в настоящем уровне техники. Дополнительно препараты можно упаковать и продать в форме набора, который предпочтительно будет содержать этикетки или листки-вкладыши в упаковке с указанием, что сопутствующие композиции являются полезными для лечения субъекта, страдающего от или предрасположенного к аутоиммунным или неопластическим нарушениям.

Эффективные дозы композиций настоящего изобретения для лечения состояний изменяются в зависимости от многих разных факторов, включая способы введения, целевого участка введения, физиологического состояния пациента, от того, является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарственных препаратов и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациентом является человек, но также можно лечить млекопитающих, не относящихся к человеку, включая трансгенных млекопитающих.

Для оптимизации безопасности и эффективности лечебные дозы можно титровать с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области техники. В одном варианте реализации полипептид настоящего изобретения представляет собой полипептид, который ранее вводили пациентам, но который модифицировали за счет включения линкерного пептида настоящего изобретения вместо традиционного линкерного пептида. В таких случаях доза вводимого полипептида будет согласована с дозой, которая, как было ранее обнаружено, является безопасной и эффективной, т.е. стандартом лечения.

Полипептиды настоящего изобретения можно вводить неоднократно. Интервалы между однократными дозами могут быть еженедельно, ежемесячно или ежегодно. Интервалы могут также быть нерегулярными в соответствии с измерением уровней полипептида, мишени полипептида или антигена в крови пациента. В некоторых способах для достижения определенной концентрации *in vivo* дозу регулируют. Альтернативно полипептиды можно вводить в качестве состава с замедленным высвобождением; в случае чего введение необходимо осуществлять реже. Доза и частота изменяются в зависимости от периода

полувыведения полипептида у пациента.

Доза и частота введения могут изменяться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При применении в профилактических целях композиции, содержащие полипептиды настоящего изобретения или их смесь, вводят пациенту, который еще не находится в болезненном состоянии, для повышения устойчивости пациента. Такое количество получило определение "профилактическая эффективная доза". Можно вводить относительно низкую дозу с относительно редкими интервалами в течение продолжительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца их жизни.

При применении в терапевтических целях можно вводить относительно высокую дозу за относительно короткие интервалы, что иногда требуется осуществлять до тех пор, пока не произойдет замедление темпа или остановка прогрессирования болезни, и предпочтительно до тех пор, пока частично или полностью не произойдет ослабление симптомов болезни у пациента.

Дополнительно будет понятно, что молекулы настоящего изобретения можно использовать в сочетании или комбинации со средством или средствами (например, для обеспечения схемы комбинированного лечения). Иллюстративные средства, с которыми можно комбинировать молекулу настоящего изобретения, включают средства, которые представляют современный стандарт лечения в отношении определенного нарушения, которое лечат. Такие средства могут иметь химическую или биологическую природу. Выражение "биологический препарат" или "биологическое средство" относится к любому фармацевтически активному средству, полученному из живых организмов и/или их продуктов, которое предназначено для использования в качестве терапевтического средства.

Полипептиды настоящего изобретения можно в некоторых случаях вводить в комбинации с другими средствами, которые являются эффективными в лечении нарушения или состояния, которое необходимо лечить (например, профилактическое или терапевтическое лечение). Как используется в данном документе, введение полипептидов настоящего изобретения в сочетании или комбинации со вспомогательной терапией означает последовательное, проведенное одновременно, коэкстенсивное, параллельное, сопутствующее или проводимое одновременно введение или применение терапии и раскрываемых полипептидов. Специалисты в данной области техники понимают, что для повышения общей эффективности лечения можно рассчитать по времени введение или применение различных компонентов схем комбинированного лечения. Например, в стандартных, хорошо известных курсах лечения можно вводить химиотерапевтические или биологические средства в сочетании с исследуемыми связывающими молекулами. Специалист в данной области техники (например, врач) на основе подобранной вспомогательной терапии и идей настоящего описания сможет без труда подобрать эффективные схемы комбинированного лечения без неоправданного проведения исследований.

В одном варианте реализации полипептид можно получить у пациента за счет введения в виде молекулы нуклеиновой кислоты. Молекулы нуклеиновой кислоты можно вводить с использованием методик, известных в настоящем уровне техники, включительно посредством вектора, плазмиды, липосомы, инъекции ДНК, электропорации, генной пушки, внутривенной инъекции или инфузии в печеночную артерию. Векторы для использования генной терапии в вариантах реализации известны в настоящем уровне техники.

Количество средства, которое необходимо использовать в комбинации с полипептидами настоящего изобретения, можно изменять в зависимости от субъекта или можно вводить в соответствии с тем, что известно в настоящем уровне техники. См. например, Bruce A. Chabner et al., *Antineoplastic Agents*, в Goodman&Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1233-1287 ((Joel G. Hardman et al., eds., 9th ed., 1996). В другом варианте реализации вводят количество такого средства, которое согласуется со стандартом лечения.

Как обсуждалось ранее, полипептиды настоящего изобретения можно вводить в фармацевтически эффективном количестве для лечения *in vivo* нарушений, характерных для млекопитающих. В этом отношении будет понятно, что молекулу настоящего изобретения можно составить таким образом, чтобы облегчить введение и обеспечить стабильность активного средства. Предпочтительно фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением включают фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, такой как физиологический солевой раствор, нетоксичные буферы, консерванты и т.п. В контексте настоящей заявки следует понимать, что фармацевтически эффективное количество полипептида настоящего изобретения, конъюгированного или неконъюгированного с терапевтическим средством, означает количество, достаточное для достижения эффективного связывания с антигеном и для достижения полезного эффекта, например для ослабления симптомов болезни или нарушения или для обнаружения вещества или клетки. В случае опухолевых клеток будет предпочтительно, чтобы полипептид мог взаимодействовать с избранными иммунореактивными антигенами на неопластических или иммунореактивных клетках и обеспечивать увеличение гибели этих клеток. Разумеется, что для обеспечения фармацевтически эффективного количества полипептида, фармацевтические композиции настоящего изобретения можно вводить в однократных или многократных дозах.

В соответствии с объемом настоящего раскрытия молекулу настоящего изобретения можно вводить человеку или другому животному в соответствии с вышеупомянутыми способами лечения в количестве,

достаточном для получения терапевтического или профилактического эффекта.

Способ введения и дозировочные формы, разумеется, будут влиять на терапевтические количества соединений, которые являются подходящими и эффективными для применения в конкретном лечении. Терапевтически эффективное количество представляет собой количество, необходимое для предотвращения, задержания или снижения тяжести продолжающейся болезни, или количество, необходимое для остановки или снижения тяжести продолжающейся болезни. Специалисту в данной области техники будет совершенно очевидно, что это количество будет изменяться с учетом факторов, таких как вес и здоровье реципиента, тип клеток, которые подвергают трансформации, способ введения настоящих композиций и тип нарушения, которое лечат.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая упаковка или набор, содержащий один или несколько контейнеров, наполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций настоящего изобретения. В некоторых случаях такой(ие) контейнер(ы) может(могут) сопровождаться пояснительной запиской в форме, предписанной правительственным учреждением, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, причем пояснительная записка отражает разрешение данным учреждением производства, использования или продажи для введения человеку.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не должны рассматриваться как ограничивающие. Содержания всех ссылок, патентов и опубликованных заявок на патент, цитированных по всей настоящей заявке, включены в данный документ посредством ссылки.

