

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042007**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2022.12.26

(21) Номер заявки

201991577

(22) Дата подачи заявки

2017.12.26

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)

(54) НОВЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ РЕЦЕПТОРА ТРАНСФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА, СПОСОБНЫЕ ПРЕОДОЛЕВАТЬ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР

(31) 2016-252148

(32) 2016.12.26

(33) JP

(43) 2019.12.30

(86) PCT/JP2017/046762

(87) WO 2018/124121 2018.07.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

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

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2015098989

ZHOU Q. et al., "Monoclonal Antibody-Glial-Derived Neurotrophic Factor Fusion Protein Penetrates the Blood-Brain Barrier in the Mouse", Drug Metabolism and Disposition, 2010, vol. 38, no. 4, pp. 566-572, abstract, fig. 5, 9

ZHOU Q. et al., "Delivery of a Peptide Radiopharmaceutical to Brain with an IgG-Avidin Fusion Protein", Bioconjugate Chemistry, 2011, 22, pp. 1611-1618, abstract, fig. 5, 8

BOADO R. et al., "Engineering and Expression of a Chimeric Transferrin Receptor Monoclonal Antibody for Blood-Brain Barrier Delivery in the Mouse", Biotechnology and Bioengineering, 2009, vol. 102, no. 4, pp. 1251-1258, abstract, fig. 5

US -A1-20100077498

FRIDEN P. et al., "Characterization, Receptor Mapping and Blood-Brain Barrier Transcytosis of Antibodies to the Human Transferrin Receptor", Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1996, vol. 278, no. 3, pp. 1491-1498, abstract, table 5

WALUS L. et al., "Enhanced Uptake of rsCD4 across the Rodent and Primate Blood-Brain Barrier after Conjugation to Anti-Transferrin Receptor Antibodies", Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1996, vol. 277, no. 2, pp. 1067-1075, abstract, fig. 6

WO-A1-2016208695

WO-A1-2016208696

JP-A-201833454

(57) Представлено антитело против рецептора трансферрина человека или его аналог, в котором в вариабельной области тяжелой цепи антитела (a) CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63, (b) CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14, а (c) CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16 и ее аналог.

B1

042007

042007

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к антителам против рецептора трансферрина человека для применения с целью конъюгации с соединением, которое должно проявлять свою функцию в центральной нервной системе при парентеральном введении (белок или низкомолекулярное соединение и тому подобное) для того, чтобы сделать это соединение способным проходить через гематоэнцефалический барьер после парентерального введения, а также к способу его получения, а также к способу его применения.

Уровень техники

В отличие от капилляров в других тканях, таких как мышцы, капилляры, которые подают кровь в большинство тканей головного мозга за исключением некоторых областей, включая циркумвентрикулярные органы (шишковидную железу, гипофиз, самое заднее поле и т.д.), отличаются тем, что эндотелиальные клетки, образующие их эндотелий, взаимно соединены крепкими межклеточными соединениями. Пассивный перенос веществ из капилляров в головной мозг таким образом ограничен, и хотя существуют некоторые исключения, вещества вряд ли будут поступать в головной мозг из крови за исключением таких соединений, как жирорастворимые или низкомолекулярные (менее чем 200-500 Дальтон) и электрически нейтральные около физиологического рН. Эта система, которая ограничивает обмен веществ между кровью и тканевой жидкостью головного мозга через эндотелий капилляров в головном мозге, называется гематоэнцефалический барьер или BBB. Гематоэнцефалический барьер не только ограничивает обмен веществ между кровью и головным мозгом, но также между тканевой жидкостью центральной нервной системы, включая головной мозг и спинной мозг, и кровью.

Благодаря гематоэнцефалическому барьеру большинство клеток центральной нервной системы избегают воздействий флуктуирующих концентраций веществ, наподобие гормонов и лимфокинов в крови, и таким образом сохраняется их биохимический гомеостаз.

Однако гематоэнцефалический барьер создает проблему, когда речь идет о разработке фармацевтических средств. Например, для мукополисахаридоза I типа (синдрома Гурлера), наследственной болезни обмена веществ, вызванной дефицитом α -L-идуронидазы, хотя в качестве лечения проводят ферментозаместительную терапию путем внутривенного введения рекомбинантной α -L-идуронидазы, терапия является неэффективной по причине заметного нарушения, наблюдаемого в центральной нервной системе (CNS) при синдроме Гурлера, потому что фермент не может проходить через гематоэнцефалический барьер.

Предпринимались попытки разработки различных способов для того, чтобы такие макромолекулярные вещества, как белки и тому подобное, которые должны быть задействованы в центральной нервной системе, проходили через гематоэнцефалический барьер. Например, в случае фактора роста нервов, хотя предпринимались попытки в способе вызвать прохождение фактора через гематоэнцефалический барьер, обеспечивая возможность слияния инкапсулирующих фактор липосом с клеточной мембраной эндотелиальных клеток в капиллярах головного мозга, они не были реализованы (непатентный документ 1). В случае α -L-идуронидазы была предпринята попытка усиления пассивного переноса фермента через гематоэнцефалический барьер путем повышения его концентрации в крови посредством повышенной разовой дозы фермента, и таким образом, используя животную модель синдрома Гурлера, было показано, что с помощью этого метода улучшается нарушение в центральной нервной системе (CNS) (непатентный документ 2).

Кроме того, также была предпринята попытка обхода гематоэнцефалического барьера путем введения макромолекулярного вещества непосредственно в костномозговую полость или в головной мозг. Например, делались сообщения о способе, в котором в костномозговую полость пациента с синдромом Гурлера (мукополисахаридозом I типа) вводили человеческую α -L-идуронидазу (патентный документ 1), о способе, в котором в желудочки головного мозга пациента с болезнью Ниманна-Пика вводили человеческую кислую сфингомиелиназу (патентный документ 2), и о способе, в котором в желудочки головного мозга животных в модели синдрома Хантера вводили идуронат-2-сульфатазу (I2S) (патентный документ 3). Хотя в любом из этих способов, по-видимому, можно точно обеспечить возможность действия фармацевтического средства в центральной нервной системе, их проблема состоит в том, что они являются высокоинвазивными.

Сообщалось о различных способах обеспечения попадания макромолекулярного вещества в головной мозг через гематоэнцефалический барьер, в которых макромолекулярное вещество модифицируют для придания ему аффинности к мембранным белкам, находящимся на эндотелиальных клетках капилляров головного мозга. Примеры этих мембранных белков, которые находятся на эндотелиальных клетках капилляров головного мозга, включают рецепторы для таких соединений, как инсулин, трансферрин, инсулиноподобный фактор роста (IGF-I, IGF-II), LDL и лептин.

Например, сообщалось о методе, в котором фактор роста нервов (NGF) синтезировали в виде белка слияния с инсулином, и этот слитый белок имел возможность проходить через гематоэнцефалический барьер посредством его связывания с инсулиновым рецептором (патентные документы 4-6). Кроме того, сообщалось о методе, в котором фактор роста нервов (NGF) синтезировали в виде белка слияния с антителом против инсулинового рецептора, и этот слитый белок имел возможность проходить через гемато-

энцефалический барьер за счет его связывания с инсулиновым рецептором (патентные документы 4 и 7). Кроме того, сообщалось о методе, в котором фактор роста нервов (NGF) синтезировали в виде белка слияния с трансферрином, и этот слитый белок имел возможность проходить через гематоэнцефалический барьер за счет его связывания с рецептором трансферрина (TfR) (патентный документ 8). Кроме того, сообщалось о методе, в котором фактор роста нервов (NGF) синтезировали в виде белка слияния с антителом против рецептора трансферрина (антитело против TfR), и этот слитый белок имел возможность проходить через гематоэнцефалический барьер за счет его связывания с TfR (патентные документы 4 и 9).

Рассматривая далее методы, в которых используют антитело против рецептора трансферрина, сообщалось, что в области техники, обеспечивающей прохождение фармацевтических средств через гематоэнцефалический барьер посредством их связывания с антителом против TfR, можно использовать одноцепочечное антитело (непатентный документ 3). Кроме того, сообщалось, что в методе можно успешно использовать антитела против hTfR, обладающие относительно высокими константами диссоциации с hTfR (низкоаффинное антитело против hTfR), чтобы обеспечить прохождение фармацевтических средств через гематоэнцефалический барьер (патентные документы 10 и 11 и непатентный документ 4). Более того, также сообщалось, что в качестве носителя для обеспечения прохождения фармацевтических средств через гематоэнцефалический барьер можно использовать антитела против TfR, аффинность которых к hTfR изменяется в зависимости от pH (патентный документ 12 и непатентный документ 5).

Список цитирования

Патентный документ.

Патентный документ 1: JP 2007-504166 A1.

Патентный документ 2: JP 2009-525963 A1.

Патентный документ 3: JP 2012-62 312 A1.

Патентный документ 4: US 5154924 B1.

Патентный документ 5: JP 2011-144178 A1.

Патентный документ 6: US 2004/0101904 A1.

Патентный документ 7: JP 2006-51151 б A1.

Патентный документ 8: JP H06-228199 A1.

Патентный документ 9: US 5977307 B1.

Патентный документ 10: WO 2012/075037.

Патентный документ 11: WO 2013/177062.

Патентный документ 12: WO 2012/143379.

Непатентный документ.

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

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

Непатентный документ 3: Li J.Y. Protein Engineering. 12. 787-96 (1999).

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

Непатентный документ 5: Sada H. PLoS ONE. 9. E96340 (2014).

Сущность изобретения

Задачи, которые должно решить изобретение.

На этом фоне целью настоящего изобретения является предоставление антитела против TfR, которое можно использовать для конъюгации с соединением, которое должно проявлять свою функцию в центральной нервной системе при парентеральном введении (белок или низкомолекулярное соединение и тому подобное) для того, чтобы сделать это соединение способным проходить через гематоэнцефалический барьер, а также способа его получения, а также способа его применения.

Средства решения задач

В результате интенсивных исследований, направленных на указанную выше цель, авторы настоящего изобретения обнаружили, что антитела против рецептора трансферрина человека (антитела против hTfR), которые распознают внеклеточную область hTfR, которые получают посредством способа получения антител, подробно изложенного в описании, эффективно проходят через гематоэнцефалический барьер при введении в организм, и вслед за этим завершили настоящее изобретение. Таким образом, согласно настоящему изобретению предоставлено следующее.

1. Антитело против рецептора трансферрина человека, в котором в вариабельной области тяжелой цепи антитела:

(a) CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63,

(b) CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14, а

(c) CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

2. Антитело по п.1 выше, в котором каркасная область 3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

3. Антитело по п.1 или 2 выше, в котором в вариабельной области тяжелой цепи:

CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 80% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14, вместо нее, а

CDR3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 80% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16, вместо нее.

4. Антитело по п.1 или 2 выше, в котором в варибельной области тяжелой цепи,

CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14, вместо нее, а

CDR3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16, вместо нее.

5. Антитело по п.1 или 2 выше, в котором варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, модифицированную по меньшей мере из одной аминокислотной последовательности:

(a) SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63 в отношении CDR1,

(b) SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14 в отношении CDR2,

(c) SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16 в отношении CDR3 и

(d) SEQ ID NO: 64 в отношении каркасной области 3, посредством замещения, делеции или добавления 1-5 аминокислот, вместо нее,

при этом в CDR1 метионин, расположенный в позиции 5 с N-терминальной стороны аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63, также находится в той же самой позиции в модифицированной таким образом аминокислотной последовательности, а

в каркасной области 3 лейцин, расположенный в позиции 17 с N-терминальной стороны SEQ ID NO: 64, также находится в той же самой позиции в модифицированной таким образом аминокислотной последовательности.

6. Антитело по п.1 или 2 выше, в котором варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, модифицированную по меньшей мере из одной аминокислотной последовательности:

(a) SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63 в отношении CDR1,

(b) SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14 в отношении CDR2,

(c) SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16 в отношении CDR3, и

(d) SEQ ID NO: 64 в отношении каркасной области 3, посредством замещения, делеции или добавления 1-3 аминокислот, вместо нее,

при этом в CDR1 метионин, расположенный в позиции 5 с N-терминальной стороны аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63, также находится в той же самой позиции в модифицированной таким образом аминокислотной последовательности, а

в каркасной области 3 лейцин, расположенный в позиции 17 с N-терминальной стороны SEQ ID NO: 64, также находится в той же самой позиции в модифицированной таким образом аминокислотной последовательности.

7. Антитело по п.2 выше, в котором варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

8. Антитело по п.7 выше, в котором варибельная область тяжелой цепи содержит, на участке за исключением аминокислотных последовательностей, показанных как SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63 CDR1 и SEQ ID NO: 64 каркасной области 3, аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 80% с участком, вместо участка.

9. Антитело по п.7 выше, в котором варибельная область тяжелой цепи содержит, на участке за исключением аминокислотных последовательностей, показанных как SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63 CDR1 и SEQ ID NO: 64 каркасной области 3, аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 90% с участком, вместо участка.

10. Антитело по п.7 выше, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность, модифицированную из аминокислотной последовательности, составляющей варибельную область тяжелой цепи, посредством замещения, делеции или добавления 1-5 аминокислот, вместо нее, при этом в CDR1 метионин, расположенный в позиции 5 от N-конца аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63, также находится в той же самой позиции в модифицированной таким образом аминокислотной последовательности, а в каркасной области 3 лейцин, расположенный в позиции 17 с N-терминальной стороны SEQ ID NO: 64, также находится в той же самой позиции в модифицированной таким образом аминокислотной последовательности.

11. Антитело по п.7 выше, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность, модифицированную из аминокислотной последовательности, составляющей варибельную область тяжелой цепи, посредством замещения, делеции или добавления 1-3 аминокислот, вместо нее, при этом в CDR1 метионин, расположенный в позиции 5 от N-конца аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63, также находится в той же самой позиции в модифицированной таким образом аминокислотной последовательности, а в каркасной области 3 лейцин, расположенный в позиции 17 с N-терминальной стороны SEQ ID NO: 64, также находится в той же самой позиции в модифицированной таким образом аминокислотной последовательности.

12. Антитело по п.7 выше, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 66 или SEQ ID NO: 68.

13. Антитело по п.12 выше, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 80% с участком за исключением аминокислотных последовательностей, показанных как SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63 CDR1 и SEQ ID NO: 64 каркасной области 3, вместо участка.

14. Антитело по п.12 выше, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 90% с участком за исключением аминокислотных последовательностей, показанных как SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63 CDR1 и SEQ ID NO: 64 каркасной области 3, вместо участка.

15. Антитело по п.12 выше, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность, модифицированную из аминокислотной последовательности, составляющей тяжелую цепь, посредством замещения, делеции или добавления 1-5 аминокислот, вместо нее, при этом в CDR1 метионин, расположенный в позиции 5 от N-конца аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63, также находится в той же самой позиции в модифицированной таким образом аминокислотной последовательности, а в каркасной области 3 лейцин, расположенный в позиции 17 с N-терминальной стороны SEQ ID NO: 64, также находится в той же самой позиции в модифицированной таким образом аминокислотной последовательности.

16. Антитело по п.12 выше, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность, модифицированную из аминокислотной последовательности, составляющей тяжелую цепь, посредством замещения, делеции или добавления 1-3 аминокислот, вместо нее, при этом в CDR1 метионин, расположенный в позиции 5 от N-конца аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63, также находится в той же самой позиции в модифицированной таким образом аминокислотной последовательности, а в каркасной области 3 лейцин, расположенный в позиции 17 с N-терминальной стороны SEQ ID NO: 64, также находится в той же самой позиции в модифицированной таким образом аминокислотной последовательности.

17. Антитело по любому из пп.1-16 выше, в котором в варибельной области легкой цепи антитела:

(a) CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7,

(b) CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность Lys-Val-Ser, а

(c) CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

18. Антитело по п.17 выше, в котором в варибельной области легкой цепи:

(a) CDR1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 80% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7, вместо нее,

(b) CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 80% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность Lys-Val-Ser, вместо нее, а

(c) CDR3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 80% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10, вместо нее.

19. Антитело по п.17 выше, в котором в варибельной области легкой цепи:

(a) CDR1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7, вместо нее,

(b) CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность Lys-Val-Ser, вместо нее, а

(c) CDR3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10, вместо нее.

20. Антитело по п.17 выше, в котором варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, модифицированную по меньшей мере из одной аминокислотной последовательности:

(a) SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7 в отношении CDR1,

(b) SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность Lys-Val-Ser в отношении CDR2 и

(c) SEQ ID NO: 10 в отношении CDR3 посредством замещения, делеции или добавления 1-5 аминокислот, вместо нее.

21. Антитело по п.17 выше, в котором варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, модифицированную по меньшей мере из одной аминокислотной последовательности:

(a) SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7 в отношении CDR1,

(b) SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность Lys-Val-Ser в отношении CDR2 и

(c) SEQ ID NO: 10 в отношении CDR3 посредством замещения, делеции или добавления 1-3 аминокислот, вместо нее.

22. Антитело по любому из пп.1-16 выше, при этом вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22.

23. Антитело по п.22 выше, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 80% с аминокислотной последовательностью вариабельной области легкой цепи, вместо нее.

24. Антитело по п.22 выше, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 90% с аминокислотной последовательностью вариабельной области легкой цепи, вместо нее.

25. Антитело по п.22 выше, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность, модифицированную из аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи посредством замещения, делеции или добавления 1-5 аминокислот, вместо нее.

26. Антитело по п.22 выше, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность, модифицированную из аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи посредством замещения, делеции или добавления 1-3 аминокислот, вместо нее.

27. Антитело по любому из пп.1-16 выше, в котором легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 29.

28. Антитело по п.27 выше, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 80% с аминокислотной последовательностью легкой цепи, вместо нее.

29. Антитело по п.27 выше, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не ниже чем 90% с аминокислотной последовательностью легкой цепи, вместо нее.

30. Антитело по п.27 выше, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность, модифицированную из аминокислотной последовательности легкой цепи посредством замещения, делеции или добавления 1-5 аминокислот, вместо нее.

31. Антитело по п.27 выше, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность, модифицированную из аминокислотной последовательности легкой цепи посредством замещения, делеции или добавления 1-3 аминокислот, вместо нее.

32. Антитело по любому из пп.1-31 выше, при этом антитело обладает аффинностью как к внеклеточной области рецептора трансферрина человека, так и к внеклеточной области рецептора трансферрина обезьяны.