Примеры

Экспрессия, очистка и характеристика молекул Fc5.

FC5 экспрессировали в E.coli и очищали с использованием осмотического шока для высвобождения растворимого белка из периплазматического пространства. Затем происходил захват растворимого His-меченого FC5 из лизата на никелевую колонку путем катионного обмена на fractogel SE с последующей гель-фильтрацией на superdex 200. Верблюжий V_{HH} характеризовали с использованием SDS PAGE (фиг. 2a-c). FC5-Fc, Fc-FC5 и FC5-scram-Fc экспрессировались в клеточных линиях DG44 CHO в соответствии с ранее описанными способами. Целевые белки, содержащие hFc, выделяли из среды, в которой культивировали клетки CHO (1 л), путем доведения pH до 7,0 и захвата белка на 5 мл колонку HiTrap rProteinA FF (GE healthcare), которую предварительно эквilibрировали. Все очищенные белки характеризовали в отношении уровней эндотоксина до инъекции, чтобы не допустить эндотоксин-зависимого генерализованного открытия ГЭБ. Результаты показаны в табл. 1. Нейроактивные пептиды: даларгин, галанин или нейропептид Y - присоединяли к целевой молекуле (FC5, FC5-Fc) с использованием сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата (SMCC), бифункционального химического линкера, с использованием способов, описанных в Uto et al., 1991 (Uto, I., Ishimatsu, T., Hirayama, H., Ueda, S., Tsuruta, J., Kambara, T. (1991), Journal of immunological methods, 138(1), 87-94). Каждый пептид, который необходимо было присоединить, синтезировали с помощью аналога цистеина на C-конце. Это обеспечивало поперечное сшивание C-конца пептида через свободный цистеин с лизином боковых цепей на белке с использованием SMCC-бифункционального сшивающего химического вещества. После поперечного сшивания каждую меченую молекулу очищали с помощью препаративной гель-фильтрации на основе S-200 для удаления любых агрегатов, которые образовались на протяжении реакции поперечного сшивания. Среднее количество пептидов: даларгина, нейропептида Y или галанина, соединенных с каждым FC5-доменом или FC5-Fc-доменами, - определяли с помощью масс-спектрометрии. В табл. 1 показано среднее количество пептидов, соединенных с FC5-, FC5-Fc- или Fc-FCS-доменами.

Фармакокинетика молекул, содержащих Fc5, в системном русле.

Для того чтобы понять, как воздействуют антитела, содержащие FC5, на эндотелий ГЭБ, определяли фармакокинетiku данных молекул у крыс. Животным вводили внутривенно 3 мг/кг FC5 V_{HH}, слитого либо на N-конце (FC5-Fc), либо на C-конце (Fc-FC5) с человеческим Fc-доменом. Концентрации Fc5-Fc или Fc-FC5 в плазме определяли в различные моменты времени с помощью ИФА. Для определения периода полувыведения каждого конструктора в бета-фазе анализировали результаты (табл. 2). Результаты продемонстрировали, что период полувыведения Fc5-Fc и Fc-FC5 длится значительно дольше при гибридизации с человеческим Fc, чем для FC5 V_{HH} отдельно, так как хорошо известно, что Fc вызывает рециркуляцию и большая масса предотвращает почечную фильтрацию (Holt, L.J., Herring, C., Jespers, L.S., Woolven, B.P., Tomlinson, I.M. (2003), Trends in biotechnology, 21(11), 484-490).

Скорость транспорта молекул, содержащих Fc, in vitro.

Авторы использовали in vitro слой эндотелиальных клеток ГЭБ для моделирования in vivo скоростей прохождения через ГЭБ для каждого белка, содержащего FC5. В модели in vitro используется монослой иммортализованных эндотелиальных клеток головного мозга взрослых крыс (SV-ARBE) в анализе монослойной системы, плотность которой была валидирована с помощью небольших молекул (Garberg, P., Ball, M., Borg, N., Cecchelli, R., Fenart, L., Hurst, R.D., Lindmark, T., Mabondzo, A., Nilsson, J.E., Raub, T.J., Stanimirovic, D., Terasaki, T., Oberg, J.O., Osterberg, T. (2005), Toxicol In Vitro 19(3), 299-334). Способы определений скоростей проникновения in vitro почти такие же, как описаны в (Caram-Salas, N., Boileau, E., Far-

rington, G.K., Garber, E., Brunette, E., Abulrob, A., Stanimirovic, D., *Methods in molecular biology* 763, ed. 2010, 383-401). Определяли скорости проникновения через слой клеток для FC5, FC5-Fc и Fc-FC5 SV-ARBEC. Результаты показаны на фиг. 3.

Аффинность связывания молекул Fc5 к ТМЕМ30А.

Аффинность связывания каждой молекулы оценивали в отдельном анализе с помощью проточной цитометрии с использованием свежeweделенных крысиных эндотелиальных клеток ГЭБ и крысиных эндотелиальных клеток ГЭБ, трансформированных SV40 (Caram-Salas, N., Boileau, E., Farrington, G.K., Garber, E., Brunette, E., Abulrob, A., Stanimirovic, D., *Methods in molecular biology* 763, ed. 2010, 383-401), а также клеток Hek293, которые подвергались временной трансфекции с использованием ранее идентифицированной мишени - ТМЕМ30А. Кривые связывания для каждой линии клеток показаны на фиг. 4а-с, и рассчитанные значения аффинности приведены в табл. 3. Результаты показывают, что аффинность связывания Fc5Fc крысиными эндотелиальными клетками ГЭБ первичной культуры составляет 11 нМ, тогда как связывание с линией клеток, трансформированной SV40, приводит к значению EC_{50} 75 нМ, т.е. связывание примерно в 7 раз слабее. При этом связывание с линией клеток Hek293 крысы, которую подвергали временной трансформации ТМЕМ30А, приводит к аффинности примерно 1700 нМ, что почти в 170 раз слабее, чем связывание с линией эндотелиальных клеток ГЭБ первичной культуры. При измерении с помощью проточной цитометрии, эти данные показывают, что кажущаяся аффинность FC5-Fc существенно увеличивается по сравнению с FC5 V_{HH} , который используется отдельно, что предполагает бидентантное связывание FC5-Fc с клетками, экспрессирующими ТМЕМ30А, о чем свидетельствует авидность.

Оценка эффективности в моделях на животных.