33. Антитело по п.32 выше, в котором константа диссоциации его комплекса с внеклеточной областью рецептора трансферрина человека составляет не более чем 1×10^{-10} M, а константа диссоциации его комплекса с внеклеточной областью рецептора трансферрина обезьяны составляет не более чем 1×10^{-9} M.

34. Антитело по любому из пп.1-33 выше, при этом антителом является Fab-антитело, F(ab')₂ антитело или F(ab') антитело.

35. Антитело против рецептора трансферрина человека по любому из пп.1-33 выше, при этом антителом является одноцепочечное антитело, выбранное из группы, состоящей из scFab, scF(ab'), scF(ab')₂ и scFv.

36. Антитело по п.35 выше, в котором его легкая цепь и тяжелая цепь связаны посредством линкерной последовательности.

37. Антитело по п.36 выше, в котором тяжелая цепь связана посредством линкерной последовательности с легкой цепью на ее С-терминальной стороне.

38. Антитело по п.35 выше, в котором легкая цепь связана посредством линкерной последовательности с тяжелой цепью на ее С-терминальной стороне.

39. Антитело по любому из пп.36-38 выше, в котором линкерная последовательность состоит из 8-50 аминокислотных остатков.

40. Антитело по п.39 выше, в котором линкерную последовательность выбирают из группы, состоящей из аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly, аминокислотных последовательностей, показанных как SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, аминокислотной последовательности, состоящей из трех последовательно связанных аминокислотных последовательностей, каждая из которых показана как SEQ ID NO: 3, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 из них, которые последовательно связаны.

41. Слитый белок антитела против рецептора трансферрина человека и другого белка (А), в котором антителом против рецептора трансферрина человека является антитело по любому из пп.1-40 выше, а белок (А) связан с легкой цепью антитела на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне.

42. Слитый белок по п.41 выше, при этом белок (А) связан непосредственно или через линкер с легкой цепью на ее С-терминальной стороне или N-терминальной стороне.

43. Слитый белок по п.41 или 42 выше, в котором белок (А) связан через линкер с легкой цепью на ее С-терминальной стороне или N-терминальной стороне.

44. Слитый белок по п.43 выше, в котором линкером является пептид, состоящий из 1-50 аминокис-

лотных остатков.

45. Слитый белок по п.44 выше, в котором линкером является пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 из них, которые последовательно связаны.

46. Слитый белок антитела против рецептора трансферрина человека и другого белка (А), в котором антителом против рецептора трансферрина человека является антитело по любому из пп.1-40 выше, а белок (А) связан с тяжелой цепью антитела на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне.

47. Слитый белок по п.46 выше, в котором белок (А) связан непосредственно или через линкер с тяжелой цепью на ее С-терминальной стороне или N-терминальной стороне.

48. Слитый белок по п.46 или 47 выше, в котором белок (А) связан через линкер с тяжелой цепью на ее С-терминальной стороне или N-терминальной стороне.

49. Слитый белок по п.48 выше, в котором линкерной последовательностью является пептид, состоящий из 1-50 аминокислотных остатков.

50. Слитый белок по п.49 выше, в котором линкером является пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 из них, которые последовательно связаны.

51. Слитый белок по любому из пп.41-50 выше, в котором белком (А) является белок, происходящий от человека.

52. Слитый белок по любому из пп.41-51 выше, в котором белок (А) выбирают из группы, состоящей из фактора роста нервов (NGF), лизосомальных ферментов, цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), нейротрофического фактора глиальной клеточной линии (GDNF), нейротрофина-3, нейротрофина-4/5, нейротрофина-6, нейрегулина-1, эритропоэтина, дарбэпоэтина, активина, основного фактора роста фибробластов (bFGF), фактора роста фибробластов 2 (FGF2), эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), интерферона α , интерферона β , интерферона γ , интерлейкина 6, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), цитокинов, рецептора фактора некроза опухоли- α (рецептора TNF- α), лигандов PD-1, PD-L1, PD-L2, ферментов, обладающих разрушающей β -амилоид активностью, антитела против β -амилоида, антитела против BACE, антитела против EGFR, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против PD-L2, антитела против HER2, антитела против TNF- α , антитела против CTLA-4 и других лекарств на основе антител.

53. Слитый белок, в котором белком (А) является лизосомальный фермент, в котором лизосомальный фермент выбирают из группы, состоящей из α -L-идуронидазы, идуронат-2-сульфатазы, человеческой кислой α -глюкозидазы, глюкоцереброзидазы, β -галактозидазы, белка-активатора GM2, β -гексозаминидазы А, β -гексозаминидазы В, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы, α -маннозидазы, β -маннозидазы, галактозилцерамидазы, сапозина С, арилсульфатазы А, α -L-фукозидазы, аспартилглюкозаминидазы, α -N-ацетилгалактозаминидазы, кислой сфингомиелиназы, а-галактозидазы А, β -глюкуронидазы, гепаран-N-сульфатазы, α -N-ацетилглюкозаминидазы, ацетил-КоА: α -глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат-сульфатазы, кислой керамидазы, амило-1,6-глюкозидазы, сиалидазы, пальмитоил-белок тиоэстеразы 1, трипептидил-пептидазы 1, гиалуронидазы 1, CLN1 и CLN2.

54. Слитый белок по любому из пп.41-51 выше, в котором белком (А) является человеческая идуронат-2-сульфатаза, человеческая кислая α -глюкозидаза или человеческая α -L-идуронидаза.

55. Слитый белок по п.51 выше, в котором белком (А) является человеческая кислая α -глюкозидаза, при этом:

(1) легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а

(2) тяжелая цепь антитела связана на ее С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с человеческой кислой α -глюкозидазой, образуя посредством этого аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 58.

56. Слитый белок по п.51 выше, в котором белком (А) является человеческая кислая α -глюкозидаза, при этом:

(1) легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а

(2) тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 или SEQ ID NO: 68, и тяжелая цепь связана на ее С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с человеческой кислой α -глюкозидазой, имеющей аминокислотную последова-

тельность SEQ ID NO: 55 или 56.

57. Слитый белок по п.51 выше, в котором белком (А) является человеческая кислая α -глюкозидаза, при этом антителом является Fab-антитело, и в котором:

- (1) легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а
- (2) тяжелая цепь антитела связана на ее С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности, состоящей из трех последовательно связанных аминокислотных последовательностей, каждая из которых показана как SEQ ID NO: 3, с человеческой кислой α -глюкозидазой, образуя посредством этого аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89.

58. Слитый белок по п.51 выше, в котором белком (А) является человеческая кислая α -глюкозидаза, при этом антителом является Fab-антитело, и в котором:

- (1) легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а
- (2) тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и тяжелая цепь связана на ее С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности, состоящей из трех последовательно связанных аминокислотных последовательностей, каждая из которых показана как SEQ ID NO: 3, с человеческой кислой α -глюкозидазой, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 или 56.

59. Слитый белок по п.51 выше, в котором белком (А) является человеческая α -L-идуронидаза, в котором антителом является Fab-антитело и в котором:

- (1) легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а
- (2) тяжелая цепь антитела связана на ее С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности, состоящей из трех последовательно связанных аминокислотных последовательностей, каждая из которых показана как SEQ ID NO: 3, с человеческой α -L-идуронидазой, образуя посредством этого аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

60. Слитый белок по п.51 выше, в котором белком (А) является человеческая α -L-идуронидаза, в котором антителом является Fab-антитело и в котором:

- (1) легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а
- (2) тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и тяжелая цепь связана на ее С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности, состоящей из трех последовательно связанных аминокислотных последовательностей, каждая из которых показана как SEQ ID NO: 3, с человеческой α -L-идуронидазой, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 или 76.

61. Слитый белок по п.41 выше, в котором между белком (А) и антителом введена Fc-область IgG человека или ее часть.

62. Слитый белок по п.61 выше, в котором Fc-область IgG человека связана прямо или посредством линкерной последовательности с белком (А) на его С-терминальной стороне, а тяжелая цепь или легкая цепь антитела связана прямо или посредством линкерной последовательности с Fc-областью IgG человека на его С-терминальной стороне.

63. Слитый белок по п.61 или 62 выше, в котором Fc-область IgG человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

64. Слитый белок по п.63 выше, в котором Fc-область IgG человека связана посредством линкерной последовательности с тяжелой цепью Fab, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61, и содержит образованную таким образом аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

65. Фрагмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность антитела против рецептора трансферрина человека по любому из пп.1-40 выше.

66. Фрагмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность белка слияния по любому из пп.41-64 выше.

67. Вектор экспрессии, содержащий включенный в него фрагмент ДНК по п.65 или 66 выше.

68. Клетка млекопитающего, трансформированная экспрессирующим вектором по п.67 выше.

69. Комплекс антитела против рецептора трансферрина человека-фармакологически активное соединение, в котором легкая цепь и/или тяжелая цепь антитела против рецептора трансферрина человека по любому из пп.1-40 выше связана с фармакологически активным низкомолекулярным соединением, которому необходимо обеспечить возможность прохождения через гематоэнцефалический барьер и проявления его функции в головном мозге.

70. Комплекс антитела против рецептора трансферрина человека-фармакологически активное соединение по п.69 выше, в котором фармакологически активным соединением является любое соединение, выбранное из группы, состоящей из противоракового препарата, терапевтического средства для болезни Альцгеймера, терапевтического средства для болезни Паркинсона, терапевтического средства для болезни Гентингтона, терапевтического средства для шизофрении, антидепрессанта, терапевтического средства для рассеянного склероза, терапевтического средства для бокового амиотрофического склероза, терапевтического средства для опухолей центральной нервной системы, включая опухоль головного мозга, терапевтического средства для лизосомальной болезни накопления, сопровождающейся энцефа-

лопатией, терапевтического средства для гликогеноза, терапевтического средства для мышечной дистрофии, терапевтического средства для церебральной ишемии, терапевтического средства для прионных заболеваний, терапевтического средства для травматических расстройств центральной нервной системы, терапевтического средства для вирусных и бактериальных заболеваний центральной нервной системы, фармацевтического средства, применяемого для восстановления после хирургической операции головного мозга, фармацевтического средства, применяемого для восстановления после хирургической операции спинного мозга, siRNA, антисмысловой ДНК и пептида.

71. Применение антитела против рецептора трансферрина человека по любому из пп.1-40 выше, обеспечивая прохождение белка (А) или фармакологически активного низкомолекулярного соединения через гематоэнцефалический барьер и проявление его функции в головном мозге.

72. Применение антитела против рецептора трансферрина человека по любому из пп.1-40 выше для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения болезненного состояния центральной нервной системы путем связывания с ним молекулы физиологически активного белка или фармакологически активного низкомолекулярного соединения для болезненного состояния.

73. Способ лечения болезненного состояния центральной нервной системы, включающий парентеральное введение пациенту с расстройством терапевтически эффективного количества физиологически активного белка или фармакологически активного низкомолекулярного соединения для расстройства в виде конъюгата с молекулой антитела против рецептора трансферрина человека по любому из пп.1-40 выше.

74. Применение белка слияния по любому из пп.52-58 выше для обеспечения прохождения человеческой кислой α -глюкозидазы через гематоэнцефалический барьер и проявления его функции в головном мозге.

75. Применение белка слияния по любому из пп.52-58 выше для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения болезненного состояния центральной нервной системы, сопровождающего болезнь Помпе.

76. Способ лечения заболевания центральной нервной системы, сопровождающего болезнь Помпе, включающий парентеральное введение терапевтически эффективного количества белка слияния по любому из пп.52-58 выше пациенту с заболеванием.

77. Применение белка слияния по любому из пп.52-54, 59 и 60 выше для обеспечения прохождения человеческой кислой α -L-идуронидазы через гематоэнцефалический барьер и проявления его функции в головном мозге.

78. Применение белка слияния по любому из пп.52-54, 59 и 60 выше для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения болезненного состояния центральной нервной системы, сопровождающего синдром Гурлера или синдром Гурлера-Шейе.

79. Способ лечения заболевания центральной нервной системы, сопровождающего синдром Гурлера или синдром Гурлера-Шейе, причем способ включает парентеральное введение терапевтически эффективного количества белка слияния по любому из пп.52-54, 59 и 60 выше пациенту с заболеванием.

Результаты изобретения.

С помощью настоящего изобретения различные соединения, такие как белки и низкомолекулярного соединения, которые, хотя физиологически или фармакологически активны, были непригодны для парентерального введения по причине своей маленькой способности проходить через гематоэнцефалический барьер или ее отсутствия, можно предоставить в форме, которая обеспечивает возможность их прохождения через гематоэнцефалический барьер, таким образом делая их новыми фармацевтическими средствами для парентерального введения для лечения болезненного состояния центральной нервной системы.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - замещающие фотографии для чертежей, показывающие результат иммуногистохимического окрашивания антител против hTfR в коре головного мозга обезьяны-крабода после одного внутривенного введения антитела против hTfR. (а) Антитело против hTfR не вводили, (b) антитело против hTfR № 3 вводили. Шкала в нижнем правом углу на каждой фотографии имеет размер 50-мкм.

Фиг. 2 - фигура, показывающая результат иммуногистохимического окрашивания антител против hTfR в гиппокампе обезьяны-крабода после одного внутривенного введения антитела против hTfR. (а) Антитело против hTfR не вводили, (b) антитело против hTfR № 3 вводили. Шкала в нижнем правом углу на каждой фотографии имеет размер 50-мкм.

Фиг. 3 - замещающие фотографии для чертежей, показывающие результат иммуногистохимического окрашивания антител против hTfR в мозжечке обезьяны-крабода после одного внутривенного введения антитела против hTfR. (а) Антитело против hTfR не вводили, (b) антитело против hTfR № 3 вводили. Шкала в нижнем правом углу на каждой фотографии имеет размер 50-мкм.

Фиг. 4 - фигура, показывающая количество гуманизированных антител против hTfR, накопленных в разных органах, не являющихся головным мозгом обезьяны-крабода после одного внутривенного введения. Вертикальная ось обозначает количество гуманизированных антител против hTfR (мкг/г сырой

массы) на сырую массу каждого органа. Белые столбики представляют, слева, количество, накопленное в каждом органе обезьяны после введения гуманизированного антитела против hTfR № 3, гуманизированного антитела против hTfR № 3-2, гуманизированного антитела против hTfR № 3 (IgG4) и гуманизированного антитела против hTfR № 3-2 (IgG4), соответственно, а черные столбики представляют количество, накопленное в соответствующих органах обезьяны после введения трастузумаба (Герцептин™). "ND" обозначает "не выявлено".

Фиг. 5 - замещающие фотографии для чертежей, показывающие результат иммуногистохимического окрашивания гуманизированных антител против hTfR в коре головного мозга обезьяны-крабоеда после одного внутривенного введения, (а) Вводили герцептин, (b) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3, (c) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3-2, (d) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3 (IgG4), (e) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3-2 (IgG4). Шкала в нижнем правом углу на каждой фотографии имеет размер 20-мкм.

Фиг. 6 - замещающие фотографии для чертежа, показывающие результат иммуногистохимического окрашивания гуманизированных антител против hTfR в гиппокампе обезьяны-крабоеда после одного внутривенного введения. (а) Вводили герцептин, (b) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3, (c) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3-2, (d) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3 (IgG4), (e) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3-2 (IgG4). Шкала в нижнем правом углу на каждой фотографии имеет размер 20-мкм.

Фиг. 7 - фигура, показывающая результат иммуногистохимического окрашивания гуманизированных антител против hTfR в мозжечке обезьяны-крабоеда после одного внутривенного введения. (а) Вводили герцептин, (b) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3, (c) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3-2, (d) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3 (IgG4), (e) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3-2 (IgG4). Шкала в нижнем правом углу на каждой фотографии имеет размер 20-мкм.

Фиг. 8 - фигура, показывающая результат иммуногистохимического окрашивания гуманизированных антител против hTfR в продолговатом мозге обезьяны-крабоеда после одного внутривенного введения. (а) Вводили герцептин, (b) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3, (c) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3-2, (d) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3 (IgG4), (e) вводили гуманизированное антитело против hTfR № 3-2 (IgG4). Шкала в нижнем правом углу на каждой фотографии имеет размер 20-мкм.

Фиг. 9 - фигура, показывающая результат иммуногистохимического окрашивания hGAA в мозжечке обезьяны-крабоеда после одного внутривенного введения, (а) вводили hGAA-антитело против hTfR 3N (IgG4), (b) вводили hGAA. Шкала в нижнем правом углу на каждой фотографии имеет размер 20-мкм.

Фиг. 10 - фигура, показывающая результат оценки фармакологического действия hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) с использованием мыши. Приведены концентрации гликогена в (а) правом полушарии головного мозга, (b) шейном отделе спинного мозга, (c) сердце, (d) диафрагме, (e) печени и (f) селезенке. На каждой фигуре число 1 обозначает нормальную контрольную группу, число 2 обозначает контрольную группу заболевания, число 3 обозначает группу введения 20 мг/кг hGAA, а числа 4-7 обозначают группы введения 2,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг, соответственно, hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4). Ордината обозначает концентрацию гликогена (мг/г в показателях сырой массы). Вертикальная шкала обозначает SD, "#" обозначает $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой заболевания, "##" обозначает $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой заболевания, "\$" обозначает $p < 0,01$ по сравнению с группой введения hGAA, а "\$\$" обозначает $p < 0,05$ по сравнению с группой введения hGAA (каждое на основе критерия Тьюки).

Фиг. 11 - фигура, показывающая результат оценки фармакологического действия hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) с использованием мыши. Концентрации гликогена в (а) четырехглавой мышце бедра, (b) икроножной мышце, (c) камбаловидной мышце, (d) передней большеберцовой мышце и (e) икроножной мышце длинного разгибателя пальцев. На каждой фигуре число 1 обозначает нормальную контрольную группу, число 2 обозначает контрольную группу заболевания, число 3 обозначает группу введения hGAA, а числа 4-7 обозначают группы введения 2,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг, соответственно, hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4). Ордината обозначает концентрацию гликогена (мг/г в показателях сырой массы). Вертикальная шкала обозначает SD, "#" обозначает $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой заболевания, "##" обозначает $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой заболевания, "\$" обозначает $p < 0,01$ по сравнению с группой введения hGAA, а "\$\$" обозначает $p < 0,05$ по сравнению с группой введения hGAA (каждое на основе критерия Тьюки).

Фиг. 12 - фигура, показывающая результат оценки фармакологического действия Fab GS-GAA с использованием мыши. Концентрации гликогена в (а) правом полушарии головного мозга, (b) сердце, (c) диафрагме, (d) четырехглавой мышце бедра, (e) камбаловидной мышце и (f) передней большеберцовой мышце. На каждой фигуре число 1 обозначает нормальную контрольную группу, число 2 обозначает контрольную группу заболевания, число 3 обозначает группу введения hGAA, а числа 4 и 5 обозначают 5, 0 мг/кг и 20 мг/кг, соответственно, Fab GS-GAA. Ордината обозначает концентрацию гликогена (мг/г в показателях сырой массы). Вертикальная шкала обозначает SD.

Варианты осуществления изобретения.

Согласно настоящему изобретению термин "антитело" относится главным образом к человеческому антителу, мышинному антителу, гуманизированному антителу, а также химерному антителу между человеческим антителом и антителом нечеловекообразного млекопитающего, и химерному антителу между мышинным антителом и антителом не являющегося мышью млекопитающего, но значение термина этим не ограничено, поскольку интересующее вещество имеет свойство специфического связывания с определенным антигеном, и не существует особого ограничения в отношении видов животных антитела. Однако предпочтительным является гуманизированное антитело.

Согласно настоящему изобретению термин "человеческое антитело" относится к антителу, весь белок которого закодирован геном, происходящим от человека. Однако термин "человеческое антитело" также включает антитело, закодированное геном, полученным путем введения мутации в исходный ген человека с целью повышения эффективности экспрессии гена, например, без модификации исходной аминокислотной последовательности. Термин "человеческое антитело" также включает антитело, которое получено путем соединения двух или более генов, кодирующих человеческие антитела, и замены некоторой части человеческого антитела частью другого человеческого антитела. Человеческое антитело содержит три определяющие комплементарность области (CDR) в легкой цепи иммуноглобулина и три определяющие комплементарность области (CDR) в тяжелой цепи иммуноглобулина. Три CDR в легкой цепи иммуноглобулина называются, с N-терминальной стороны, CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно. Три CDR в тяжелой цепи иммуноглобулина также называются, с N-терминальной стороны, CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно. Термин "человеческое антитело" также включает человеческое антитело, полученное путем замены CDR человеческого антитела на CDR другого человеческого антитела для изменения таких свойств как специфичность к антигену и аффинность исходного человеческого антитела и т.д.

Согласно настоящему изобретению термин "человеческое антитело" также включает антитело, которое получено посредством модификации гена исходного человеческого антитела путем введения такой мутации, как замещение, делеция, добавление, в аминокислотную последовательность исходного антитела. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности исходного антитела другими аминокислотами количество замещенных аминокислот может предпочтительно составлять 1-20, более предпочтительно 1-5, а еще более предпочтительно 1-3. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности исходного антитела количество удаленных аминокислот может предпочтительно составлять 1-20, более предпочтительно 1-5, а еще более предпочтительно 1-3. Антитело, полученное посредством комбинированной мутации этих замещения и делеции аминокислот, также является "человеческим антителом". В некоторых случаях одну или более аминокислот, предпочтительно 1-20, более предпочтительно 1-5, а еще более предпочтительно 1-3 аминокислот можно добавить внутрь аминокислотной последовательности исходного антитела или с ее N- или C-терминальной стороны. Антитело, полученное посредством комбинированной мутации добавления, замещения и делеции аминокислот также является "человеческим антителом".

Аминокислотная последовательность такого мутантного антитела имеет гомологию предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%, и еще более предпочтительно не ниже чем 98%, с аминокислотной последовательностью исходного антитела. Таким образом, согласно настоящему изобретению термин "ген, происходящий от человека" включает не только немутировавший ген, происходящий от человека, но также ген, полученный путем его модификации.

Гомологию между аминокислотной последовательностью немутировавшего антитела и аминокислотной последовательностью антитела, полученного путем введения в нее мутации, можно легко рассчитать, используя хорошо известные алгоритмы расчета гомологии. В качестве таких алгоритмов имеются, например, BLAST (Altschul S.F. J. Mol. Biol. 215. 403-10 (1990)), поиск сходства по Пирсону и Липману (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85. 2444 (1988)) и алгоритм поиска локальной гомологии Смита-Уотермана (Adv. Appl. Math. 2. 482-9 (1981)) и тому подобное.

Согласно настоящему изобретению термин "мышинное антитело" относится к антителу, весь белок которого состоит из аминокислотной последовательности, такой же, как у антитела, закодированного геном, происходящим от мыши. Следовательно, термин "мышинное антитело" также включает антитело, которое закодирован геном, полученным путем введения мутации в исходный ген мыши, не вызвавшей изменения в его аминокислотной последовательности, но, например, для того, чтобы улучшить эффективность экспрессии гена. Кроме того, термин "мышинное антитело" также включает антитело, полученное путем комбинирования двух или более генов, кодирующих мышинные антитела путем замены части мышинного антитела частью другого мышинного антитела. Мышинное антитело имеет три определяющие комплементарность области (CDR) в легкой цепи иммуноглобулина и три определяющие комплементарность области (CDR) в тяжелой цепи иммуноглобулина. Три CDR в легкой цепи иммуноглобулина называются, с N-терминальной стороны, CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно. Три CDR в тяжелой цепи иммуноглобулина также называются, с N-терминальной стороны, CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно. Термин "мышинное антитело" также включает антитело, полученное путем замены CDR мышинного антитела на CDR другого мышинного антитела для изменения специфичности и аффинности исходных мыши-

ных антител.

Согласно настоящему изобретению термин "мышинное антитело" также включает антитело, которое получено посредством модификации гена исходного мышинного антитела путем введения такой мутации, как замещение, делеция, добавление, в аминокислотную последовательность исходного антитела. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности исходного антитела другими аминокислотами, количество замещенных аминокислот может предпочтительно составлять 1-20, более предпочтительно 1-5, а еще более предпочтительно 1-3. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности исходного антитела количество удаленных аминокислот может предпочтительно составлять 1-20, более предпочтительно 1-5, а еще более предпочтительно 1-3. Антитело, полученное посредством комбинированной мутации этих замещения и делеции аминокислот, также включено в "мышинное антитело". При добавлении одной или более аминокислот, их можно добавить внутрь аминокислотной последовательности исходного антитела или с ее N-или C-терминальной стороны в количестве предпочтительно 1-20, более предпочтительно 1-5, а еще более предпочтительно 1-3. Антитело, полученное посредством комбинированной мутации добавления, замещения и делеции аминокислот, также включено в "мышинное антитело". Аминокислотная последовательность такого мутантного антитела имеет гомологию предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%, и еще более предпочтительно не ниже чем 98% с аминокислотной последовательностью исходного антитела. Таким образом, согласно настоящему изобретению термин "ген, происходящий от мыши" включает не только немутировавший ген, происходящий от мыши, но также ген, полученный путем его модификации.

Согласно настоящему изобретению термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, в котором часть аминокислотной последовательности ее варибельной области (например, в частности всех или части его CDR) происходит от нечеловекообразного млекопитающего, тогда как остальная часть происходит от человека. Примером гуманизированного антитела является антитело, полученное путем замены трех определяющих комплементарность областей (CDR) легкой цепи иммуноглобулина и трех определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи иммуноглобулина, составляющих человеческое антитело, на CDR от нечеловекообразного млекопитающего. Поскольку оно происходит от нечеловекообразного млекопитающего, нет особого ограничения в отношении биологических видов, от которых происходят те CDR, которые трансплантируют в надлежащую позицию человеческого антитела, хотя предпочтительными являются мышь, крыса, кролик, лошадь или нечеловекообразный примат, более предпочтительными являются мышь и крыса, и еще более предпочтительной является мышь.

Согласно настоящему изобретению термин "химерное антитело" относится к антителу, полученному посредством соединения фрагментов двух или более разных антител, происходящих от двух или более разных видов.

Химерным антителом между человеческим антителом и антителом нечеловекообразного млекопитающего является антитело, предоставленное путем замены части человеческого антитела частью антитела нечеловекообразного млекопитающего. Как объяснено ниже, антитело состоит из Fc-области, Fab-области и шарнирной области. Конкретным примером таких химерных антител является химерное антитело, Fc-область которого происходит из человеческого антитела, тогда как его Fab-область происходит из антитела нечеловекообразного млекопитающего. Шарнирная область происходит либо из человеческого антитела, либо из антитела нечеловекообразного млекопитающего. Напротив, термин химерное антитело также включает антитело, Fc-область которого происходит из антитела нечеловекообразного млекопитающего, тогда как его Fab-область происходит из человеческого антитела. В таком случае также шарнирная область происходит либо из человеческого антитела, либо из антитела нечеловекообразного млекопитающего.

Можно видеть, что антитела состоят из варибельной области и константной области. Дополнительные примеры химерных антител включают антитело, в котором константная область тяжелой цепи (C_H) и константная область легкой цепи (C_L) обе происходят из человеческого антитела, тогда как варибельная область тяжелой цепи (V_H) и варибельная область легкой цепи (V_L) обе происходят из антитела нечеловекообразного млекопитающего, и наоборот, антитело, в котором константная область тяжелой цепи (C_H) и константная область легкой цепи (C_L) обе происходят из антитела нечеловекообразного млекопитающего, тогда как варибельная область тяжелой цепи (V_H) и варибельная область легкой цепи (V_L) обе происходят из человеческого антитела. Поскольку это нечеловеческое млекопитающее, у них нет особых ограничений в отношении биологических видов нечеловекообразного млекопитающего, хотя предпочтительными являются мышь, крыса, кролик, лошадь или нечеловекообразный примат, и более предпочтительным является мышь.

Химерным антителом между мышинным антителом и антителом не являющегося мышью млекопитающего является антитело, предоставленное путем замены части мышинного антитела частью антитела не являющегося мышью млекопитающего. Конкретные примеры таких химерных антител включают химерное антитело, Fc-область которого происходит из мышинного антитела, тогда как его Fab-область происходит из антитела не являющегося мышью млекопитающего, и наоборот, химерное антитело, Fc-область которого происходит из не являющегося мышью млекопитающего, тогда как его Fab-область

происходит из мышиного антитела. Поскольку это не являющееся мышью млекопитающее, у них нет особого ограничения в отношении биологических видов не являющегося мышью млекопитающего, хотя предпочтительными являются крыса, кролик, лошадь или нечеловекообразный примат, и более предпочтительным является человек.

Химерное антитело между человеческим антителом и мышиным антителом обозначено в частности "человеческое/мышиное химерное антитело". Примеры человеческих/мышиных химерных антител включают химерное антитело, в котором Fc-область происходит из человеческого антитела, тогда как Fab-область происходит из мышиного антитела, и наоборот, химерное антитело, Fc-область которого происходит из мышиного антитела, тогда как его Fab-область происходит из человеческого антитела. Шарнирная область происходит либо из человеческого антитела, либо из мышиного антитела. Дополнительные конкретные примеры человеческих/мышиных химерных антител включают антитела, константная область тяжелой цепи (C_H) и константная область легкой цепи (C_L) которых происходят из человеческого антитела, тогда как их переменная область тяжелой цепи (V_H) и переменная область легкой цепи (V_L) происходят из мышиного антитела, и наоборот антитела, константная область тяжелой цепи (C_H) и константная область легкой цепи (C_L) которых происходят из мышиного антитела, тогда как их переменная область тяжелой цепи (V_H) и переменная область легкой цепи (V_L) происходят из человеческого антитела.

Первоначально, антитело имеет основную структуру, имеющую четыре полипептидные цепи, в общей сложности состоящие из двух легких цепей иммуноглобулина и двух тяжелых цепей иммуноглобулина. Однако согласно настоящему изобретению термин "антитело" кроме антитела, имеющего эту основную структуру, также относится к:

- (1) антителу, состоящему из двух полипептидных цепей: одной легкой цепи иммуноглобулина и одной тяжелой цепи иммуноглобулина, а также, как объяснено далее,
- (2) одноцепочечному антителу, состоящему из легкой цепи иммуноглобулина, которая связана на ее С-терминальной стороне с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана на ее С-терминальной стороне с тяжелой цепью иммуноглобулина,
- (3) одноцепочечным антителам, состоящим из тяжелой цепи иммуноглобулина, которая связана на ее С-терминальной стороне с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана на ее С-терминальной стороне с легкой цепью иммуноглобулина, а
- (4) антитело, состоящее из Fab-области, т.е. структуры, оставшейся после удаления Fc-области из антитела, имеющего основную структуру в качестве исходного значения, и антитело, состоящее из Fab-области и всей или части шарнирной области (включая Fab, $F(ab')$ и $F(ab')_2$), также включены в термин "антитело" согласно настоящему изобретению.

Термин "Fab" относится к молекуле, состоящей из одной легкой цепи, содержащей переменную область и C_L область (константную область легкой цепи), и одной тяжелой цепи, содержащей переменную область и C_{H1} область (участок 1 константной области тяжелой цепи), которые соединены дисульфидной связью между их соответствующими цистеиновыми остатками. Хотя тяжелая цепь в Fab может содержать часть шарнирной области в дополнение к переменной области и C_{H1} области (участку 1 константной области тяжелой цепи), шарнирная область в таком случае не имеет цистеинового остатка, который в ином случае присутствует в шарнирной области и будет служить, чтобы связать вместе две тяжелые цепи антитела. В Fab легкая цепь и тяжелая цепь соединены дисульфидной связью, образованной между цистеиновым остатком, имеющимся в константной области легкой цепи (C_L области), и цистеиновым остатком, расположенным в константной области тяжелой цепи (C_{H1} области) или шарнирной области. Тяжелая цепь, образующая Fab, называется тяжелая цепь Fab. Так как она не имеет цистеинового остатка в шарнирной области, которая служит для связывания двух тяжелых цепей антитела, Fab состоит из одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Легкая цепь, составляющая Fab, содержит переменную область и C_L область. Тяжелая цепь в качестве компонента Fab может состоять либо из переменной области и C_{H1} области, либо также из части шарнирной области в дополнение к переменной области и C_{H1} области. Однако в последнем случае шарнирную область выбирают таким образом, чтобы она не содержала цистеиновый остаток, который может связывать две тяжелые цепи, для того, чтобы избежать образования дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями в их шарнирных областях. В $F(ab')$ тяжелая цепь в дополнение к переменной области и C_{H1} области содержит целую или часть шарнирной области, содержащей цистеиновый остаток, который может связывать две тяжелые цепи. $F(ab')_2$ представляет собой молекулу, состоящую из двух $F(ab')$, связанных вместе через дисульфидную связь, образованную между цистеиновыми остатками, имеющимися в их соответствующих шарнирных областях. Тяжелая цепь, образующая $F(ab')$ или $F(ab')_2$, называется тяжелая цепь Fab' . Кроме того, в термин "антитело" также включен полимер, такой как димер и тример, который состоит из двух или более антител, соединенных друг с другом непосредственно или через линкер. Кроме того, в термин "антитело" согласно настоящему изобретению в дополнение к упомянутому выше также включена любая молекула, которая содержит часть молекулы иммуноглобулина и имеет свойство специфического связывания с антигеном. Таким образом, согласно настоящему изобретению термин "легкая цепь иммуноглобулина" включает молекулу, которая получена из исходной легкой цепи иммуноглобулина и имеет аминокислотную

последовательность всей или части ее вариабельной области. Также, термин "тяжелая цепь иммуноглобулина" включает молекулу, которая получена из исходной тяжелой цепи иммуноглобулина и имеет аминокислотную последовательность всей или части ее вариабельной области. Следовательно, поскольку она имеет всю или часть аминокислотной последовательности вариабельной области, молекула включена в термин "тяжелая цепь иммуноглобулина", даже если она, например, не имеет ее Fc-области.

В сказанном выше термин "Fc" или "Fc-область" относится к области, содержащей фрагмент, состоящий из C_H2 области (участка 2 константной области тяжелой цепи) и C_H3 области (участка 3 константной области тяжелой цепи) в молекуле антитела.

Кроме того, согласно настоящему изобретению термин "антитело" также включает:

(5) scFab, scF(ab')₂ и scF(ab')₂, которые представляют собой одноцепочечные антитела, полученные за счет связывания легкой цепи с тяжелой цепью, которые образуют, соответственно, Fab, F(ab') и F(ab')₂, упомянутые в (4) выше, посредством линкерной последовательности. Такие scFab, scF(ab') и scF(ab')₂ могут быть молекулой, в которой либо легкая цепь связана на ее С-терминальной стороне с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана на ее С-терминальной стороне с тяжелой цепью, либо тяжелая цепь связана на ее С-терминальной стороне с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана на ее С-терминальной стороне с легкой цепью. Кроме того, в термин "антитело" согласно настоящему изобретению также включено scFv, которое представляет собой одноцепочечное антитело, предоставленное за счет связывания вариабельной области легкой цепи с вариабельной областью тяжелой цепи, посредством линкерной последовательности между ними. Таким scFv может быть молекула, в которой либо вариабельная область легкой цепи связана на ее С-терминальной стороне с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана на ее С-терминальной стороне с вариабельной областью тяжелой цепи, либо вариабельная область тяжелой цепи связана на ее С-терминальной стороне с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана на ее С-терминальной стороне с вариабельной областью легкой цепи.

Кроме того, в дополнение к полноразмерному антителу и антителам, описанным в пп.(1)-(5) выше термин "антитело" в настоящем описании включает любой вид антигенсвязывающего фрагмента, у которого отсутствует часть полноразмерного антитела (фрагмента антитела), более широкое понятие, которое включает пп.(4) и (5) выше.

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, который сохраняет по меньшей мере часть активности специфического связывания со своим антигеном. В дополнение к антителам, описанным выше в пп.(4) и (5), примеры связывающих фрагментов включают Fab, Fab', F(ab')₂, вариабельную область (Fv); одноцепочечное антитело (scFv), полученное за счет связывания вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и вариабельной области легкой цепи (V_L) посредством надлежащего линкера между ними; диатело, которое представляет собой димер полипептида, который содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельная область легкой цепи (V_L); миниантитело, которое представляет собой димер молекулы, в которой тяжелая цепь (H цепь) scFv связана с частью константной области (C_H3), и другие низкомолекулярные антитела. Однако поскольку оно обладает антигенсвязывающей способностью, термин не ограничен этими молекулами. Такие связывающие фрагменты включают не только фрагменты, полученные за счет обработки полноразмерной молекулы белка антитела надлежащим ферментом, но также фрагменты, полученные с помощью надлежащих клеток-хозяев с использованием гена генетически сконструированного антитела.