Для оценки того, какое воздействие будет оказывать димеризация доменов FC5 V_{HH} на способность молекул выполнять функцию транспортера для доставки молекулярного груза через ГЭБ посредством RMT, в моделях на животных оценивали активность этих молекул. Известно, что на эффективность транспорта могут влиять многочисленные факторы, например, сообщалось, что снижение аффинности антитела к трансферриновому рецептору даже в несколько раз оказывало положительное влияние на способность молекулы эффективно проникать через ГЭБ (Yu, Y.J., Zhang, Y., Kenrick, M., Hoyte, K., Luk, W., Lu, Y., Atwal, J., Elliott, J.M., Prabhu, S., Watts, R.J., Dennis, M.S., *Science translational medicine* 3(84), 84ra44). В соответствии с этой концепцией предполагалось, что значительное повышение аффинности после Fc-димеризации FC5 V_{HH} будет отрицательно влиять на способность Fc5 V_{HH} эффективно выполнять функцию транспортной молекулы через ГЭБ. Следовательно, в модели *in vivo* оценивали активность молекул, к которым был присоединен нейроактивный пептид, причем каждая молекула имела разную FC5-валентность.

Модель Hargreaves позволяет измерить повышенную чувствительность к термической боли, индуцированной путем инъекции адьюванта Фрейнда в лапу. Подавление термической боли может произойти в результате связывания пептида даларгина, состоящего из шести аминокислот, с болевыми мю-рецепторами, экспрессированными в околводопроводном участке головного мозга. Даларгин, который вводят внутривенно, не способен пересекать ГЭБ и не приводит к подавлению боли, однако ICV-инъекция позволяет даларгину диффундировать к мю-рецепторам, блокировать мю-рецепторы и вследствие этого блокировать боль. Таким образом, чтобы обеспечить транспорт через ГЭБ и подавление боли, даларгин, который вводят внутривенно, необходимо присоединить к рецептор-опосредованному транспортеру. Для оценки транспорта даларгина через ГЭБ, опосредованного молекулами, содержащими Fc5, использовали модель на животных Hargreaves для сравнения активности различных молекулярных форм Fc5 V_{HH} , соединенных с даларгином. Молекулой отрицательного контроля для FC5-даларгин была молекула EG2-даларгин, а для FC5-Fc-даларгин - Fc-FC5-даларгин.

Для обеспечения сопоставимости препаратов положительного и отрицательного контролей FC5-Dal и EG2-Dal характеризовали путем масс-спектрометрии, чтобы показать, что соотношение пептидов на основе даларгина, соединенных с каждым V_{HH} , было сопоставимым (табл. 1).

До внутривенной (IV) инъекции каждую молекулу первоначально тестировали путем интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции в качестве положительного контроля, чтобы удостовериться, что все соединенные молекулы функционально активны и способны подавлять боль. Предполагалось, что тестируемые молекулы как отрицательного, так и положительного контроля, будут подавлять боль после ICV инъекции, поскольку молекулы инъецируют непосредственно в цереброспинальную жидкость, они и способны диффундировать по направлению, и блокировать околводопроводные болевые мю-рецепторы. Во всех случаях при оценке путем ICV инъекции FC5-Dal, EG2-Dal, FC5-Fc-Dal, Fc-FC5-Dal или даларгина отдельно имели похожую активность на основе количества доставленного даларгина. На следующем этапе каждую меченую даларгином молекулу и соответствующий меченый даларгином контрольный белок оценивали в отношении эффективности после IV введения. Первоначально сравнивали эффективность Fc5-Dal по отношению к контролю (EG2-Dal). Результаты показывают достижение полного подавления боли, аналогичного уровню подавления, который можно наблюдать с использованием отдельно морфина (фиг. 5а и 5b). Интересно отметить, что необходимы три дозы Fc5-Dal при 7,5 мг/кг на дозу до наблюдения первоначального подавления боли. В дополнение к этому в контрольной группе не

выявили подавление боли даже после введения животным одинакового количества три раза при 7,5 мг/кг. Эти данные демонстрируют и подтверждают, что FC5 способен выполнять функцию рецептор-опосредованного транспортера, транспортирующего даларгин через ГЭБ в паренхиму головного мозга и позволяющего даларгину связываться и блокировать болевые мю-рецепторы, тогда как с использованием контрольного EG2-даларгина подавление боли выявлено не было. Эти данные кратко изложены в табл. 4.

Димеризованные формы FC5, FC5-Fc и Fc-FC5 продемонстрировали очень разные аффинности связывания по отношению к TМЕМ30А на эндотелиальных клетках ГЭБ (табл. 3). Для определения, коррелирует ли повышение аффинности с повышением активности, оценивали как FC5-Fc-dal, так и Fc-FC5-dal в отношении подавления боли на модели боли Hargreaves. После IV инъекции Fc-FC5-dal был неэффективным (фиг. 6а-d), тогда как FC5-Fc-dal (фиг. 7а и 7с) был высокоэффективным в подавлении боли. В дополнение к этому, отрицательный контроль Fc-Dal был неэффективным *in vivo* (фиг. 7b и 7d). FC5-Fc был эффективным в ослаблении боли в течение первого часа даже с использованием однократной дозы первоначально при 0,5 мг/кг, причем после первых 0,5 ч МРЕ в среднем составлял 50%. При сравнении активности Fc5-dal с FC5-Fc-dal результаты показали, что однократная доза Fc5-dal при 21 мг/кг обеспечивала примерно такой же уровень подавления боли, как и FC5-Fc-Dal при 0,5 мг/кг. В зависимости от молярного соотношения инъецированного даларгина FC5-Fc-Dal был примерно в 80 раз более активным, чем FC5-Dal по способности к подавлению боли в модели Hargreaves. Второй дозы Fc5-Fc-Dal при 2,5 мг/кг было достаточно, чтобы обеспечить максимально возможное подавление боли у одного животного. Наблюдаемая повышенная биологическая активность FC5-Fc-Dal, Fc-FC5-Dal и FC5-Dal на модели боли Hargreaves коррелирует с более высокой аффинностью и более высокой эффективностью Fc5-Fc, что кратко изложено в табл. 2.

В дополнение к этому похожей эффективности в отношении подавления боли можно достичь с использованием других нейроактивных пептидов. Например, галанин, 3,2 кДа пептид, состоящий из 29 аминокислот, соединенный с FC5 или FC5-Fc, с идентичными химическими свойствами, которые описаны выше, подавлял хроническую боль в модели Hargreaves. В отличие от этого галанин, соединенный только с Fc, неспособен был обеспечить эффективное облегчение боли. Результаты как для положительного контроля с использованием ICV, так для и IV инъекций кратко изложены в табл. 6. Для подтверждения активности соединенного галанина в отношении связывания с родственными рецепторами GalR1 и GalR2 и подавления боли с использованием как отрицательного контроля, так и тестируемых молекул тестировали все молекулы, и было показано, что они подавляют боль после ICV инъекции (табл. 6). При IV инъекции только галанин, соединенный с молекулами, содержащими Fc5, либо FC5, либо FC5-Fc были способны подавлять боль *in vivo*. Присутствовала значительная разница в дозировке галанина, соединенного с FC5, по отношению к FC5-Fc, которая требовалась для ослабления боли в модели Hargreaves на животных. Галанин-FC5 в однократной дозе 6 мг/кг (табл. 6) приводил к 8% МРЕ, тогда как однократная доза Fc5-Fc-Gal приводила к а 45% МРЕ.