Согласно настоящему изобретению термин "одноцепочечное антитело" относится к белку, в котором аминокислотная последовательность, содержащая всю или часть вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина связана на ее С-терминальной стороне с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана на ее С-терминальной стороне с аминокислотной последовательностью всей или части вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина, и обладающего способностью специфического связывания определенного антигена. Например, антитела, описанные в пп.(2), (3) и (5), включены в "одноцепочечное антитело". Кроме того, белок, в котором аминокислотная последовательность, содержащая всю или часть вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина, связана на ее С-терминальной стороне с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, дополнительно связана на ее С-терминальной стороне с аминокислотной последовательностью всей или части вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина, и которая обладает способностью специфического связывания с определенным антигеном, также включен в термин "одноцепочечное антитело" согласно настоящему изобретению. В одноцепочечном антителе, в котором тяжелая цепь иммуноглобулина связана на ее С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с легкой цепью иммуноглобулина, тяжелая цепь иммуноглобулина обычно не имеет Fc-области. Вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина имеет три определяющие комплементарности области (CDR), которые участвуют в определении специфичности к антигену антитела. Также, вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина также имеет три CDR. Эти CDR являются основными областями, которые определяют специфичность антитела к антигену. Следовательно, одноцепочечное антитело предпочтительно содержит все три CDR тяжелой цепи иммуноглобулина и все три CDR легкой цепи иммуноглобулина. Однако также возможно предоставить одноцепочечное антитело, в котором одна или более этих CDR удалены в таком

мере, чтобы сохранить антигенспецифическую аффинность антитела.

В одноцепочечном антителе линкерной последовательностью, помещенной между легкой цепью и тяжелой цепью иммуноглобулина, предпочтительно является пептидная цепь, предпочтительно состоящая из 2-50, более предпочтительно 8-50, еще более предпочтительно 10-30, еще более предпочтительно 12-18 или 15-25, например 15 или 25 аминокислотных остатков. Хотя нет особых ограничений в отношении конкретной аминокислотной последовательности такой линкерной последовательности, поскольку антитело против hTfR, содержащее обе цепи, связанные таким образом, сохраняет аффинность к hTfR, предпочтительно, чтобы оно состояло только из глицина или из глицина и серина: например, аминокислотная последовательность Gly-Ser, аминокислотная последовательность Gly-Gly-Ser, аминокислотная последовательность Gly-Gly-Gly, аминокислотная последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотная последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотная последовательность Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательность, которая содержит 2-10 или 2-5 повторов любой из этих аминокислотных последовательностей. Например, при связывании аминокислотной последовательности всей вариационной области тяжелой цепи иммуноглобулина на ее С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с вариационной областью легкой цепи иммуноглобулина линкерной последовательностью предпочтительно является линкерная последовательность, содержащая 15 аминокислот, соответствующих трем из аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), последовательно связанных.

Согласно настоящему изобретению термин "рецептор трансферрина человека" или "hTfR" относится к мембранному белку, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. Антителом против hTfR согласно настоящему изобретению в одном из его вариантов осуществления является антитело, которое специфически связывается с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, в ее части, начиная от цистеинового остатка в позиции 89 с N-терминальной стороны до фенилаланина на С-конце (т.е., внеклеточной области hTfR), хотя это не ограничено этим вариантом осуществления. Кроме того, согласно настоящему изобретению термин "рецептор трансферрина обезьяны" или "TfR обезьяны" относится в частности к мембранному белку, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, происходящую от обезьяны-крабоеда (*Macaca fascicularis*). Антителом против hTfR согласно настоящему изобретению в одном из его вариантов осуществления является антитело, которое связывается также с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, в ее части, начиная от цистеинового остатка в позиции 89 с N-терминальной стороны до фенилаланина на С-конце (т.е. внеклеточной области TfR обезьяны), хотя это не ограничено этим вариантом осуществления.

Для получения антитела против hTfR известен общий способ, согласно которому получают рекомбинантный рецептор трансферрина человека (rhTfR), используя клетки, которые имеют введенный вектор экспрессии, имеющий встроенный ген hTfR, а затем животных, таких как мыши, иммунизируют этим rhTfR. За счет сбора тех клеток, которые вырабатывают антитела против hTfR от иммунизированных животных, и слияния их с миеломными клетками, можно получить клетки гибридомы, обладающие способностью вырабатывать антител против hTfR.

Кроме того, клетки, вырабатывающие антитела против hTfR, также можно получить путем сбора иммунокомпетентных клеток у животных, таких как мышь, и иммунизации их с rhTfR путем иммунизации *in vitro*. При проведении иммунизации *in vitro* нет особых ограничений в отношении видов животных, у которых получают иммунокомпетентные клетки, хотя предпочтительными являются мышь, крыса, кролик, морская свинка, собака, кошка, лошадь и приматы, включая человека, а более предпочтительными являются мышь, крыса и человек, а еще более предпочтительными являются мышь и человек. В качестве мышинных иммунокомпетентных клеток можно использовать, например, клетки селезенки, полученные из селезенки мыши. В качестве человеческих иммунокомпетентных клеток, можно использовать такие клетки, которые получают из периферической крови человека, костного мозга, селезенки и тому подобное. За счет иммунизации иммунокомпетентных клеток человека согласно иммунизации *in vitro* можно получить человеческое антитело против hTfR.

После иммунизации иммунокомпетентных клеток согласно иммунизации *in vitro* клетки можно слить с миеломными клетками для получения клеток гибридомы, обладающих способностью выработки антител. Кроме того, из иммунизированных клеток также можно выделить мРНК, синтезировать кДНК, провести реакцию ПЦР, используя кДНК в качестве матрицы для амплификации фрагмента ДНК, содержащего ген, кодирующий легкую цепь и тяжелую цепь иммуноглобулина, и используя их искусственно реконструировать ген антитела.

Только что полученные выше клетки гибридомы также включают таких клетки, которые вырабатывают антитела, которые распознают иные белки, чем hTfR. Кроме того, не все клетки гибридомы, вырабатывающие антитела против hTfR, обязательно вырабатывают антитела против hTfR, которые демонстрируют высокую аффинность к hTfR.

Также, искусственно реконструированные гены антитела включают такие гены, которые кодируют антитела, распознающие другие белки, чем hTfR в качестве антигенов. Кроме того, не все гены, кодирующие антитела против hTfR, обязательно обладают требуемыми свойствами, такие как, кодирование антитела против hTfR, обладающего высокой аффинностью к hTfR.

Следовательно, необходим этап селекции для селекции клеток гибридомы, вырабатывающих антитела, обладающие требуемыми свойствами (такими как высокая аффинность к hTfR), из клеток гибридомы, только что полученных выше. Кроме того, в случае, когда гены антитела искусственно реконструируют, этап селекции необходим для селекции из генов антитела гена, кодирующего антитело, обладающее требуемыми свойствами (такими как высокая аффинность к hTfR). Для селекции клеток гибридомы, которые вырабатывают антитела, обладающие высокой аффинностью к hTfR (высокоаффинные антитела), или для селекции генов, кодирующих высокоаффинные антитела, эффективны следующие способы, объясняемые подробно ниже. Кроме того, антителами, обладающими высокой аффинностью к hTfR, являются антитела, константа диссоциации (K_D) которых с hTfR, при измерении способом, описанным в примере 7, предпочтительно составляет не более чем 1×10^{-8} М, более предпочтительно не более чем 1×10^{-9} М, еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-10} М, и еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-11} М. Например, предпочтительными являются антитела, имеющие константу диссоциации от 1×10^{-13} М до 1×10^{-9} М или от 1×10^{-13} М до 1×10^{-10} М.

Например, для селекции клеток гибридомы, которые вырабатывают высокоаффинные антитела к антителу против hTfR, используют способ, в котором на планшет добавляют рекомбинантный hTfR и содержат на нем, затем добавляют супернатант культуры клеток гибридомы, а после удаления с планшета антител, не связанных с рекомбинантным hTfR, измеряют количество антител, содержащихся на планшете. Согласно этому способу, чем выше аффинность к hTfR антител, содержащихся в супернатанте культуры клеток гибридомы, добавленных на планшет, тем больше становится количество антител, содержащихся на планшете. Следовательно, путем измерения количества антител, содержащихся на планшете, можно отобрать те клетки гибридомы, которые соответствуют планшетам, где антитела содержатся в большем количестве, в качестве клеточных линий, вырабатывающих антитела против hTfR, обладающие относительно высокой аффинностью к hTfR. Также можно выделить ген, кодирующий высокоаффинное антитело, путем выделения мРНК из каждой выбранной таким образом клеточной линии, синтеза кДНК и амплификации фрагмента ДНК, содержащего ген, кодирующий антитело против hTfR, посредством ПЦР, используя кДНК в качестве матрицы.

Для того, чтобы выбрать ген, кодирующий высокоаффинное антитело против hTfR из приведенных выше искусственно реконструированных генов антитела, искусственно реконструированные гены антитела один раз встраивают в вектор экспрессии, а затем вектор экспрессии вводят в клетки-хозяева. Хотя нет особых ограничений в отношении клеток, подлежащих использованию в качестве клеток-хозяев, будь они даже прокариотическими, эукариотическими, поскольку они могут экспрессировать ген антитела после введения экспрессирующего вектора, имеющего встроенный искусственно реконструированный ген антитела, предпочтительными являются клетки, происходящие от млекопитающих, таких как человек, мышь, китайский хомяк и тому подобное, и особенно предпочтительными являются клетки СНО, происходящие из клеток яичника китайского хомячка, или клетки NS/0, происходящие из миеломы мыши. Кроме того, нет особых ограничений в отношении экспрессирующего вектора, подлежащего использованию для встраивания кодирующего антитело гена, и его экспрессии, и можно использовать любой вектор экспрессии, поскольку он может экспрессировать ген при встраивании в клетки млекопитающих. Встроенный в вектор экспрессии ген располагают после последовательности ДНК, которая может регулировать частоту транскрипции гена в клетках млекопитающих (участок регуляции экспрессии гена). Примеры участков регуляции экспрессии гена, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, включают полученный из цитомегаловируса промотор, ранний промотор SV40, промотор фактора элонгации-1а человека (EF-1 α), промотор убиквитина С человека.

В клетках млекопитающих, имеющих такой введенный вектор экспрессии, происходит экспрессия искусственно реконструированных антител, встроенных в вектор экспрессии. Для того чтобы выбрать те клетки, которые вырабатывают высокоаффинные антитела к антителам против hTfR из полученных выше клеток, экспрессирующих искусственно реконструированные антитела, используют способ, в котором на планшет добавляют рекомбинантный hTfR, и содержат на нем, затем рекомбинантный hTfR вводят в контакт с супернатантом культуры клеток, а после удаления с планшета антител, не связанных с рекомбинантным hTfR, измеряют количество антител, содержащихся на планшете. Согласно этому способу, чем выше аффинность содержащихся в супернатанте культуры клеток антител к hTfR, тем больше становится количество содержащихся на планшете антител. Следовательно, путем измерения количества содержащихся на планшете антител можно выбрать те клетки, которые соответствуют планшету, где антитела содержатся в большем количестве, в качестве вырабатывающей антитела против hTfR клеточной линии, имеющей относительно высокоаффинные антитела против hTfR, и в конечном итоге можно выбрать ген, кодирующий антитело против hTfR, обладающее высокой аффинностью антитела против hTfR к hTfR. Используя выбранную таким образом клеточную линию можно выполнить ПЦР для амплификации фрагмента ДНК, содержащего ген, кодирующий антитело против hTfR, для выделения гена, кодирующего высокоаффинные антитела.

Селекцию гена, кодирующего высокоаффинное антитело против hTfR, из приведенных выше искусственно реконструированных генов антитела, также можно выполнять путем встраивания искусст-

венно реконструированных генов антитела в вектор экспрессии, введения экспрессирующего вектора в клетки *E.coli*, культивирования клеток *E.coli* и селекции клеток *E.coli*, имеющих требуемый ген, таким же образом, как в приведенной выше селекции клеток гибридомы, используя супернатант культуры клеток *E.coli* или содержащий антитела раствор, полученный путем лизиса клеток *E.coli*. Выбранные таким образом клетки *E.coli* экспрессируют ген, кодирующий антитело против hTfR, обладающее относительно высокой аффинностью к hTfR. Из этой клеточной линии можно отобрать ген, кодирующий антитело против hTfR, обладающее относительно высокой аффинностью антитела против hTfR к hTfR. Для того чтобы обеспечить секрецию антител в супернатант культуры *E.coli*, ген антитела можно встроить в вектор экспрессии таким образом, чтобы присоединить сигнальную последовательность секреции на N-терминальной стороне гена.

Еще одним способом селекции гена, кодирующего высокоаффинное антитело против hTfR, является способ, в котором антитело, кодируемое приведенным выше искусственно реконструированным геном антитела, экспрессируют и удерживают на фаговых частицах. Для этого ген антитела реконструируют в качестве гена, кодирующего одноцепочечное антитело. Способ удерживания фаговых частиц для удерживания антитела на их поверхности раскрыт в международных публикациях WO 1997/09436 и WO 1995/11317 и тому подобное, и таким образом хорошо известен. Для того чтобы отобрать фаги, удерживающие высокоаффинные антитела к антителам против hTfR, из фагов, удерживающих антитела, кодируемые искусственно реконструированными генами антитела, используют способ, в котором рекомбинантный hTfR с планшета добавляют на планшет и содержат на нем в контакте с фагами, и после удаления фагов, не связанных с рекомбинантным hTfR, измеряют количество фагов, содержащихся на планшете. Согласно этому способу, чем выше аффинность к hTfR антител, содержащихся на фаговых частицах, тем больше становится количество фагов, содержащихся на планшете. Следовательно, путем измерения количества фагов, содержащихся на планшете, можно отобрать фаговые частицы, соответствующие планшету, где фаги содержались в большем количестве, в качестве фаговых частиц, вырабатывающих антитело против hTfR, обладающее относительно высокой аффинностью антитела против hTfR к hTfR, и в конечном итоге можно выбрать ген, кодирующий антитело против hTfR с высокой аффинностью к hTfR. Используя отобранные таким образом фаговые частицы, можно выполнить ПЦР для амплификации фрагмента ДНК, содержащего ген, кодирующий антитело против hTfR, и выделить ген, кодирующий высокоаффинное антитело.

Можно получить кДНК или фаговую ДНК из приведенных выше клеток, таких как клетки гибридомы, вырабатывающие высокоаффинные антитела против hTfR, или из приведенных выше фаговых частиц, удерживающих высокоаффинные антитела против hTfR, и провести ПЦР и тому подобное, используя ее в качестве матрицы для амплификации и выделения фрагмента ДНК, содержащего ген, кодирующий всю или часть легкой цепи антитела против hTfR, тяжелой цепи антитела против hTfR или одноцепочечное антитело, в качестве антител против hTfR. Таким же образом, также можно провести ПЦР и тому подобное для амплификации и выделения фрагмента ДНК, содержащего ген, кодирующий всю или часть вариабельной области легкой цепи антитела против hTfR, или фрагмента ДНК, содержащего ген, кодирующий всю или часть вариабельной области тяжелой цепи антитела против hTfR.

Высокоаффинное антитело против hTfR можно получить, встраивая весь или часть гена, кодирующего легкую цепь и тяжелую цепь этого высокоаффинного антитела против hTfR в вектор экспрессии, трансформируя этим экспрессирующим вектором клетки-хозяева, такие как клетки млекопитающих, и культивируя полученные трансформированные клетки. Используя нуклеотидную последовательность выделенного гена, кодирующего антитело против hTfR, также можно транслировать аминокислотную последовательность антитела против hTfR и искусственно синтезировать фрагмент ДНК, кодирующий ту же аминокислотную последовательность. При искусственном синтезе фрагмента ДНК, за счет надлежащей селекции кодонов можно повысить уровень экспрессии антитела против hTfR в клетках-хозяевах.

Для того чтобы ввести в аминокислотную последовательность исходного антитела против hTfR такую мутацию, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, мутацию при необходимости можно вводить в кодирующий антитело против hTfR ген, содержащийся в выделенном фрагменте ДНК. Хотя кодирующий мутантное антитело против hTfR ген имеет гомологию с исходным геном предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, в отношении уровня гомологии нет особых ограничений. За счет введения в аминокислотную последовательность мутации для того, чтобы модифицировать количество или тип сахарных цепей, связанных с антителом против hTfR, также можно повысить стабильность антитела против hTfR в организме.

При введении мутации в ген, кодирующий всю или часть вариабельной области легкой цепи антитела против hTfR, мутированный таким образом ген имеет гомологию с исходным геном, которая предпочтительно составляет не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, хотя в отношении уровня гомологии нет особых ограничений. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи количество подлежащих делеции

аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно выполнять комбинированную мутацию этих замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот с вариабельной областью легкой цепи, их можно добавить внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, и количество добавленных аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно проводить комбинированную мутацию из этих добавления, замещения и делеции аминокислот. Таким образом мутированная аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной вариабельной области легкой цепи, которая предпочтительно составляет не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%. В частности, при замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности CDR другими аминокислотами количество замещенных аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности CDR количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно провести комбинированную мутацию этих замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот их можно добавить внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности, и количество добавленных аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно проводить комбинированную мутацию из этих добавления, замещения и делеции аминокислот. Аминокислотная последовательность соответствующей мутантной CDR имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной CDR, которая предпочтительно составляет не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90% и еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

При введении мутации в ген, кодирующий всю или часть вариабельной области тяжелой цепи антитела против hTfR, мутированный таким образом ген имеет гомологию с исходным геном, которая предпочтительно составляет не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, хотя нет особых ограничений в отношении уровня гомологии. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно проводить комбинированную мутацию этих замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот в вариабельную область тяжелой цепи, их можно добавить внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, и количество добавленных аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно проводить комбинированную мутацию из этих добавления, замещения и делеции аминокислот. Аминокислотная последовательность мутированной таким образом вариабельной области тяжелой цепи имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной вариабельной области тяжелой цепи, которая предпочтительно составляет не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%. В частности, при замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности CDR другими аминокислотами количество замещенных аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности CDR количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно выполнять комбинированную мутацию этих замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот их можно добавить внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности, и количество добавленных аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно проводить комбинированную мутацию из этих добавления, замещения и делеции аминокислот. Аминокислотная последовательность соответствующей мутантной CDR имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной CDR, которая предпочтительно составляет не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90% и еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Мутацию можно вводить в обе вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи антитела против hTfR путем комбинирования упомянутой выше мутации вариабельной области легкой цепи антитела против hTfR и упомянутой выше мутации вариабельной области тяжелой цепи антитела против hTfR.