Внутрибрюшинное введение пентилентетразола (PTZ) индуцирует судороги у крыс и использовалось в качестве модели эпилептических судорог (Chen, J.W., Naylor, D.E., Wasterlain, C.G., *Advances in the pathophysiology of status epilepticus*, Acta Neurol. Scand. Suppl., 2007, 186, 7-15; Werner, F.M., Coveñas, R., *Neuropeptides involved in schizophrenia*, Curr. Top. Neurochem., 2005, 4, 35-49; Werner, F.M., Coveñas, R., *Focus on Neuropeptide Research*, Coveñas, Mangas and Narváez, eds.; Transworld Research Network: Trivandrum, 2007, p. 299-339; Werner, F.M., Coveñas, R., *Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in major depression*, Int. J. Neurosci., 2010, 120, 455-70). Известно, что нейроактивные пептиды, такие как галанин и нейропептид Y, обеспечивают защиту от судорог, индуцированных PTZ (Mazarati 1998a; Mazarati, A.M., Hohmann, J.G., Bacon, A., Liu, H., Sankar, R., Steiner, R.A., Wynick, D. et al., *Modulation of hippocampal excitability and seizures by galanin*, the Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 2000, 20(16), 6276-81; Mazarati et al.; Mazarati A., Liu H., Soomets U., Sankar R., Shin D., Katsumori H., Langel U., Wasterlain C.G., *Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus*, J. Neurosci., 1998, 18:10070-10077). Эти исследования показали, что элиминация галанина из гиппокампа крыс ассоциирована с развитием самоподдерживающегося эпилептического состояния. В дополнение к этому инъекция галанина в гиппокампальную область головного мозга может подавлять судороги (Mazarati A., Liu H., Soomets U., Sankar R., Shin D., Katsumori H., Langel U., Wasterlain C.G., *Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus*, J. Neurosci., 1998, 18:10070-10077; Mazarati A.M., Halaszi E., Telegdy G., *Anti-convulsive effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxin-kindled seizure syndrome in rats*, Brain Res., 1992, 589:164-166). Однако нейроактивные пептиды, которые вводят внутривенно, не могут пересекать ГЭБ и имеют краткий период полувыведения в силу их небольшого размера (Jain, Kamal, Batra, *Trends Biotechnol.*, vol. 25. ed., 2007:307-16; Batra, Jain, Wittel, Chauhan, Colcher, *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 13, ed., 2002:603-8). Эффективность галанина оценивали в модели с использованием PTZ путем тестирования галанина, соединенного как с FC5, однодоменным антителом, так и с FC5-Fc. Хотя ожидалось, что оба конструктора будут усиливать транспорт через ГЭБ, в данном документе было показано, что конструктор FC5-Fc имел повышенную практическую аффинность из-за авидного связывания с его предполагаемой мишенью TМЕМ30А и имел намного более продолжительный период полувы-

ведения в силу увеличенного размера и Fc-зависимой рециркуляции.

В модели судорог, индуцированных PTZ, представляющее интерес средство вводят либо IV, либо путем непосредственной инъекции в гиппокамп. Инъекция в гиппокамп позволяет доставить средство непосредственно в место приложения действия, позволяя галанину связываться с родственными для него рецепторами и блокировать начало судороги. В дополнение к этому непосредственная инъекция в гиппокамп каждой молекулы служит в качестве положительного контроля, чтобы показать, что галанин, соединенный с каждой молекулой, Fc, FC5 или FC5-Fc, сохраняет активность, подавляющую судороги.

Для получения близкого молярного эквивалента доз галанина варьировали дозами каждой вводимой молекулы. Для исследования положительного контроля самцы крыс линии Вистар (в возрасте 4-6 недель) получали интрагиппокампальную инъекцию одного из следующих веществ: вальпроевая кислота, Gal-Cyа или FC5-Gal в конечном объеме 5 мкл, через 15 мин спустя IP инъекции 50 мг/кг PTZ для индукции судорог.

Для оценки эффективности галанина, соединенного с FC5, FC5-Fc или Fc для пересечения ГЭБ, каждую из этих молекул инъецировали системно, как подробно представлено на фиг. 7а и 7б. Для системного исследования крысы получали 1, 2 или 3 внутривенные инъекции (через хвостовую вену) Gal-Cyа или FC5-Gal или однократную дозу либо FC5-Fc-Gal, либо Fc-Gal. В каждом случае после IP внутрибрюшинно вводили PTZ в дозе 50 мг/кг и в течение 30 мин регистрировали движения крыс.

Затем рассматривали все зарегистрированные движения, а время до начала судорог и продолжительность судорог измерял беспристрастный исследователь для каждого из трех характерных изменений поведения: первое судорожное мышечное движение (FMJ; которое характеризуется подергиваниями ушами, головой и плечами), первая клоническая судорога (FCJ; которая характеризуется минимальными судорогами, клонусом мышц головы и передних конечностей, произвольными движениями всего тела и скачкообразными движениями с рефлексом выпрямления) и первое тоническое генерализованное разгибание (TGE; которое характеризуется потерей способности к выпрямлению, сгибанию или разгибанию передних конечностей и задних конечностей и клонусом всего туловища).

В табл. 7а) показаны результаты для инъекций в гиппокамп каждой молекулы. IP инъекции 50 мг/кг PTZ приводили к быстрому началу каждого типа судороги: миоклонической, клонической и генерализованной тонической судороги с очень быстрым прогрессированием от наименее серьезного FMJ до наиболее серьезной формы судороги - генерализованной тонической судороги. Вальпроевая кислота - небольшая молекула, которая, как известно, частично подавляет начало судорог, индуцированных PTZ (Pollack G.M., Shen D.D., J. Pharmacol. Methods. (1985) Apr., 13(2):135-46), значительно задерживала развитие всех трех типов судорог, но не полностью предотвращала начало судорог, причем наблюдалась задержка начала миоклонических и клонических судорог примерно на 100 с. Инъекция в гиппокамп галанина отдельно или соединенного с FC5 приводила к значительной задержке миоклонических судорог и полному предотвращению более серьезных клонических и генерализованных тонических судорог.

Результаты, полученные с внутривенным введением каждой молекулы, показаны в табл. 7б). PTZ приводит к быстрому началу каждого типа судорог, а IV введение вальпроевой кислоты при 11,2 мг/кг подавляет начало миоклонических и клонических судорог. Внутривенное введение галанина и галанина-Fc, варианта нейроактивного пептида с коротким и длинным периодом полувыведения, не приводило или приводило к очень незначительной задержке начала судороги соответственно. FC5-галанин, который вводили при 6 мг/кг, за 1 ч до введения PTZ, приводил к значительной задержке миоклонической судороги и полному подавлению клонических и генерализованных клонических судорог. Однократная доза Fc5-Fc-галанина за 2 ч до введения PTZ также приводила к значительной задержке миоклонической судороги и полному подавлению клонических и генерализованных клонических судорог.

Исходя из этих результатов можно сделать несколько выводов. Галанин, соединенный с FC5, Fc или FC5-Fc, сохраняет эквивалентную активность, как показано при ICV введении в модели Hargreaves (табл. 4 и 5). В дополнение к этому в табл. 7а) показано, что FC5-галанин проявил эквивалентную активность в расчете на моль относительно галанина отдельно при инъекции в гиппокамп крыс в модели судорог с использованием PTZ. В отличие от этого галанин отдельно или как молекула с большим периодом полувыведения, присоединенная к молекуле hFc, не пересекает эффективно гематоэнцефалический барьер и не подавляет индуцированные PTZ судороги. Только в случае присоединения к FC5 либо в виде FC5-галанина, либо в виде FC5-Fc-галанина, галанин способен пересекать ГЭБ и эффективно задерживать и подавлять индуцированные PTZ судороги. Галанин, соединенный с FC5-Fc, проявляет намного большую эффективность, чем галанин, соединенный с FC5 отдельно, в ослаблении судорог на основе сравнения дозировок в пересчете на моли; конкретно, он по меньшей мере в 16 раз более эффективен. В дополнение к этому FC5-Fc-галанин показал большую задержку по времени до начала первой миоклонической судороги по сравнению с FC5-галанином. Эти результаты указывают на то, что более оптимальный период полувыведения и практическое увеличение аффинности FC5-Fc к своей мишени улучшает доставку галанина через ГЭБ и приводит к более эффективному ослаблению судорог в модели судорог с использованием PTZ, чем FC5-галанина.

Таблица 1

Характеристика экспрессированных и очищенных молекул

Молекула плазмида	FC5 ⁽¹⁾ (EAG2333)	FC5-FC ⁽²⁾ (EAG2345)	Fc-FC5 ⁽²⁾ (EAG2304)	Fc
Расчетный Mwt (Дальтоны)	15,375	78,725	78,924	51,896
Эндотоксин (ЕЭ/мг)	<1	<1	<1	<1
LS Mwt (Дальтоны)	16,860	77,530	78,950	57,800
Чистота-% площадь пика на аналитической SEC	99,7	98,9	95,0	99,7
Avg связанные пептиды даларгина ⁽³⁾	1,5	1,5	1,5	1,0

(1) Содержит тус-метку EQKLISEEDL, C-концы (1202 mwt), C-концевую His-метку 5Н.

(2) Fc-доменами являются человеческий IgG1 и agly (все Fc-домены содержат точечную мутацию T299A в последовательности hIgG для удаления Fc N-гликозилирования).

(3) Оцененный по MS для определения среднего количества молекул даларгина, ковалентно связанных с FC5-Fc-доменами.

Таблица 2

Определения фармакокинетического периода полувыведения FC5-доменов, слитых с hFc

	FC5-Fc		Fc-FC5		hIgG1	
	Флуоресценция	ИФА	Флуоресценция	ИФА	Флуоресценция	ИФА
Период полувыведения в бета-фазе(ч)	39,4	35,7	38,6	38,6	43,5	48

Период полувыведения определяли посредством обнаружения человеческого Fc в крысиной сыворотке с помощью ИФА или с помощью AL680-меченых молекул и уровня флуоресценции, который определялся в сыворотке. Не наблюдали никакой разницы между молекулами, для которых определяли период полувыведения посредством флуоресценции по сравнению с ИФА. Молекулы вводили внутривенно при 3 мг/кг.

Таблица 3

Общие результаты по аффинностям связывания и относительной эффективности Fc5-Dal, FC5-Fc-Dal и Fc-FC5-Dal в модели Hargreaves, которые показывают наличие корреляции между эффективностью и аффинностью для эндотелиальных клеток ГЭБ

Молекула	FC5	Аффинность (нМ)	
		FC5-Fc	Fc-FC5
Первичная культура ЭК ГЭБ крысы SV-ARBEC	>2000	11	1700
эндотелиальные клетки аорты крысы		75	ND
Кратность изменения активности по сравнению с FC5-Dal в модели Hargreaves	1	80	<0,1

Таблица 4

Общие результаты по подавлению хронической боли даларгином отдельно или в соединении с FC5 в модели Hargreaves

молекула	ICV		IV	
	Доза (мкг)	% MPE	Доза (мг/кг)	% MPE
PBS	5	0 ± 0,8	800 (мкл)	0 ± 0,6
Даларгин	2	35 ± 1	0,34 х 3 инъекции	0,3 ± 0,3
FC5	69,75	0 ± 2	7 х 3 инъекции	1,9 ± 0,3
EG2	69,75	0 ± 2	7 х 3 инъекции	0 ± 1,3
A20.1			7,84 х 3 инъекции	2,2 ± 0,3
FC5-Даларгин	74,4	47 ± 2	7 х 3 инъекции	41 ± 0,5
EG2-Даларгин	74,4	31 ± 1	7 х 3 инъекции	2,0 ± 0
A20.1-Даларгин			2,49 х 3 инъекции	3,1 ± 0
FC5 + Даларгин			(0,65 мкг + 7 мг/кг) х 3 инъекции	0 ± 1,6

Подавление хронической боли выражали как процент максимально возможного эффекта (%MPE). Значение основано на площади под кривой для животного с подавлением боли относительно противоположной контрольной лапы на протяжении измерения. Эффективность молекул, которые вводили либо ICV, либо IV показана в виде процента максимально возможного эффекта (%MPE) в модели Hargreaves. A20.1 и EG2 представляют собой однодоменные антитела, не связанные сFC5, которые не проявляют кажущуюся аффинность к эндотелиальным клеткам ГЭБ. Значения дозы в мг/кг для внутривенного (IV) введения указаны на инъекцию с последующим количеством инъекций.

Таблица 5

Общие результаты по подавлению хронической боли даларгином, соединенным с Fc, или даларгином, соединенным с FC5-Fc, в модели Hargreaves

молекула	ICV		IV	
	Доза (мг)	% MPE	Доза (мг/кг)	% MPE
FC5-Fc-Dal	11,5	43 ± 3	6	46 ± 2
Fc Dal	9,3	55 ± 2	6	5 ± 2
FC5-Fc + FC5-Fc-Dal			2,5 + 6	32 ± 7

Во втором эксперименте перед добавлением FC5-Fc-Dal вводили IV дозу несвязанного FC5-Fc в указанных концентрациях.

Таблица 6

Подавление хронической боли галанином, соединенным с либо с Fc, FC5-Fc, либо FC5 в модели Hargreaves

молекула	ICV		IV	
	Доза (мкг)	% MPE	(мг/кг)	% MPE
галанин	2	54 ± 1	1	0 ± 1
Fc-Gal	11,2	49 ± 1	6	2 ± 1
FC5-Gal	10,87	49 ± 2	6	8 ± 1
FC5-Fc-Gal	11,4	49 ± 2	6	45 ± 2

В случае многократных доз FC5-Gal дозы вводили с интервалом в 1 ч. В третьем эксперименте IV дозу несоединенного FC5-Fc инъецировали IV перед добавлением FC5-Fc-Dal в указанных концентрациях.