Примеры упомянутого выше замещения одной или более аминокислот в аминокислотной последовательности легкой цепи и тяжелой цепи антитела против hTfR включают аминокислоты, классифицированные на одни и те же группы, такие как ароматические аминокислоты (Phe, Trp, Tyr), алифатические

аминокислоты (Ala, Leu, Ile, Val), полярные аминокислоты (Gln, Asn), основные аминокислоты (Lys, Arg, His), кислые аминокислоты (Glu, Asp), аминокислоты, имеющие гидроксигруппу (Ser, Thr). Ожидается, что замещение между такими аналогичными аминокислотами не приведет ни к какому изменению фенотипа белка (т.е. Это консервативное аминокислотное замещение). Однако аминокислотная последовательность каркасной области 3 (SEQ ID NO: 83) hTfR антитела № 3 (не опубликовано в момент подачи настоящей заявки), ранее обнаруженная автором настоящего изобретения и подтвержденная на наличие такого же типа эффекта как в настоящей заявке, имеет Trp в ее позиции 17. В отличие от этого каркасная область 3 тяжелой цепи антитела против hTfR № 3N настоящего изобретения имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, причем в позиции 17 с ее N-терминальной стороны замещена на Leu. Кроме того, в аминокислотной последовательности CDR1 Thr в позиции 5 SEQ ID NO: 12 замещена на Met, как показано в SEQ ID NO: 66. Trp и Leu не имеют упомянутой выше аналогичной взаимосвязи, и Thr и Met не имеют упомянутой выше аналогичной взаимосвязи. Тем не менее, как упоминается далее, антитело № 3N, содержащее замещение, неожиданно имеет такой же тип действия, как действие антитела № 3 и демонстрирует превосходные результаты.

Кроме того, в случае, когда мутацию вводят в антитело против hTfR путем добавления одной или более аминокислот в С-конец или N-конец, если антитело против hTfR и другой белок (А) сливают, помещая между ними добавленные аминокислоты, добавленные аминокислоты составляют часть линкера. Подробное объяснение про линкер, который находится между антителом против hTfR и белком (А) в белке слияния антитела против hTfR и белка (А), будет приведено далее.

Антитела против hTfR, полученные путем культивирования клеток, отобранных упомянутыми выше способами и тому подобное, в качестве вырабатывающих антитела против hTfR, которые имеют относительно высокую аффинность антител против hTfR к hTfR, и антитела против hTfR, полученные путем экспрессии гена, кодирующего высокоаффинное антитело против hTfR, можно модифицировать путем введения в их аминокислотные последовательности такие мутации, как замещение, делеция, добавление, для придания им требуемых свойств. Введение мутации в аминокислотную последовательность антитела против hTfR можно выполнить путем введения мутации в ген, соответствующий аминокислотной последовательности.

Аффинность антитела против hTfR к hTfR при необходимости можно регулировать путем введения в аминокислотную последовательность вариативной области антитела такой мутации, как замещение, делеция и добавление. Например, если антитело имеет такую высокую аффинность к своему антигену, которая приводит к слишком низкой константе диссоциации в воде, существует вероятность, что после введения в организм антитело не сможет диссоциировать от антигена, приводя таким образом к нарушению функции. В таком случае большинство предпочтительных антител, подходящих для данной цели, можно получить путем введения мутации в вариативную область антитела для того, чтобы пошагово регулировать ее константу диссоциации, чтобы в 2-5 раз, 5-10 раз, 10-100 раз и так далее увеличить константу диссоциации исходного антитела. Наоборот, константу диссоциации можно пошагово регулировать, чтобы путем введения мутации уменьшить константу диссоциации исходного антитела в 1/2-1/5 раз, 1/5-1/10 раз, 1/10-1/100 раз и так далее.

Введение такой мутации, как замещение, делеция и добавление в аминокислотную последовательность антитела против hTfR можно выполнять путем введения мутации в некоторые позиции нуклеотидной последовательности гена либо, например, посредством ПЦР и тому подобное, используя в качестве матрицы ген, кодирующий антитело против hTfR, либо посредством случайного введения мутации.

Введение мутации в аминокислотную последовательность антитела против hTfR для регулирования аффинности антитела против hTfR можно выполнять, например, путем встраивания гена, кодирующего антитело против hTfR в виде одноцепочечного антитела, в фагмиду, получая с помощью этой фагмиды фаг с экспрессируемым одноцепочечным антителом на поверхности его капсиды, обеспечивая мультимпликацию фага, вводя в то же время мутацию в кодирующий одноцепочечное антитело ген за счет применения мутагена и тому подобное, и отбирая из мультиплицированных фагов фаг, экспрессирующий одноцепочечное антитело, имеющее требуемую константу диссоциации, либо посредством описанного выше способа или либо посредством очистки, используя колонку с антигеном в определенных условиях.

Обладающими относительно высокой аффинностью к hTfR антителами, полученными упомянутым выше способом селекции клеток, вырабатывающих высокоаффинные антитела, являются антитела, константа диссоциации (K_D) которых с hTfR при измерении описанным в примере 7 способом предпочтительно составляет не более чем 1×10^{-8} М, более предпочтительно не более чем 1×10^{-9} М, еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-10} М и еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-11} М. Например, предпочтительными являются антитела, имеющие константу диссоциации от 1×10^{-13} М до 1×10^{-9} М или от 1×10^{-13} М до 1×10^{-10} М. То же самое также применимо, если антителами являются одноцепочечные антитела. После получения антител их можно при необходимости модифицировать, например, путем введения мутации для придания им требуемого свойства.

Обладающие аффинностью к TfR как человека, так и обезьяны антитела можно получить путем селекции обладающих аффинностью к TfR обезьяны антител из антител против hTfR, которые были полу-

чены, как описано выше. Селекцию обладающих аффинностью к TfR обезьяны антител можно выполнять, например, посредством ELISA, используя рекомбинантный TfR обезьяны, который получают, используя методики рекомбинантной ДНК. В таком ELISA рекомбинантный TfR обезьяны добавляют на планшет и содержат на нем, и вводят в контакт с антителами против hTfR, а после удаления с планшета антител, не связанных с рекомбинантным TfR обезьяны, измеряют количество антител, содержащихся на планшете. Чем выше аффинность антител к рекомбинантному hTfR обезьяны, тем следовательно больше становится количество антител, содержащихся на планшете. Следовательно, антитела, соответствующие планшету, на котором содержится большее количество антител, можно отобрать в качестве обладающих аффинностью к TfR обезьяны антител. В данном случае термин "обезьяна" предпочтительно классифицируют, как обезьяны за исключением человека, более предпочтительно как мартышковые, еще более предпочтительно как макаки, и, например, обезьяна-крабод или обезьяна резус, среди которых обезьяна-крабод является удобной для использования в исследовании.

Антитела, обладающие аффинностью как к hTfR человека, так и обезьяны, предоставляют преимущество в том, что они обеспечивают фармакокинетические наблюдения за антителами, вводимыми в организм с использованием обезьяны. Например, при разработке лекарственного препарата с использованием таких антител против hTfR согласно настоящему изобретению можно заметно ускорить ход его разработки, так как его фармакокинетическое изучение можно выполнять, используя обезьяну.

Согласно настоящему изобретению антитела, обладающие относительно высокой аффинностью к hTfR, а также, обладающие аффинностью к TfR обезьяны, демонстрируют следующую константу диссоциации с TfR человека и обезьяны, в частности при измерении описанным в примере 7 способом:

(а) константу диссоциации с hTfR: предпочтительно не более чем 1×10^{-10} M, более предпочтительно не более чем $2,5 \times 10^{-11}$ M, еще более предпочтительно не более чем 5×10^{-12} M и еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-12} M, и

(b) константу диссоциации с TfR обезьяны: предпочтительно не более чем 1×10^{-9} M, более предпочтительно не более чем 5×10^{-10} M и еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-10} M, например, не более чем $7,5 \times 10^{-11}$ M.

Например, константы диссоциации с hTfR и TfR обезьяны составляют не более чем 1×10^{-10} M и не более чем 1×10^{-9} M, не более чем 1×10^{-11} M и не более чем 5×10^{-10} M, не более чем 5×10^{-12} M и не более чем 1×10^{-10} M, не более чем 5×10^{-12} M и не более чем $7,5 \times 10^{-11}$ M, не более чем 1×10^{-12} M и не более чем 1×10^{-10} M или не более чем 1×10^{-12} M и не более чем $7,5 \times 10^{-11}$ M, соответственно. В этом контексте, хотя нет особенно четкого нижнего предела константы диссоциации с TfR человека, он может составлять, например, 5×10^{-13} M или 1×10^{-13} M. Хотя нет особенно четкого нижнего предела константы диссоциации с TfR обезьяны, он может составлять, например, 1×10^{-11} M или 1×10^{-12} M. То же самое также применимо, если антителом является одноцепочечное антитело.

Если антителами, обладающими относительно высокой аффинностью к hTfR и полученными упомянутым выше способом, в котором отбирали те клетки, которые вырабатывают высокоаффинные антитела, являются антитела нечеловекообразных животных, их можно преобразовать в гуманизированные антитела.

Гуманизированным антителом является антитело, полученное за счет использования аминокислотной последовательности части варибельной области (например, всех или части CDR) антитела нечеловекообразного животного, и замены подлежащей области человеческого антитела последовательностью (которую имплантируют в человеческое антитело), сохраняя в то же время специфичность к антигену. Примеры гуманизированного антитела включают антитело, полученное путем замены трех определяющих комплементарность областей (CDR) в легкой цепи иммуноглобулина и трех определяющих комплементарность областей (CDR) в тяжелой цепи иммуноглобулина, причем обе составляют человеческое антитело, на CDR нечеловекообразного млекопитающего. Хотя нет особых ограничений в отношении биологических видов, из которых получают CDR, подлежащие встраиванию в человеческое антитело, при условии, что это нечеловекообразное млекопитающее, им предпочтительно является мышь, крыса, кролик, лошадь и нечеловекообразный примат, более предпочтительно мышь и крыса, и еще более предпочтительно мышь. Однако это может быть антитело, в котором часть человеческого антитела заменена частью другого человеческого антитела.

Способы получения гуманизированного антитела хорошо известны в данной области, и наиболее часто это способ, в котором аминокислотную последовательность определяющих комплементарность областей (CDR) в варибельной области человеческого антитела заменяют на CDR антитела нечеловекообразного млекопитающего, который разработан Winter et al. (Verhoeven M. Science. 239. 1534-1536 (1988)). Также хорошо известно, что в некоторых случаях соответствующая часть акцепторного человеческого антитела подлежит замене не только на CDR антитела нечеловекообразного млекопитающего, но также на аминокислотные последовательности, находящиеся в областях за пределами CDR, которые играют некоторую роль либо для сохранения структуры CDR, либо для связывания с антигеном, для того, чтобы воспроизводить активность, которой изначально обладает донорное антитело (Queen C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86. 10029-10033 (1989)). В данном случае области за пределами CDR называются каркас-

ные (FR) области.

Вариабельные области как тяжелой цепи, так и легкой цепи антитела содержат четыре каркасные области 1-4 (FR1-FR4). FR1 представляет собой область рядом с CDR1 на ее N-терминальной стороне и состоит из аминокислотной последовательности от N-конца в каждом пептиде, составляющем тяжелую цепь и легкую цепь, до аминокислоты рядом с N-концом ее CDR1. FR2 состоит из аминокислотной последовательности между CDR1 и CDR2 в каждом пептиде, составляющем тяжелую цепь и легкую цепь. FR3 состоит из аминокислотной последовательности между CDR2 и CDR3 в каждом пептиде, составляющем тяжелую цепь и легкую цепь. FR4 состоит из аминокислотной последовательности от аминокислоты рядом с С-концом CDR3 до С-конца вариабельной области. Однако согласно настоящему изобретению, которое этим не ограничено, в качестве каркасной области можно использовать область, включающую 1-5 аминокислоты N-терминальной стороны и/или 1-5 аминокислоты С-терминальной стороны в каждой упомянутой выше FR области.

Получение гуманизированного антитела включает способы имплантации CDR (и по обстоятельствам их соседних FR) антитела нечеловекообразного млекопитающего вместо CDR (и по обстоятельствам их соседних FR) в вариабельной области человеческого антитела. В таких способах начальную каркасную область вариабельной области человеческого антитела можно получить из общедоступной базы данных ДНК и тому подобное, которая содержит гены антител зародышевых линий. Например, последовательности ДНК зародышевых линий, а также аминокислотные последовательности вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи человека можно выбрать из базы данных зародышевых линий человека "VBase" (доступной в интернете на www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase). Кроме того, их можно выбрать из опубликованных ДНК последовательностей и аминокислотных последовательностей, описанных в литературе, таких как "Kabat E.A. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication № 91-3242 (1991)"; "Tomlinson I.M. J. Mol. Biol. 227. 776-98 (1992)"; и "Cox JPL. Eur. J Immunol. 24:827-836 (1994)".

Как упоминалось выше, в гуманизированном антителе области антитела нечеловекообразного млекопитающего животного, подлежащие имплантации в вариабельные области исходного человеческого антитела, обычно включают сами CDR или CDR и их соседнюю часть FR. Однако такие FR, имплантируемые вместе с CDR, также играют некоторую роль либо для сохранения структуры CDR, либо для связывания с антигеном, имея таким образом существенную функцию при определении комплементарности антитела, и термин "CDR" согласно настоящему изобретению, следовательно, относится к таким областям, которые при получении гуманизированного антитела взяты или могут быть взяты из антитела нечеловекообразного млекопитающего животного и имплантированы в гуманизированное антитело. Таким образом, область, обычно считающаяся областью FR, согласно настоящему изобретению включена в CDR, поскольку она принимает участие либо в сохранении структуры CDR, либо в связывании с антигеном, и таким образом считается, что она имеет существенную функцию при определении комплементарности антигена.

Антитело против hTfR согласно настоящему изобретению при введении в организм, например, посредством внутривенной инъекции эффективно связывается с hTfR, находящимся на эндотелиальных клетках капилляров в головном мозге. Антитела, связанные с hTfR, попадают в головной мозг через гематоэнцефалический барьер с помощью таких механизмов, как эндоцитоз и транцитоз. Следовательно, за счет их связывания с антителом против hTfR согласно настоящему изобретению, те белки, низкомолекулярные соединения и тому подобное, которые должны быть задействованы в головном мозге, можно эффективно доставлять в головной мозг через гематоэнцефалический барьер. Кроме того, антитела против hTfR согласно настоящему изобретению после прохождения через гематоэнцефалический барьер могут достигать паренхимы головного мозга и нервоподобных клеток в гиппокампе; клеток Пуркинье и тому подобное мозжечка или по меньшей мере одну из них. И также ожидается, что они достигают нервоподобных клеток в полосатом теле большого мозга; и нервоподобных клеток в черном веществе среднего мозга. Следовательно, можно сделать так, чтобы один из этих белков, низкомолекулярных соединений и тому подобное, которые могут воздействовать на такие ткани или клетки, достигал тканей или клеток посредством его связывания с антителом против hTfR согласно настоящему изобретению.

Антитело против hTfR согласно настоящему изобретению может быть эффективным средством для обеспечения переноса этих соединений (белков, низкомолекулярных соединений и тому подобное) из крови в головной мозг и функционирования там, причем в противном случае эти соединения не могут проходить через гематоэнцефалический барьер при внутривенном введении и, следовательно, не могут или вряд ли могут проявлять свои физиологические или фармакологические функции в головном мозге. В частности, антитела против hTfR согласно настоящему изобретению после прохождения через гематоэнцефалический барьер могут достигать паренхимы головного мозга и нервоподобных клеток в гиппокампе; клеток Пуркинье и тому подобное мозжечка или по меньшей мере одной из них. И также ожидается, что они достигают нервоподобных клеток в полосатом теле большого мозга; а также нервоподобных клеток в черном веществе среднего мозга. Следовательно, можно сделать так, чтобы эти соединения функционировали или усиливали свою функцию в этих тканях или клетках в головном мозге за счет введения этих соединений в комбинированном виде с молекулами антител против hTfR, парентерально, на-

пример, внутривенно.

Для связывания антител против hTfR с такими соединениями (белками, низкомолекулярными соединениями и тому подобное) доступен способ связывания их вместе посредством непептидного линкера или пептидного линкера. В качестве непептидных линкеров можно использовать полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированный полиол, поливиниловый спирт, полисахариды, декстран, поливиниловый эфир, биоразлагаемый полимер, полимеризованный липид, хитины и гиалуроновую кислоту или их производные, или их комбинации. Пептидным линкером является пептидная цепь, состоящая из 1-50 аминокислот, связанных пептидными связями, или ее производное, N-конец и С-конец которого должны быть ковалентно связаны либо с антителом против hTfR, либо с таким соединением, как белок, низкомолекулярное соединение и тому подобное, соответственно, для связывания антитела против hTfR с таким соединением наподобие белка, низкомолекулярным соединением.

В частности, конъюгат, который образуют посредством связывания антитела против hTfR согласно настоящему изобретению с требуемым другим белком (А) посредством PEG в качестве непептидного линкера, обозначают "антитело против hTfR-PEG-белок". Антитело против hTfR-PEG-белок можно получить путем сперва связывания антитела против hTfR с PEG с образованием антитела против hTfR-PEG, а затем связывания антитела против hTfR-PEG с другим белком (А). Альтернативно, антитело против hTfR-PEG-белок можно получить путем сперва связывания другого белка (А) с PEG с образованием "белок-PEG", а затем связывания "белок-PEG" с антителом против hTfR. Для того чтобы связать PEG с антителом против hTfR и другим белком (А), используют PEG, который модифицируют такими функциональными группами, как карбонат, карбонилимидазол, активный сложный эфир карбоновой кислоты, азлактон, циклический имидтион, изоцианат, изотиоцианат, имидат, альдегид и тому подобное. Такая функциональная группа, введенная в PEG, вступает в реакцию главным образом с аминогруппами в антителе против hTfR и другим белком (А) для ковалентного связывания PEG с антителом против hTfR и другим белком (А). Хотя нет особых ограничений в отношении молекулярной массы и конфигурации используемого в данном случае PEG, его средняя молекулярная масса (MW) следующая: предпочтительно MW=500-60000, более предпочтительно MW=500-20000. Например, такой PEG, средняя молекулярная масса которого составляет приблизительно 300, приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 4 000, приблизительно 10000, приблизительно 20000 и тому подобное. PEG предпочтительно используют в качестве непептидного линкера. Антитело против hTfR можно связать с требуемым низкомолекулярным соединением таким же образом, как описано выше.

Например, "антитело против hTfR-PEG" можно получить путем смешивания антитела против hTfR с полиэтиленгликолем, имеющим в качестве функциональных групп альдегидные группы (ALD-PEG-ALD), таким образом, чтобы молярное отношение ALD-PEG-ALD с антителом составляло 11, 12,5, 15, 110, 120 и тому подобное, а затем добавления в смесь восстанавливающего средства, такого как NaCNBH₃, чтобы обеспечить прохождение реакции. Затем за счет проведения реакции "антитело против hTfR-PEG" с другим белком (А) в присутствии восстанавливающего средства, такого как NaCNBH₃, получают "антитело против hTfR-PEG-белок". Напротив, также можно получить "антитело против hTfR-PEG-белок" посредством сперва связывания другого белка (А) с ALD-PEG-ALD для получения "белок-PEG", а затем связывания "белок-PEG" с антителом против hTfR.

Антитело против hTfR и другой белок (А) также можно связать вместе через пептидные связи посредством связывания тяжелой цепи или легкой цепи антитела против hTfR на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне либо посредством линкерной последовательности, либо непосредственно с N-концом или С-концом другого белка (А), соответственно. Таким образом, слитый белок между антителом против hTfR и другим белком (А) можно получить путем встраивания в вектор экспрессии млекопитающего фрагмента ДНК, в котором кДНК, кодирующая другой белок (А), расположена прямо в каркасе или посредством фрагмента ДНК, кодирующего линкерную последовательность, на 3'-концевой или 5'-концевой стороне кДНК, кодирующей тяжелую цепь или легкую цепь антитела против hTfR, и культивирования клеток млекопитающих, в которые был введен упомянутый выше вектор экспрессии. При связывании фрагмента ДНК, кодирующего другой белок (А), с тяжелой цепью, вектор экспрессии млекопитающих, в котором фрагмент кДНК кодирует легкую цепь антитела против hTfR, также вводят в те же клетки-хозяева, тогда как, если фрагмент ДНК, кодирующий другой белок (А), связывают с легкой цепью, вектор экспрессии млекопитающих, в котором фрагмент кДНК кодирует тяжелую цепь антитела против hTfR, также встраивают в те же клетки-хозяева. В случае, когда антителом против hTfR является одноцепочечное антитело, комбинированный слитый белок, содержащий антитело против hTfR и другой белок (А), можно получить путем встраивания в вектор экспрессии (для эукариотических клеток, например, млекопитающих и дрожжей, или для прокариотических клеток, таких как E.coli.), фрагмента ДНК, который образован за счет связывания кДНК, кодирующей другой белок (А), на ее 5'-концевой стороне или на ее 3'-концевой стороне, непосредственно или посредством фрагмента ДНК, кодирующего линкерную последовательность, с кДНК, кодирующей одноцепочечное антитело против hTfR, и обеспечения экспрессии белка слияния в тех клетках, в которые вектор экспрессии был введен.

В белке слияния, относящемся к типу, в котором другой белок (А) связан с легкой цепью антитела

против hTfR на его С-терминальной стороне, антитело против рецептора трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть вариабельной области легкой цепи, и аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть вариабельной области тяжелой цепи, а другой белок (А) связан с легкой цепью этого антитела против рецептора трансферрина человека на его С-терминальной стороне. В данном случае легкую цепь антитела против hTfR и другой белок (А) можно связать вместе непосредственно или через линкер.

В белке слияния, относящемся к типу, в котором другой белок (А) связан с тяжелой цепью антитела против hTfR на его С-терминальной стороне, антитело против рецептора трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть вариабельной области легкой цепи, и аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть вариабельной области тяжелой цепи, а другой белок (А) связан с тяжелой цепью этого антитела против рецептора трансферрина человека на его С-терминальной стороне. В данном случае тяжелую цепь антитела против hTfR и другой белок (А) можно связать вместе непосредственно или через линкер.

В белке слияния, относящемся к типу, в котором другой белок (А) связан с легкой цепью антитела против hTfR на ее N-терминальной стороне, антитело против рецептора трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть вариабельной области легкой цепи, и аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть вариабельной области тяжелой цепи, а другой белок (А) связан с легкой цепью этого антитела против рецептора трансферрина человека на ее N-терминальной стороне. В данном случае легкую цепь антитела против hTfR и другой белок (А) можно связать вместе непосредственно или через линкер.

В белке слияния, относящемся к типу, в котором другой белок (А) связан с тяжелой цепью антитела против hTfR на ее N-терминальной стороне, антитело против рецептора трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть вариабельной области легкой цепи, и аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть вариабельной области тяжелой цепи, а другой белок (А) связан с тяжелой цепью этого антитела против рецептора трансферрина человека на ее N-терминальной стороне. В данном случае тяжелую цепь антитела против hTfR и другой белок (А) можно связать вместе непосредственно или через линкер.

В сказанном выше линкерной последовательностью, помещенной между антителом против hTfR и другим белком (А), может быть пептидная цепь, состоящая предпочтительно из 1-50, более предпочтительно из 1-17, еще более предпочтительно из 1-10, еще более предпочтительно из 1-5 аминокислот, и в соответствии с другим белком (А), который нужно связать с антителом против hTfR, количество аминокислот линкерной последовательности при необходимости можно регулировать до 1, 2, 3, 1-17, 1-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29, 27 и т.д. Хотя нет особых ограничений относительно аминокислотной последовательности линкерной последовательности, поскольку связанное с ее помощью антитело против hTfR сохраняет аффинность к hTfR, а другой белок (А), связанный линкерной последовательностью, также демонстрирует собственную физиологическую активность белка в физиологических условиях, линкер может предпочтительно состоять из глицина и серина. Примеры таких линкеров включают линкер, состоящий из одной аминокислоты, либо глицина, либо серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотной последовательности Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательности, которая содержит 1-10 или 2-5 любых этих последовательно связанных аминокислотных последовательностей. Они имеют последовательности, состоящие из 1-50, 2-17, 2-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29 или 27 аминокислот. Например, в качестве линкерных последовательностей можно предпочтительно использовать линкеры, содержащие аминокислотную последовательность Gly-Ser. Кроме того, предпочтительно используют содержащую 27 аминокислот линкерную последовательность, которая состоит из аминокислотной последовательности Gly-Ser, за которой следуют последовательно связанные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3). Более того, также предпочтительно используют линкерную последовательность, содержащую 25 аминокислот, которая состоит из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

В белке слияния из антитела против hTfR и другого белка (А), когда антителом против hTfR является одноцепочечное антитело, аминокислотная последовательность, содержащая всю или часть вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина, и аминокислотная последовательность, содержащая всю или часть вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина, связаны, обычно посредством линкерной последовательности. Поскольку аффинность антитела против hTfR к hTfR сохраняется, аминокислотную последовательность, полученную из легкой цепи, можно связать на ее С-терминальной стороне с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, на ее С-терминальной стороне связана с аминокислотной последовательностью, полученной из тяжелой цепи, или, наоборот, аминокислотную последовательность, полученную из тяжелой цепи, можно связать на ее С-терминальной стороне с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, на ее С-терминальной стороне связана с аминокислотной последовательностью, полученной из легкой цепи.

Линкерной последовательностью, помещенной между легкой цепью и тяжелой цепью иммуногло-

булина, является пептидная цепь, состоящая предпочтительно из 2-50, более предпочтительно 8-50, еще более предпочтительно 10-30, еще более предпочтительно 12-18 или 15-25, и например 15 или 25 аминокислот. Хотя не существует конкретного ограничения в отношении линкерной последовательности, поскольку антитело против hTfR, полученное из обеих цепей, которые связаны через линкер, сохраняет аффинность к hTfR, а другой белок (А), связанный с антителом, также демонстрирует собственную физиологическую активность белка в физиологических условиях, линкер предпочтительно состоит из глицина, или глицина и серина. Примеры таких линкеров включают аминокислотную последовательность Gly-Ser, аминокислотную последовательность Gly-Gly-Ser, аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly, аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотную последовательность Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательность, которая содержит 2-10 или 2-5 любых этих последовательно связанных аминокислотных последовательностей. Предпочтительный вариант осуществления такой линкерной последовательности включает 15 аминокислот, состоящих из последовательно связанных трех копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

В случае, когда антителом против hTfR является одноцепочечное антитело, примером конкретных вариантов осуществления белка слияния между гуманизированными антителами против hTfR согласно настоящему изобретению и другим белком (А) является слитый белок, состоящий из другого белка (А), который связан на его С-терминальной стороне и посредством первой состоящей из 27 аминокислот линкерной последовательности, состоящих из аминокислотной последовательности Gly-Ser, за которой следуют последовательно связанные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), с одноцепочечным антителом. Примером предпочтительного варианта осуществления одноцепочечных антител в данном случае является антитело, имеющее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, которая состоит из аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи антитела против hTfR № 3N, показанной как SEQ ID NO: 65, которая связана на ее С-конце и посредством первой линкерной последовательности, состоящей из 15 аминокислот, состоящих из последовательно связанных трех копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), с варибельной областью легкой цепи антитела против hTfR, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, антитело, имеющее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, которая состоит из аминокислотной последовательности тяжелой цепи Fab-антитела против hTfR № 3N, показанной как SEQ ID NO: 61, которая связана на ее С-конце и посредством линкерной последовательности состоящей из 32 аминокислот, состоящей из последовательно связанных шести копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, за которой следует аминокислотная последовательность Gly-Gly, с варибельной областью легкой цепи антитела против hTfR, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

Когда антителом против hTfR является одноцепочечное антитело, такой слитый белок можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, а затем культивирования клеток-хозяев.

Кроме того, согласно настоящему изобретению, когда пептидная цепь содержит множество линкерных последовательностей, каждую из этих линкерных последовательностей для удобства обозначают с N-терминальной стороны первая линкерная последовательность, вторая линкерная последовательность и так далее.

В случае, когда антителом против hTfR является Fab, примером конкретных вариантов осуществления белка слияния между гуманизированными антителами против hTfR и другим белком (А) согласно настоящему изобретению является слитый белок, который состоит из другого белка (А), который сливают на его С-терминальной стороне и посредством состоящей из 27 аминокислот линкерной последовательности, состоящих из Gly-Ser, за которой следуют последовательно связанные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), с областью, имеющей варибельную область тяжелой цепи антитела против hTfR, и C_H1 областью. Хотя в данном случае в дополнение к C_H1 области можно включить часть шарнирной области, шарнирная область не содержит цистеинового остатка, который образовал бы дисульфидную связь между тяжелыми цепями.

В случае, когда антителом против hTfR является Fab, примером предпочтительной тяжелой цепи является цепь, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. Аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61, является Fab тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3N, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и соответствует участку в позициях 1-226 с N-терминальной стороны аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66. Кроме того, участок в позициях 1-118 от N-конца SEQ ID NO: 61 соответствует варибельной области (SEQ ID NO: 65), участок в позициях 119-216 соответствует C_H1 области, а участок в позициях 217-226 соответствует шарнирной области.

В случае, когда антителом против hTfR является Fab, в слитый белок можно дополнительно ввести Fc-область другого IgG. За счет введения Fc-области в слитый белок можно улучшить стабильность белка слияния в организме, например, в крови. Таким белком слияния с введенной в него Fc-областью явля-

ется, например, белок, в котором Fc-область IgG человека связана прямо или посредством линкерной последовательности с другим белком (А) на ее С-терминальной стороне, а тяжелая цепь Fab-антитела против рецептора трансферрина человека связана прямо или посредством линкерной последовательности с Fc-областью IgG человека на ее С-терминальной стороне.

Линкерная последовательность между другим белком (А) и Fc-областью IgG человека предпочтительно состоит из 1-50 аминокислот. В этом контексте количество аминокислот при необходимости регулируют до 1-17, 1-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29, 27 и т.д. Хотя нет особых ограничений относительно аминокислотной последовательности линкерной последовательности, линкер может предпочтительно состоять из глицина и серина. Примеры таких линкеров включают линкер, состоящий из одной аминокислоты, либо глицина, либо серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотной последовательности Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательности, которая имеет 1-10 или 2-5 любых этих последовательно связанных аминокислотных последовательностей, и включает последовательность, состоящую из не более чем 50 аминокислот, или последовательность, состоящую из 2-17, 2-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29 или 25 аминокислот. Например, предпочтительно используют линкерную последовательность, содержащую 25 аминокислот, которая состоит из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3). То же самое также применимо для линкерной последовательности между Fc-областью IgG человека и тяжелой цепью Fab.

Кроме того, при введении Fc-области IgG человека, Fc-область IgG человека можно связать либо с тяжелой цепью, либо с легкой цепью антитела против рецептора трансферрина человека. Кроме того, антителами могут быть другие антигенсвязывающие фрагменты, включая F(ab')₂, F(ab') и одноцепочечное антитело.

Нет особых ограничений в отношении типа IgG Fc-области IgG человека, подлежащего введению, и это может быть любой из IgG1-IgG5. Кроме того, Fc-областью IgG человека, подлежащей введению, может быть целая Fc-область или может быть ее часть. Предпочтительным вариантом осуществления такой Fc-области IgG человека является Fc-область, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, которая представляет собой целую область Fc IgG1 человека. Кроме того, аминокислотной последовательностью тяжелой цепи Fab с добавленной к ней Fc-областью IgG человека является аминокислотная последовательность, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, в которой Fc-область IgG человека, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, связана посредством линкерной последовательности, содержащей 25 аминокислот, которая состоит из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), с N-терминальной стороной аминокислотной последовательности тяжелой цепи Fab (SEQ ID NO: 61) гуманизированного антитела против hTfR 3N.

Слитый белок между антителом против hTfR и другим белком (А) можно модифицировать таким образом, чтобы он имел аффинность к альбумину. Аффинности к альбумину можно добиться посредством связывания с белком слияния соединения, пептида, белка и тому подобное, имеющего аффинность к альбумину. Слитый белок, которому ввели аффинность к альбумину, по меньшей мере частично связан с альбумином и циркулирует в крови. Альбумин имеет функцию стабилизации связанного с ним белка. Следовательно, за счет введения аффинности к альбумину можно продлить период полураспада в крови белка слияния, вводимого в живой организм, таким образом, чтобы можно было усилить фармакологический эффект белка слияния. Введение аффинности к альбумину более эффективно, когда антителом против hTfR является антитело с недостатком Fc-области, участвующей в стабильности антитела, например, Fab.

Введение аффинности к альбумину также является эффективным, когда слитый белок между антителом против hTfR и другим белком (А) показывает иммуногенность при введении в живой организм. Поскольку слитый белок связан с альбумином, предотвращается презентация участка белка слияния, который проявляет иммуногенность, иммунным клеткам, так что иммуногенность снижается.

При введении в слитый белок аффинности к альбумину между антителом против hTfR и другим белком (А), областью, в которую вводят аффинность, может быть любая область легкой цепи антитела против hTfR, тяжелой цепи антитела против hTfR, другого белка (А) и линкерной области, или аффинность можно вводить в две или более этих областей.

В качестве пептидов или белков, имеющих аффинность к альбумину, среди других можно использовать, например, пептиды, в которых связывающий альбумин домен белка, полученный из *Streptococcus strain G418* (Alm T. Biotechnol J. 5. 605-17 (2010)), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, модифицируют таким образом, чтобы он имел щелочеустойчивость. Для связывания вместе пептида или белка, имеющего аффинность к альбумину (аффинный к альбумину пептид), и белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (А) (слитый белок антитела против hTfR-белок (А)), имеется способ связать их вместе посредством непептидного линкера или пептидного линкера. В качестве непептидных линкеров можно использовать полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксипропиленгликоль, полиоксипропиленгликоль, поливинилпирролидон, поливинилпирролидон, полисахари-

ды, декстран, поливиниловый эфир, биоразлагаемый полимер, липидный полимер, хитины и гиалуроновую кислоту или их производные, или их комбинации. Пептидным линкером является пептидная цепь, состоящая из 1-50 аминокислот, связанных пептидными связями или их производными, N-конец и C-конец которой ковалентно связаны либо с аффинным к альбумину пептидом, либо с белком слияния, соответственно, для связывания вместе аффинного к альбумину пептида и белка слияния.

В частности, конъюгат, который образуется за счет связывания аффинного к альбумину пептида с белком слияния между антителом против hTfR и другим белком (А) посредством PEG в качестве непептидного линкера, обозначают "слитый белок аффинный к альбумину пептид-PEG-белок (А)". Аффинный к альбумину пептид-слитый белок антитело против hTfR-белок (А) можно получить путем связывания аффинного к альбумину пептида с PEG с образованием аффинный к альбумину пептид-PEG, а затем связывания аффинный к альбумину пептид-PEG с белком слияния антитело против hTfR-белок (А). Альтернативно, аффинный к альбумину пептид-слитый белок антитело против hTfR-белок (А) можно получить путем связывания белка слияния антитело против hTfR-белок (А) с PEG с образованием слитый белок антитело против hTfR-белок (А), а затем связывания белка слияния антитело против hTfR-белок (А) - PEG с аффинным к альбумину пептидом. Для того, чтобы связать PEG с аффинным к альбумину пептидом и белком слияния антитело против hTfR-белок (А), используют PEG, который модифицируют такими функциональными группами, как карбонат, карбонилимидазол, активный сложный эфир карбоновой кислоты, азлактон, циклический имидтион, изоцианат, изотиоцианат, имидат, альдегид и тому подобное. Такая функциональная группа, введенная в PEG, вступает в реакцию главным образом с аминогруппами в молекулах аффинного к альбумину пептида и белка слияния антитело против hTfR-белок (А) с ковалентным связыванием PEG с аффинным к альбумину пептидом и белком слияния антитело против hTfR-белок (А). Хотя нет особых ограничений в отношении молекулярной массы и конфигурации используемого в данном случае PEG, его средняя молекулярная масса (MW) следующая: предпочтительно MW=500-60000, более предпочтительно MW=500-20000. Например, такой PEG, средняя молекулярная масса которого составляет приблизительно 300, приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 4000, приблизительно 10000, приблизительно 20000 и тому подобное. В качестве непептидного линкера предпочтительно используют PEG.