Таблица 7

Сравнение времени до начала судорог с использованием инъекции в гиппокамп а) или IV инъекции б) в PTZ-модели на крысах

а) Инъекция в гиппокамп

молекула	Доза (мкг)	Время в секундах до начала судорог		
		Миоклонические (секунды)	Клонические	Тонические Генерализованные
только PTZ	50	0 ± 2	0 ± 6	0 ± 0,5
Вальпроевая кислота	11,2	100 ± 6	100 ± 9	2 ± 1
галанин	1,82	104 ± 0	предотвращенные	предотвращенные
FC5-галанин	11,9	82 ± 4	предотвращенные	предотвращенные

б) Внутривенная инъекция

молекула	Доза (мг/кг)	Время в секундах до начала судорог		
		Миоклонические (секунды)	Клонические	Тонические Генерализованные
только PTZ	50	0 ± 1	0 ± 3	0 ± 0,5
Вальпроевая кислота	11,2	100 ± 3	100 ± 3	100 ± 0
галанин	1 х 2	0,5 ± 5	0 ± 2	2 ± 4
Fc-Gal	6	2 ± 1	18 ± 2	17 ± 2
FC5-галанин	6 х 3	47 ± 3	предотвращенные	предотвращенные
FC5-Fc-галанин	6	101 ± 28	предотвращенные	предотвращенные

После IP введения PTZ крысам исследовали время до начала судорог каждого указанного типа: FMJ, FCJ и TGE. Типы судорог описаны более подробно выше.

а) С помощью PTZ, который вводят IP, устанавливают контрольное время для каждого типа судорог. С помощью инъекции в гиппокамп вальпроевой кислоты, галанина или FC5-галанина до IP инъекции PTZ устанавливают максимальное влияние, которое может оказывать каждая из этих молекул на время до начала судорог каждого типа.

б) С помощью IV введения вальпроевой кислоты, положительного контроля, галанина (1×3 инъекционные дозы, причем каждую дозу вводили с интервалом в 1 ч и прекращали вводить за 45 мин до введения PTZ) или FC5-галанина (1×3 дозы, причем каждую дозу вводили с интервалом в 1 ч и прекращали вводить за 45 мин до введения PTZ), FC5-Fc-Gal или Fc-Gal (оба вводили за 2 ч до IP инъекции PTZ) измеряют влияние, которое может оказывать каждая из этих молекул на IV введение. Fc-Gal служит в качестве отрицательного контроля как молекула, в которой отсутствует FC5 F(ab)-фрагмент, но которая имеет похожую с FC5-Fc in vivo PK.

Seq1: Последовательность Fc5-agly (T299A)hFc. (pEAG2345)

DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKEREFVSRITW
GGDNTFYNSVKGFRFTISRDNKNTVYVYLMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTATP
LRVDYWGKGTQVTVSSAEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNNSA YRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Seq2: Последовательность agly (T299A) hFc-FC5. (pEAG2403)

EPKSSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNNSA YRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGGGGSDVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYT
MGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYNSVKGFRFTISRDNKNTVYVYLMNSL
KPEDTADYYCAAGSTSTATPLRVDYWGKGTQVTVSS

Seq3: Последовательность скремблированного FC5-agly (T299A)hFc
(pYL605)

EPKSSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNNSA YRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGGGGSDVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYT
MGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYNSVKGFRFTISRDNKNTVYVYLMNSL
KPEDTADYYCAADAGSTGSYGSFDYWGKGTQVTVSS

Эквиваленты.

Специалисты в данной области техники примут во внимание или будут в состоянии выявить с проведением не более чем обычного эксперимента многие эквиваленты конкретных вариантов реализации настоящего изобретения, описанных в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охвачены следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающая молекула, проникающая через гематоэнцефалический барьер, представляющая собой химерный белок, содержащий

(а) фармакологически активное средство, выбранное из нейроактивного пептида и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

(б) два однодоменных антитела, которые связываются с TМЕМ30А, где каждое из указанных двух однодоменных антител, которые связываются с TМЕМ30А, слито i) непосредственно или ii) через промежуточную аминокислотную последовательность с N-концом первого IgG-Fc-домена и второго IgG-Fc-домена соответственно.

2. Связывающая молекула по п.1, где указанные два однодоменных антитела, которые связываются с TМЕМ30А, содержат аминокислотную последовательность FC5, приведенную в SEQ ID NO: 10.

3. Связывающая молекула по п.1, где указанные два однодоменных антитела, которые связываются с TМЕМ30А, состоят из аминокислотной последовательности FC5.

4. Связывающая молекула по п.1, где каждое из указанных двух однодоменных антител, которые связываются с TМЕМ30А, слито непосредственно с первым IgG-Fc-доменом и вторым IgG-Fc-доменом соответственно.

5. Связывающая молекула по п.1, где каждое из указанных двух однодоменных антител, которые связываются с TМЕМ30А, слито с первым IgG-Fc-доменом и вторым IgG-Fc-доменом соответственно через промежуточную аминокислотную последовательность.

6. Связывающая молекула по п.1, где указанное фармакологически активное средство слито с указанным однодоменным антителом.

7. Связывающая молекула по п.1, где указанное фармакологически активное средство слито с C-концом указанного первого IgG-Fc-домена или второго IgG-Fc-домена.

8. Связывающая молекула по п.1, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взяты из антитела, не являющегося антителом, которое связывает TМЕМ30А.

9. Связывающая молекула по п.8, где указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из молекулы scFv, диатела, молекулы Fab и однодоменного антитела.

10. Связывающая молекула по п.1, где указанное фармакологически активное средство ковалентно связано с по меньшей мере одним из указанных двух однодоменных антител TМЕМ30А.

11. Связывающая молекула по п.1, где указанное фармакологически активное средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с мишенью в центральной нервной системе.

12. Связывающая молекула по любому из пп.1-11, где каждый из указанных первого IgG-Fc-домена

и второго IgG-Fc-домена представляет собой Fc-домен антитела IgG1.

13. Связывающая молекула по любому из пп.1-11, где каждый из указанных первого IgG-Fc-домена и второго IgG-Fc-домена содержит CH2-домен и CH3-домен.

14. Связывающая молекула по п.13, где каждый из указанных CH2-домена и CH3-домена взят из антитела IgG1.

15. Связывающая молекула по любому из пп.1-11, где каждый из указанных первого IgG-Fc-домена и второго IgG-Fc-домена содержит шарнирную область, CH2-домен и CH3-домен.

16. Связывающая молекула по п.15, где каждый из указанных шарнирной области, CH2-домена и CH3-домена взят из антитела IgG1.