Например, аффинный к альбумину пептид-PEG можно получить путем смешивания аффинного к альбумину пептида с альдегидная группа-модифицированный PEG (ALD-PEG-ALD) таким образом, чтобы молярное отношение модифицированного PEG к аффинному к альбумину пептиду составляло 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20 и тому подобное, а затем добавления в смесь восстанавливающего средства, такого как NaCNBH₃, чтобы обеспечить прохождение реакции. Затем за счет проведения реакции аффинный к альбумину пептид-PEG с белком слияния антитело против hTfR-белок (А) в присутствии восстанавливающего средства, такого как NaCNBH₃, получают аффинный к альбумину пептид-PEG-слитый белок антитело против hTfR-белок (А). Напротив, также можно получить аффинный к альбумину пептид-PEG-слитый белок антитело против hTfR-белок (А) сперва посредством связывания белка слияния антитело против hTfR-белок (А) с ALD-PEG-ALD для получения слитый белок антитело против hTfR-белок (А)-PEG, а затем связывания слитый белок-PEG с аффинным к альбумину пептидом.

Также можно слить слитый белок антитела против hTfR-белок (А) с аффинным к альбумину пептидом. Слитый белок (слитый белок антитело против hTfR-белок (А)-аффинный к альбумину пептид) можно получить путем встраивания в вектор экспрессии млекопитающего сегмента ДНК, в котором кДНК, кодирующая аффинный к альбумину пептид, помещена прямо в каркас или посредством сегмента ДНК, кодирующего линкерную последовательность на 3'-концевой или 5'-концевой стороне кДНК, кодирующей тяжелую цепь (включая слитый белок между тяжелой цепью и белком (А)) или легкую цепь (включая слитый белок между легкой цепью и белком (А)) белка слияния антитело против hTfR-белок (А), и культивирования клеток млекопитающих, в которые введен вектор экспрессии. Когда фрагмент ДНК, кодирующий аффинный к альбумину пептид, связывают с тяжелой цепью (или белком слияния между тяжелой цепью и белком (А)), в те же клетки-хозяева также вводят вектор экспрессии млекопитающих, в который был встроены сегмент кДНК, кодирующий слитый белок между легкой цепью, составляющей антитело против hTfR и белком (А) (или легкую цепь), тогда как, когда сегмент ДНК, кодирующий аффинный к альбумину пептид, связывают с легкой цепью (или белком слияния между легкой цепью и белком (А)), в те же клетки-хозяева также вводят вектор экспрессии млекопитающих, в который был встроены сегмент кДНК, кодирующий слитый белок между тяжелой цепью антитела против hTfR и белком (А) (или тяжелую цепь). То есть аффинный к альбумину пептид можно связать либо на N-терминальной, либо C-терминальной стороне тяжелой цепи (включая слитый белок между тяжелой цепью и белком (А)) или легкой цепи (включая слитый белок между легкой цепью и белком (А)) белка слияния антитело против hTfR-белок (А), но когда белок (А) связывают с тяжелой цепью антитела против hTfR на N-терминальной стороне, аффинный к альбумину пептид предпочтительно связать на C-терминальной стороне антитела против hTfR, и особенно предпочтительно связать аффинный к альбумину пептид на C-терминальной стороне тяжелой цепи.

Слитый белок антитело против hTfR-белок (А) можно слить с аффинным к альбумину пептидом непосредственно или посредством линкерной последовательности. В данном случае линкерная последо-

вательность предпочтительно состоит из 1-50 аминокислот. В данном случае количество аминокислот при необходимости регулируют до 1-17, 1-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29, 27 и т.д. Хотя нет ограничения относительно аминокислотной последовательности линкерной последовательности, линкерная последовательность предпочтительно состоит из глицина и серина. Примеры линкеров включают линкеры, имеющие последовательности, состоящие из 1-50, 2-17, 2-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29 или 25 аминокислот, причем линкер состоит из одной из аминокислот: глицина и серина, аминокислотной последовательности: Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотной последовательности Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательности, которая содержит 1-10 или 2-5 любых этих последовательно связанных аминокислотных последовательностей. Например, можно предпочтительно использовать содержащую в общей сложности 15 аминокислот линкерную последовательность, которая состоит из трех последовательно связанных копий аминокислотной последовательности: Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

Аффинность связывания с альбумином белка слияния антитело против hTfR-белок (A), в который был введен аффинный к альбумину пептид, предпочтительно составляет не более чем 1×10^{-7} М, более предпочтительно не более чем 5×10^{-7} М, еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-8} М, еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-9} М при измерении с помощью интерферометрии биослоя, как описано в примере 7.

Fab-антитело можно стабилизировать в крови даже посредством способа, не связанного с введением Fc-области или аффинного к альбумину пептида. Например, Fab-антитело можно стабилизировать посредством PEG-модификации самого Fab-антитела или слияния между Fab-антителом и другим белком. Такой способ обычно выполняют в области белковых фармацевтических препаратов, и пегилированный эритропоэтин, интерферон и т.д. вошли в практическое применение в виде фармацевтических продуктов. Fab-антитело также можно стабилизировать путем введения мутации в Fab-антитело. Например, Fab-антитело можно стабилизировать путем замены метионина лейцином в позиции 4 с N-терминальной стороны легкой цепи. Однако способ введения мутации этим не ограничен, и мутацию можно вводить в тяжелую цепь. Кроме того, способ стабилизации Fab-антитела не ограничен описанными выше способами, и можно использовать все хорошо известные способы.

Хотя нет особых ограничений в отношении другого белка (A), который нужно связать с антителом против hTfR, этот белок, который может проявлять свою физиологическую активность в организме, и в частности, такой белок, который должен проникать внутрь головного мозга и проявлять там свою функцию, но вследствие своей неспособности проходить через гематоэнцефалический барьер в таких условиях, нельзя ожидать его функционирования в головном мозге просто при внутривенном введении. Примеры таких белков включают лизосомальные ферменты, такие как фактор роста нервов (NGF), α -L-идуронидазу (IDUA), идуронат-2-сульфатазу (IDS), глюкоцереброзидазу (GBA), β -галактозидазу, белок-активатор GM2, β -гексозаминидазу A, β -гексозаминидазу B, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу, α -маннозидазу (LAMAN), β -маннозидазу, галактозилцерамидазу (GALC), сапозин C, арилсульфатазу A (ARSA), α -L-фукозидазу (FUCA1), аспартилглюкозаминидазу, α -N-ацетилгалактозаминидазу, кислую сфингомиелиназу (ASM), α -галактозидазу A, β -глюкуронидазу (GUSB), гепаран-N-сульфатазу (SGSH), α -N-ацетилглюкозаминидазу (NAGLU), ацетил-КоА: α -глюкозаминид-N-ацетилтрансферазу, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат-сульфатазу, кислую церамидазу (AC), амило-1,6-глюкозидазу, сиалидазу, аспартилглюкозаминидазу, пальмитоил-белок тиоэстеразу 1 (PPT-1), трипептидил-пептидазу 1 (TPP-1), гиалуронидазу 1, кислую α -глюкозидазу (GAA), CLN1 и CLN2 и тому подобное.

Можно использовать фактор роста нервов (NGF), связанный с антителом против hTfR, в качестве терапевтического средства для слабоумия при болезни Альцгеймера; α -L-идуронидазу (IDUA), связанную с антителом против hTfR, в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при синдроме Гурлера или синдроме Гурлера-Шейе; идуронат-2-сульфатазу (IDS), связанную с антителом против hTfR, в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при синдроме Хантера; глюкоцереброзидазу (GBA) в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при болезни Гоше; β -галактозидазу в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при GM1-ганглиозидозе 1-3 типа; белок-активатор GM2 в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при GM2-ганглиозидозе, вариант AB; β -гексозаминидазу A в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при болезни Сандгоффа и болезни Тея-Сакса; β -гексозаминидазу B в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при болезни Сандгоффа; N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при I-клеточной болезни; α -маннозидазу (LAMAN) в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при α -маннозидозе; β -маннозидазу в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при β -маннозидозе; галактозилцерамидазу (GALC) в качестве терапевтического средства для расстройств цен-

тральной нервной системы при болезни Краббе; сапозин С в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при болезни накопления наподобие болезни Гоше; арилсульфатазу А (ARSA) в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при метахроматической дегенерации белого вещества (метахроматической лейкодистрофии); α -L-фукозидазу (FUC1) в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при флукозидозе; аспартилглюкозаминидазу в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при аспартилглюкозаминурии; α -N-ацетилгалактозаминидазу в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при болезни Шиндлера и болезни Кавасаки; кислую сфингомиелиназу (ASM) в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при болезни Ниманна-Пика; α -галактозидазу А в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при болезни Фабри; β -глюкуронидазу (GUSB) в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при синдроме Слая; гепаран-N-сульфатазу (SGSH), α -N-ацетилглюкозаминидазу (NAGLU), ацетил-КоА: α -глюкозаминид-N-ацетилтрансферазу и N-ацетилглюкозамин-6-сульфат-сульфатазу в качестве терапевтических средств для расстройств центральной нервной системы при синдроме Санфилиппо; кислую керамидазу (AC) в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при болезни Фарбера; амило-1,6-глюкозидазу в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при болезни Кори (болезни Форбас-Кори); сиалидазу в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при дефиците сиалидазы; пальмитоил-белок тиоэстеразу 1 (PPT-1) в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при нейрональном цероидном липофусцинозе или болезни Сантавуори-Халтия; трипептидилпептидазу 1 (TPP-1) в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при нейрональном цероидном липофусцинозе или болезни Янского-Бильшовского; гиалуронидазу 1 в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при дефиците гиалуронидазы; кислую α -глюкозидазу (GAA) в качестве терапевтических средств для расстройств центральной нервной системы при болезни Помпе; CLN1 и CLN2 в качестве терапевтических средств для расстройств центральной нервной системы при болезни Баттена. В частности, антитела против hTfR согласно настоящему изобретению после прохождения через гематоэнцефалический барьер достигают паренхимы головного мозга и нервоподобных клеток гиппокампа большого мозга и клеток Пуркинье мозжечка и, как ожидается, дальше достигают нервоподобных клеток полосатого тела большого мозга и нервоподобных клеток черного вещества среднего мозга. Следовательно, антитело против hTfR можно слить с белками, функцию которых необходимо проявить в этих тканях или клетках для усиления фармакологического воздействия белков. Однако этим не ограничено их медицинское применение.

Кроме того, то, что используют в качестве терапевтического средства согласно настоящему изобретению, можно использовать для предотвращения наступления заболевания.

Кроме того, примеры белков, которые могут проявлять свое фармакологическое действие при связывании с антителом против hTfR, включают: лизосомальные ферменты, цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF), нейротрофин-3, нейротрофин-4/5, нейротрофин-6, нейрегулин-1, эритропоэтин, дарбэпоэтин, активин, основной фактор роста фибробластов (bFGF), фактор роста фибробластов 2 (FGF2), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), интерферон α , интерферон β , интерферон γ , интерлейкин 6, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), цитокины, рецептор фактора некроза опухоли α (рецептор TNF- α), лиганды PD-1, PD-L1, PD-L2, ферменты, обладающие разрушающей β -амилоид активностью, антитела против β -амилоида, антитела против BACE, антитела против EGFR, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против PD-L2, антитела против HER2, антитела против TNF- α , антитела против CTLA-4 и другие лекарства на основе антител.

Можно использовать лизосомальные ферменты, связанные с антителом против hTfR, в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при лизосомальных болезнях накопления; CNTF в качестве терапевтического средства для бокового амиотрофического склероза; GDNF, нейротрофин-3 и нейротрофин-4/5 в качестве терапевтических средств для церебральной ишемии; GDNF в качестве терапевтического средства для болезни Паркинсона; нейрегулин-1 в качестве терапевтического средства для шизофрении; эритропоэтин и дарбэпоэтин в качестве терапевтических средств для церебральной ишемии; bFGF и FGF2 в качестве терапевтических средств для травматических расстройств центральной нервной системы; для восстановления после хирургической операции головного мозга и хирургической операции спинного мозга; ферменты, обладающие разрушающей β -амилоид активностью, антитела против β -амилоид и антитела против BACE в качестве терапевтических средств для болезни Альцгеймера; антитела против EGFR, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против PD-L2, антитела против HER2 и антитела против CTLA-4 в качестве терапевтических средств для опухолей центральной нервной системы, включая опухоль головного мозга; и антитело против TNFaR-hTfR в качестве терапевтических средств для церебральной ишемии и энцефалита.

Возможные кандидаты для "другого белка (А)", подлежащего слиянию с антителом против hTfR, обычно включают эти терапевтические средства для таких заболеваний, как нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Гентингтона; психические расстройства, такие как шизофрения и депрессия; рассеянный склероз; боковой амиотрофический склероз; опухоли центральной нервной системы, включая опухоль головного мозга; лизосомальные болезни накопления, сопровождающиеся энцефалопатией; гликогеноз; мышечная дистрофия; церебральная ишемия; энцефалит; прионные заболевания; травматические расстройства центральной нервной системы. Кроме того, кандидатами для другого белка (А), подлежащего слиянию с антителом против hTfR, также в общем может быть терапевтическое средство для вирусных и бактериальных заболеваний центральной нервной системы. Кроме того, кандидатами для "другого белка (А)", подлежащего слиянию с антителом против hTfR, в общем также могут быть фармацевтические средства, которые можно использовать для восстановления после хирургической операции головного мозга или хирургической операции спинного мозга.

В дополнение к упомянутым выше белкам натурального типа (дикого типа), другим белком (А), который нужно связать с антителом против hTfR, также может быть один из их аналогов, в котором модифицируют одну или более аминокислот этих белков натурального типа (дикого типа), например, заменяют другими аминокислотами или удаляют, поскольку они полностью или частично имеют функции их соответствующих исходных белков. При замене одной или более аминокислот другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3. При делеции одной или более аминокислот количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3. Для получения требуемых аналогов также можно выполнить комбинацию такого замещения и делеции аминокислот. Кроме того, аминокислотные последовательности, полученные путем добавления одной или более аминокислот внутрь или на N-терминальной стороне или на С-терминальной стороне аминокислотной последовательности белков натурального типа (дикого типа) или их аналогов, также включены в упомянутые выше белки, поскольку они полностью или частично имеют функции их соответствующих исходных белков. Количество подлежащих добавлению в данном случае аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3. Также можно получить требуемые аналоги исходных белков путем комбинирования добавления, замещения и делеции аминокислот.

Кроме того, в случае, когда мутацию вводят в другой белок (А) путем добавления одной или более аминокислот на его С-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между белком и антителом против hTfR при их слиянии, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческая кислая α -глюкозидаза натурального типа (hGAA) представляет собой лизосомальный фермент, состоящий из последовательности из 883 аминокислот, показанной как SEQ ID NO: 55. Однако в hGAA натурального типа также включена последовательность, состоящая из 896 аминокислот, показанная как SEQ ID NO: 56, в которой с N-терминальной стороны аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55, дополнительно добавлено 13 аминокислот.

Пример конкретных вариантов осуществления белков слияния согласно настоящему изобретению между антителом против hTfR и другим белком (А) относится к типу, в котором тяжелая цепь антитела против hTfR связана на ее С-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с hGAA натурального типа. Примеры белков слияния такого типа включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана пептидными связями на ее С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с hGAA. Белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, представляет собой антитело против hTfR типа IgG1, а белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, представляет собой антитело против hTfR типа IgG4. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, показана как, например, SEQ ID NO: 67, а нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, показана как, например, SEQ ID NO: 69.

Человеческая кислая α -глюкозидаза (hGAA) также называется α -1,4-глюкозидаза или кислая мальтаза. hGAA обладает активностью разрушения гликогена посредством гидролиза α -1,4- и α -1,6-гликозидных связей гликогена в лизосоме. Болезнь Помпе, также называемая болезнью накопления гликогена II типа (GSD II), представляет собой заболевание, вызываемое накоплением внутриклеточного гликогена, связанного с дефицитом активности кислой α -глюкозидазы (кислой мальтазы) в лизосоме. У пациентов с болезнью Помпе могут проявляться расстройства центральной нервной системы. hGAA, конъюгированную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих болезнь Помпе.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая GAA" или "hGAA" относится, в частности, к hGAA, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у hGAA натурального

типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получают путем введения в hGAA натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью hGAA. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hGAA другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hGAA количество подлежащих делеции аминокислот составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и еще более предпочтительно 1-2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении в hGAA одной или более аминокислот их можно добавить внутрь или с N-терминальной стороны или C-терминальной стороны аминокислотной последовательности hGAA, а количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции. Аминокислотная последовательность мутантной hGAA имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной hGAA предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hGAA обладает активностью hGAA, в данном случае означает, что hGAA, слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hGAA натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает hGAA натурального типа. То же самое также применимо, если hGAA, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и hGAA можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 59, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24, которая кодирует легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для болезни Помпе, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы при болезни Помпе. Полученным таким образом белком слияния является слитый белок гуманизированного антитела против hTfR типа IgG4 и hGAA.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или hGAA являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их C-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и hGAA, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческий I2S натурального типа представляет собой лизосомальный фермент, состоящий из последовательности из 525 аминокислот, показанной как SEQ ID NO: 50. Конкретный пример белков слияния согласно настоящему изобретению между антителом против hTfR и другим белком (A) относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на ее C-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с человеческим I2S натурального типа. Примеры такого типа белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого связана пептидными связями на ее C-терминальной стороне и через линкер, состоящий из аминокислотной последовательности Gly-Ser, с человеческим I2S с образованием аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53. Белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, является продуктом слияния тяжелой цепи антитела против hTfR типа IgG1 и hI2S, а фрагмент тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66. За счет замены этого фрагмента тяжелой цепи аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68, также можно сливать антитело против hTfR типа IgG4 с hI2S.

Человеческий I2S (hI2S) обладает активностью гидролиза сульфатных связей гепарансульфата и дерматансульфата, относящихся к гликозаминогликану. Генетические нарушения этого фермента у пациентов с синдромом Хантера приводят к таким симптомам, как неправильное развитие скелета, так как продукты частичного гидролиза гепарансульфата и дерматансульфата накапливаются в тканях печени, селезенки и тому подобное вследствие нарушения метаболизма гепарансульфата и дерматансульфата. Кроме того, у пациентов с синдромом Хантера могут проявляться расстройства центральной нервной системы. hI2S, конъюгированный с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающихся синдромом Хантера.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческий I2S" или "hI2S" относится, в частности, к hI2S, имеющему ту же аминокислотную последовательность, как у hI2S натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем введения в аминокислотную последовательность hI2S натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью I2S. При замене одной или более аминокислот

аминокислотной последовательности hI2S другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hI2S количество подлежащих делеции аминокислот составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и еще более предпочтительно 1-2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении к hI2S одной или более аминокислот их можно добавлять внутрь или на N-терминальной стороне или C-терминальной стороне аминокислотной последовательности hI2S, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность мутантного hI2S имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходного hI2S предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hI2S обладает активностью I2S, в данном случае означает, что hI2S, слитый с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hI2S натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает hI2S натурального типа. То же самое также применимо, если hI2S, слитый с антителом против hTfR, является мутантным.