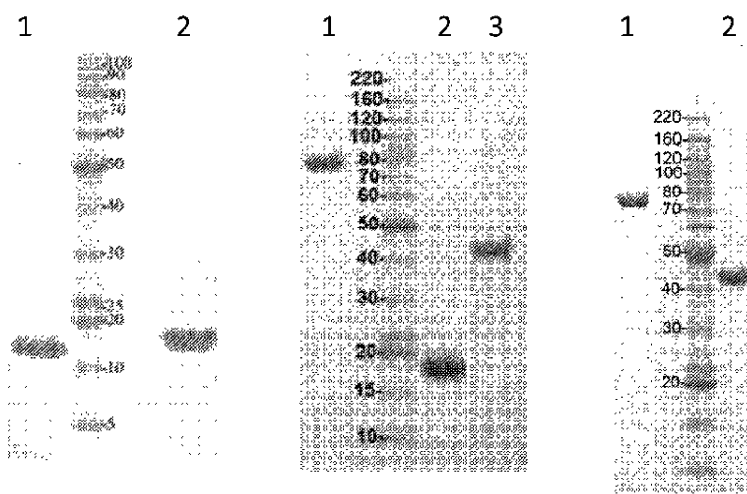
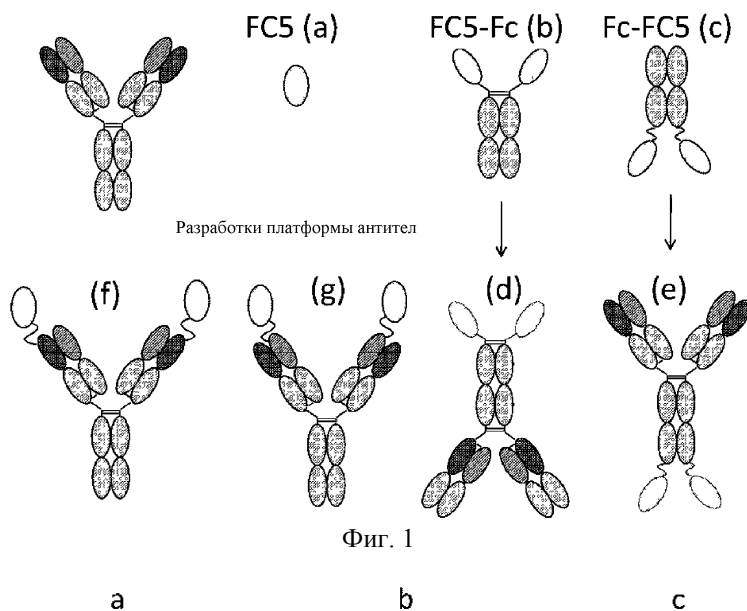
17. Связывающая молекула по п.1, где каждый из указанных первого IgG-Fc-домена и второго IgG-Fc-домена содержит шарнирную область, CH2-домен и CH3-домен из антитела IgG и где указанные два однодоменных антитела, которые связываются с TMEM30A, содержат аминокислотную последовательность FC5 (SEQ ID NO: 10).

18. Связывающая молекула по п.1, где каждый из указанных первого IgG-Fc-домена и второго IgG-Fc-домена содержит шарнирную область, CH2-домен и CH3-домен из антитела IgG и где указанные два однодоменных антитела, которые связываются с TMEM30A, состоят из аминокислотной последовательности FC5 (SEQ ID NO: 10).

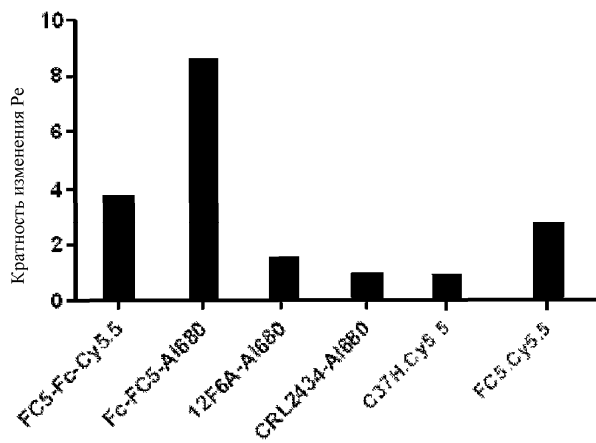
19. Связывающая молекула по п.1, содержащая SEQ ID NO: 1.

20. Применение связывающей молекулы по любому из пп.1-19 в производстве лекарственного средства для лечения хронической боли.

21. Применение связывающей молекулы по любому из пп.1-19 в производстве лекарственного средства для лечения эпилепсии.

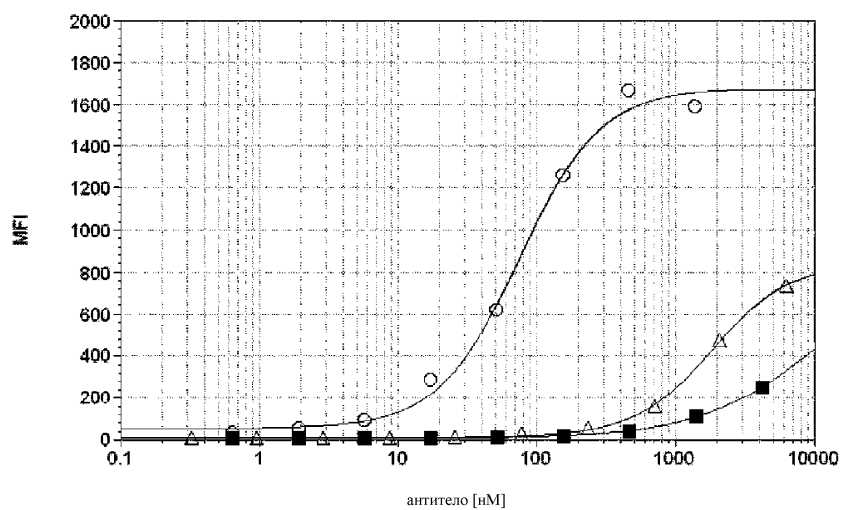


Фиг. 2а-с

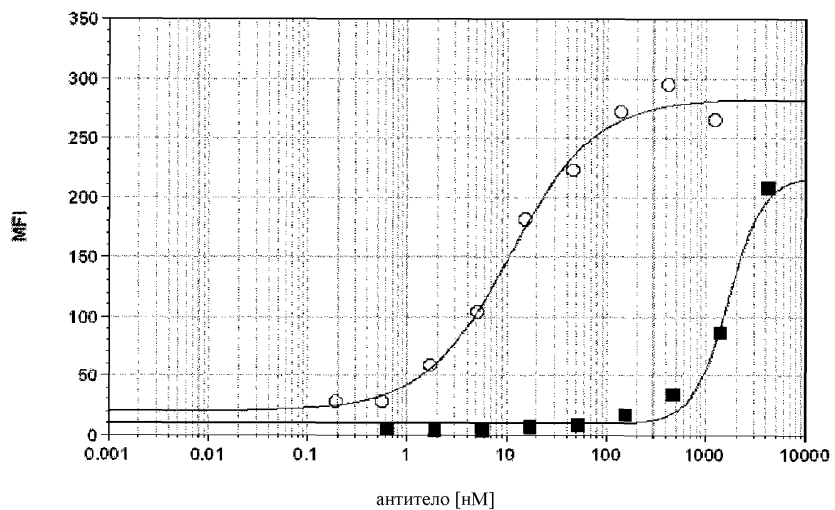


Фиг. 3

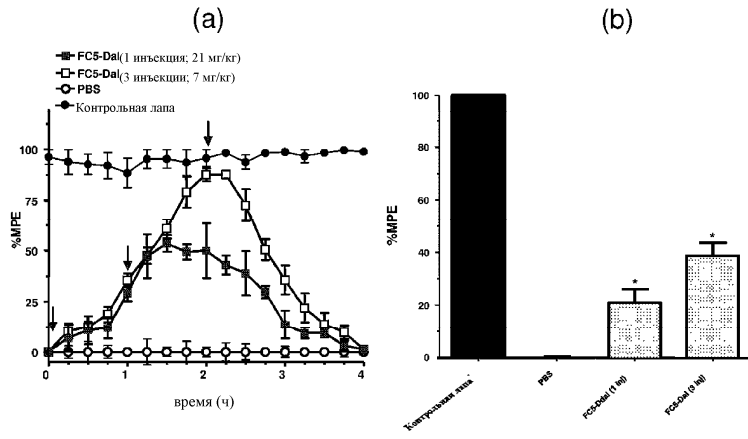
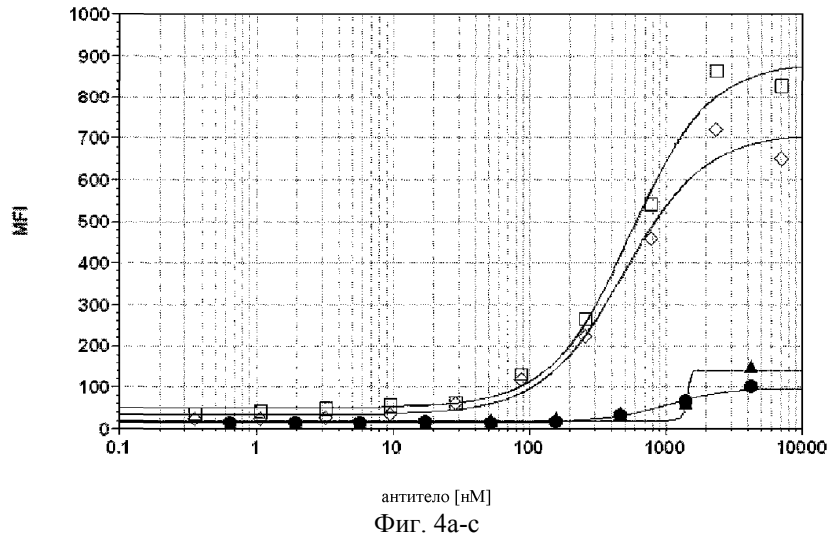
a



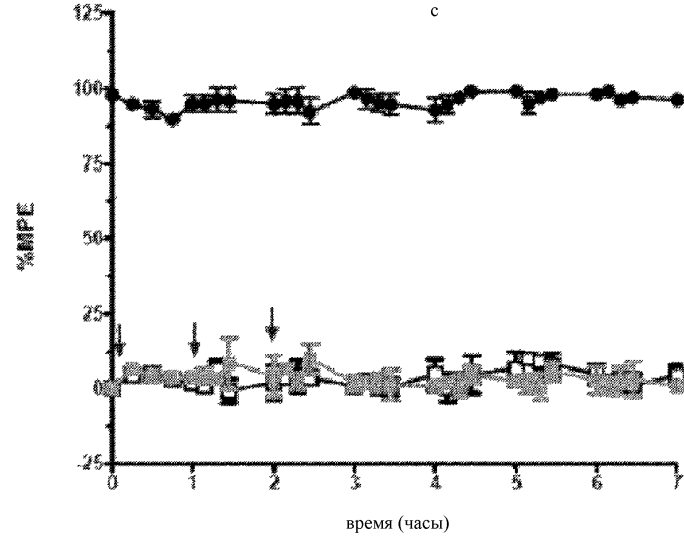
b



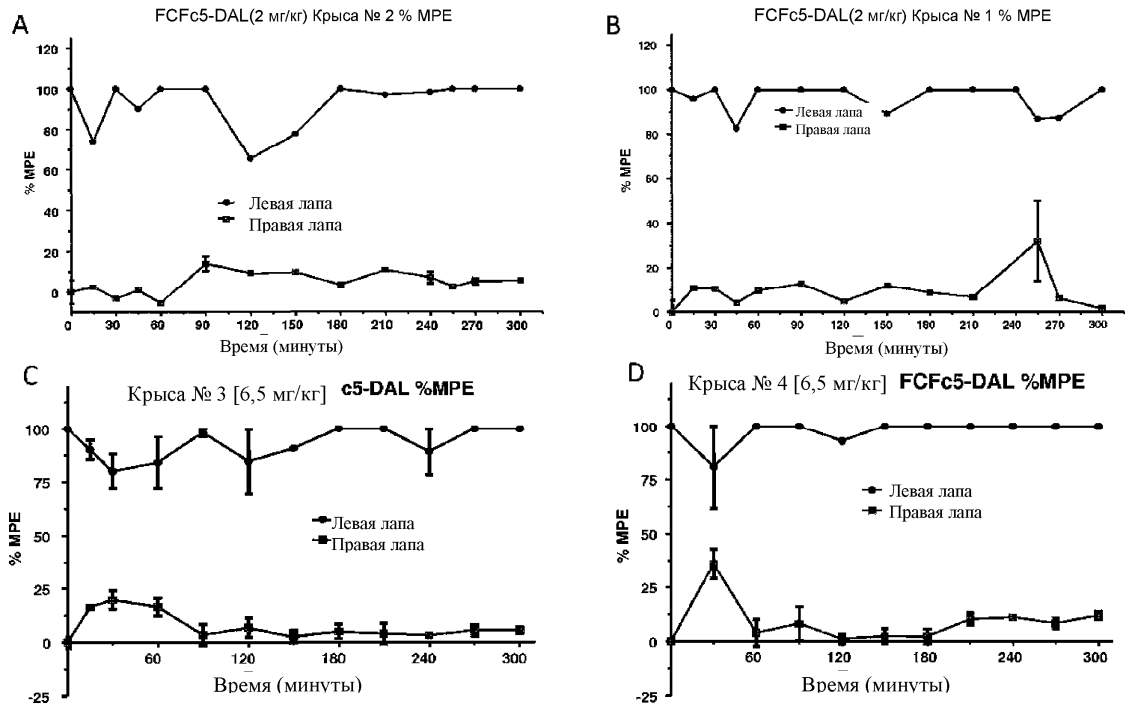
c



c



Фиг. 5а-с



Фиг. ба-d

(a)

FC5-FC-Dal

(b)

FC Dal