Слитый белок между антителом против hTfR и hGAA можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 54, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 (легкая цепь антитела против hTfR), а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для болезни Помпе, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих болезнь Помпе. Полученным таким образом белком слияния является слитый белок гуманизированного антитела против hTfR типа IgG1 и hGAA.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или человеческий I2S являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их C-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и человеческим I2S, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческая α -L-идуронидаза натурального типа (hIDUA) представляет собой лизосомальный фермент, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 75 или 76. hIDUA, показанная как SEQ ID NO: 76, относится к типу, в котором Ala-Pro добавляют на N-терминальной стороне аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 75.

Конкретный пример белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (A) согласно настоящему изобретению относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на ее C-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с hIDUA натурального типа. Примеры таких белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана на C-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с hIDUA пептидной связью. Антитело против hTfR типа IgG1 имеет аминокислотную последовательность SE ID NO: 66, а антитело против hTfR типа IgG4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Человеческая α -L-идуронидаза (hIDUA) представляет собой лизосомальный фермент, гидролизующий связь идуроновой кислоты, имеющуюся в молекуле дерматансульфата или гепарансульфата. Синдром Гурлера, который также называется мукополисахаридоз I типа, представляет собой заболевание, вызываемое накоплением дерматансульфата и тому подобное в клетках вследствие дефицита активности α -L-идуронидазы в лизосоме. Пациенты с синдромом Гурлера могут иметь сопровождающее расстройство центральной нервной системы. hIDUA, связанную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих синдром Гурлера.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая IDUA" или "hIDUA" относится, в частности, к hIDUA, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у hIDUA натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем введения в аминокислотную последовательность hIDUA натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью hIDUA. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hIDUA другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более

предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hIDUA количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении в hIDUA одной или более аминокислот их можно добавлять внутрь или на N-терминальной стороне или C-терминальной стороне аминокислотной последовательности hIDUA, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность мутантной hIDUA имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной hIDUA предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hIDUA обладает активностью hIDUA, в данном случае означает, что hIDUA, слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hIDUA натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает hIDUA натурального типа. То же самое также применимо, если hIDUA, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и hIDUA можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для синдрома Гурлера, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих синдром Гурлера. Полученный таким образом слитый белок представляет собой слитый белок между гуманизированными антителами против hTfR типа IgG4 и hIDUA.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или hIDUA являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их C-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и hIDUA, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческая пальмитоил-белок тиоэстераза 1 натурального типа (hPPT-1) относится к типу лизосомального фермента, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 77.

Конкретный пример белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (A) согласно настоящему изобретению относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на ее C-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с hPPT-1 натурального типа. Примеры таких белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана на C-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с hPPT-1 пептидной связью. Антитело против hTfR типа IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, а антитело против hTfR типа IgG4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Нейрональный цероидный липофусциноз (включая болезнь Сантавуори-Халтия) представляет собой заболевание, вызываемое накоплением в клетках воскоподобного липофусцина вследствие дефицита активности в лизосоме пальмитоил-белок тиоэстеразы 1. Пациенты с нейрональным цероидным липофусцинозом могут иметь сопровождающее расстройство центральной нервной системы. hPPT-1, связанную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих нейрональный цероидный липофусциноз.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая PPT-1" или "hPPT-1" относится, в частности, к hPPT-1, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у hPPT-1 натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем введения в аминокислотную последовательность hPPT-1 натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью hPPT-1. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hPPT-1 другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hPPT-1 количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот в hPPT-1 их можно добавлять внутрь или на N-

терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности hPPT-1, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность мутантной hPPT-1 имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной hPPT-1 предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hPPT-1 обладает активностью hPPT-1, в данном случае означает, что hPPT-1, слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hPPT-1 натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает hPPT-1 натурального типа. То же самое также применимо, если hPPT-1, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и hPPT-1 можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для нейронального цероидного липофусциноза, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих нейрональный цероидный липофусциноз. Полученный таким образом слитый белок представляет собой слитый белок между гуманизированными антителами против hTfR типа IgG4 и hPPT-1.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или hPPT-1 являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их С-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и hPPT-1, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческая кислая сфингомиелиназа натурального типа (haSM) относится к типу лизосомального фермента, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 78.

Конкретный пример белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (A) согласно настоящему изобретению относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на ее С-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с haSM натурального типа. Примеры таких белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана на С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с haSM пептидной связью. Антитело против hTfR типа IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, а антитело против hTfR типа IgG4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Человеческая кислая сфингомиелиназа (haSM) представляет собой лизосомальный фермент, гидролизующий сфингомиелин в холинфосфат и церамид. Болезнь Ниманна-Пика классифицируют на типы А-Ф согласно отличию в причине и состоянии заболевания. Среди них, типы А и В вызваны генетически обусловленным дефицитом кислой сфингомиелиназы (ASM). Болезнь Ниманна-Пика представляет собой заболевание, вызываемое накоплением сфингомиелина в клетках вследствие дефицита активности кислой сфингомиелиназы в лизосоме. Пациенты с болезнью Ниманна-Пика могут иметь сопровождающее расстройство центральной нервной системы. haSM, связанную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих болезнь Ниманна-Пика.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая ASM" или "haSM" относится, в частности, к haSM, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у haSM натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем введения в аминокислотную последовательность haSM натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью haSM. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности haSM другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности haSM количество подлежащих делеции аминокислот составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот в haSM их можно добавлять внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности haSM, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более

предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность мутантной haSM имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной haSM предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что haSM обладает активностью haSM, в данном случае означает, что haSM, слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает haSM натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает haSM натурального типа. То же самое также применимо, если haSM, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и haSM можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для болезни Ниманна-Пика, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих болезнь Ниманна-Пика. Полученный таким образом слитый белок представляет собой слитый белок между гуманизированными антителами против hTfR типа IgG4 и haSM.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или haSM являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их С-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и haSM, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческая арилсульфатаза А натурального типа (hARSA) относится к типу лизосомального фермента, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 79.

Конкретный пример белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (А) согласно настоящему изобретению относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на ее С-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с hARSA натурального типа. Примеры таких белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана на С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с hARSA пептидной связью. Антитело против hTfR типа IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, а антитело против hTfR типа IgG4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Метахроматическая дегенерация белого вещества (метахроматическая лейкодистрофия) представляет собой заболевание, вызываемое накоплением в клетках сульфатида и тому подобное вследствие дефицита активности арилсульфатазы А в лизосоме. Пациенты с метахроматической дегенерацией белого вещества могут иметь сопровождающее расстройство центральной нервной системы. hARSA, связанную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих метахроматическую дегенерацию белого вещества.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая ARSA" или "hARSA" относится, в частности, к hARSA, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у hARSA натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем введения в аминокислотную последовательность hARSA натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью hARSA. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hARSA другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hARSA количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот в hARSA их можно добавлять внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности hARSA, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность мутантной hARSA имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной hARSA предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hARSA обладает активностью hARSA, в данном случае означает, что hARSA,

слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hARSA натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает hARSA натурального типа. То же самое также применимо, если hARSA, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и hARSA можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для метахроматической дегенерации белого вещества, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих метахроматическую дегенерацию белого вещества. Полученный таким образом слитый белок представляет собой слитый белок между гуманизированными антителами против hTfR типа IgG4 и hARSA.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или hARSA являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их С-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и hARSA, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческая гепаран-N-сульфатаза натурального типа (hSGSH) относится к типу лизосомального фермента, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 80.

Конкретный пример белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (A) согласно настоящему изобретению относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на ее С-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с hSGSH натурального типа. Примеры таких белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана на С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с hSGSH пептидной связью. Антитело против hTfR типа IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, а антитело против hTfR типа IgG4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Синдром Санфилиппо, который также называется мукополисахаридоз II типа (MPS II типа I), представляет собой заболевание, вызываемое накоплением гепарансульфата в клетках вследствие дефицита активности гепаран-N-сульфатазы в лизосоме. Необходимо заметить, что синдром Санфилиппо может быть вызван дефицитом других ферментов, таких как α -N-ацетилглюкозаминидаза. Пациенты с синдромом Санфилиппо могут иметь сопровождающее расстройство центральной нервной системы. hSGSH, связанную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих синдром Санфилиппо.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая SGSH" или "hSGSH" относится, в частности, к hSGSH, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у hSGSH натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем введения в аминокислотную последовательность hSGSH натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью hSGSH. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hSGSH другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hSGSH количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот в hSGSH их можно добавлять внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности hSGSH, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность мутантной hSGSH имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной hSGSH предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hSGSH обладает активностью hSGSH, в данном случае означает, что hSGSH, слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hSGSH натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает hSGSH натур-

рального типа. То же самое также применимо, если hSGSH, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и hSGSH можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для синдрома Санфилиппо, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих синдром Санфилиппо. Полученный таким образом слитый белок представляет собой слитый белок между гуманизированными антителами против hTfR типа IgG4 и hSGSH.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или hSGSH являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их С-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и hSGSH, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческая глюкоцереброзидаза натурального типа (hGBA) относится к типу лизосомального фермента, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 81.

Конкретный пример белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (A) согласно настоящему изобретению относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на ее С-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с hGBA натурального типа. Примеры таких белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана на С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с hGBA пептидной связью. Антитело против hTfR типа IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, а антитело против hTfR типа IgG4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Человеческая глюкоцереброзидаза (hGBA) представляет собой лизосомальный фермент, гидролизующий гликолипид глюкоцереброзид (глюкозилцерамид). Болезнь Гоше представляет собой заболевание, вызываемое накоплением в клетках глюкоцереброзида вследствие дефицита активности глюкоцереброзидазы в лизосоме. Пациенты с болезнью Гоше могут иметь сопровождающее расстройство центральной нервной системы. hGBA, связанную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих болезнь Гоше.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая GBA" или "hGBA" относится, в частности, к hGBA, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у hGBA натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем введения в аминокислотную последовательность hGBA натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью hGBA. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hGBA другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hGBA количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот в hGBA их можно добавлять внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности hGBA, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность мутантной hGBA имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной hGBA предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hGBA обладает активностью hGBA в данном случае означает, что hGBA, слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hGBA натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает hGBA натурального типа. То же самое также применимо, если hGBA, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и hGBA можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имею-

щим встроенный сегмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для болезни Гоше, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих болезнь Гоше. Полученный таким образом слитый белок представляет собой слитый белок между гуманизированными антителами против hTfR типа IgG4 и hGBA.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или hGBA являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их С-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и hGBA, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческая трипептидил пептидаза-1 натурального типа (hTPP-1) относится к типу лизосомального фермента, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 82.

Конкретный пример белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (A) согласно настоящему изобретению относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на ее С-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с hTPP-1 натурального типа. Примеры таких белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана на С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с hTPP-1 пептидной связью. Антитело против hTfR типа IgG1 имеет аминокислотную последовательность SE ID NO: 66, а антитело против hTfR типа IgG4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Нейрональный цероидный липофусциноз (включая болезнь Сантавуори-Халтия) представляет собой заболевание, вызываемое накоплением в клетках липофусцина вследствие дефицита активности трипептидил пептидазы 1 в липосоме. Пациенты с нейрональным цероидным липофусцинозом могут иметь сопровождающее расстройство центральной нервной системы. hTPP-1, связанную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих нейрональный цероидный липофусциноз.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая TPP-1" или "hTPP-1" относится, в частности, к hTPP-1, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у hTPP-1 натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем введения в аминокислотную последовательность hTPP-1 натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью hTPP-1. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hTPP-1 другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hTPP-1 количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении в hTPP-1 одной или более аминокислот их можно добавлять внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности hTPP-1, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность мутантной hTPP-1 имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной hTPP-1 предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hTPP-1 обладает активностью hTPP-1, в данном случае означает, что hTPP-1, слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hTPP-1 натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает hTPP-1 натурального типа. То же самое также применимо, если hTPP-1, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и hTPP-1 можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для нейронального цероидного липофусциноза, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих нейрональный цероидный липофусци-

ноз. Полученный таким образом слитый белок представляет собой слитый белок между гуманизированными антителами против hTfR типа IgG4 и hTPP-1.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или hTPP-1 являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их С-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и hTPP-1, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческая α -N-ацетилглюкозаминидаза натурального типа (hNAGLU) относится к типу лизосомального фермента, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83.

Конкретный пример белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (A) согласно настоящему изобретению относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на ее С-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с hNAGLU натурального типа. Примеры таких белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана на С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с hNAGLU пептидной связью.

Антитело против hTfR типа IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, а антитело против hTfR типа IgG4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Синдром Санфилиппо представляет собой заболевание, вызываемое накоплением в клетках гепарансульфата вследствие дефицита активности α -N-ацетилглюкозаминидазы в лизосоме. Пациенты с синдромом Санфилиппо могут иметь сопровождающее расстройство центральной нервной системы. hNAGLU, связанную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих синдром Санфилиппо.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая NAGLU" или "hNAGLU" относится, в частности, к hNAGLU, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у hNAGLU натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем введения в аминокислотную последовательность hNAGLU натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью hNAGLU. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hNAGLU другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hNAGLU количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот в hNAGLU их можно добавлять внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности hNAGLU, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислот. Аминокислотная последовательность мутантной hNAGLU имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной hNAGLU предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hNAGLU обладает активностью hNAGLU, в данном случае означает, что hNAGLU, слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hNAGLU натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает hNAGLU натурального типа. То же самое также применимо, если hNAGLU, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и hNAGLU можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для синдрома Санфилиппо, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих синдром Санфилиппо. Полученный таким образом слитый белок представляет собой слитый белок между гуманизированными антителами против hTfR типа IgG4 и hNAGLU.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или hNAGLU являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их С-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и hNAGLU, добавленные аминокислоты составляют

часть линкера.

Человеческая β -глюкуронидаза натурального типа (hGUSB) относится к типу лизосомального фермента, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84.

Конкретный пример белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (A) согласно настоящему изобретению относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на ее С-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с hGUSB натурального типа. Примеры таких белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана на С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с hGUSB пептидной связью. Антитело против hTfR типа IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, а антитело против hTfR типа IgG4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Синдром Слая, который также называется мукополисахаридоз VII тип (MPS VII тип), представляет собой заболевание, вызываемое накоплением в клетках мукополисахаридов вследствие дефицита активности β -глюкуронидазы в лизосоме. Пациенты с синдромом Слая могут иметь сопровождающее расстройство центральной нервной системы. hGUSB, связанную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих синдром Слая.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая GUSB" или "hGUSB" относится, в частности, к hGUSB, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у hGUSB натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем введения в аминокислотную последовательность hGUSB натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью hGUSB. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hGUSB другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hGUSB количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот в hGUSB их можно добавлять внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности hGUSB, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность мутантной hGUSB имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной hGUSB предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hGUSB обладает активностью hGUSB, в данном случае означает, что hGUSB, слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hGUSB натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает hGUSB натурального типа. То же самое также применимо, если hGUSB, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и hGUSB можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок представляет собой слитый белок между гуманизированными антителами против hTfR типа IgG4 и hGUSB. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для синдрома Слая, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих синдром Слая.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или hGUSB являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их С-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и hGUSB, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческая галактозилцерамидаза натурального типа (hGALC) относится к типу лизосомального фермента, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85.

Конкретный пример белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (A) согласно настоящему изобретению относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на

ее С-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с hGALC натурального типа. Примеры таких белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана на С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с hGALC пептидной связью. Антитело против hTfR типа IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, а антитело против hTfR типа IgG4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Болезнь Краббе представляет собой заболевание, вызываемое дефицитом активности галактозилцерамидазы. Пациенты с болезнью Краббе могут иметь сопровождающее расстройство центральной нервной системы. hGALC, связанную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих болезнь Краббе.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая GALC" или "hGALC" относится, в частности, к hGALC, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у hGALC натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем введения в аминокислотную последовательность hGALC натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью hGALC. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hGALC другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hGALC количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении в hGALC одной или более аминокислот их можно добавлять внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности hGALC, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность мутантной hGALC имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной hGALC предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hGALC обладает активностью hGALC, в данном случае означает, что hGALC, слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hGALC натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает hGALC натурального типа. То же самое также применимо, если hGALC, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и hGALC можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для болезни Краббе, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих болезнь Краббе. Полученный таким образом слитый белок представляет собой слитый белок между гуманизированными антителами против hTfR типа IgG4 и hGALC.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или hGALC являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их С-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и hGALC, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческая кислая церамидаза натурального типа (hAC) относится к типу лизосомального фермента, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86.

Конкретный пример белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (А) согласно настоящему изобретению относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на ее С-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с hAC натурального типа. Примеры таких белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана на С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с hAC пептидной связью. Антитело против hTfR типа IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, а антитело против hTfR типа IgG4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Болезнь Фарбера представляет собой заболевание, вызываемое накоплением в клетках церамида

вследствие дефицита активности кислой керамидазы в лизосоме. Пациенты с болезнью Фарбера могут иметь сопровождающее расстройство центральной нервной системы. hAC, связанную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих болезнь Фарбера.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая AC" или "hAC" относится, в частности, к hAC, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у hAC натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем введения в аминокислотную последовательность hAC натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью hAC. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hAC другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hAC количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот в hAC их можно добавлять внутрь или на N-терминальной стороне или C-терминальной стороне аминокислотной последовательности hAC, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислоты. Аминокислотная последовательность мутантной hAC имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной hAC предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hAC обладает активностью hAC, в данном случае означает, что hAC, слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hAC натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает hAC натурального типа. То же самое также применимо, если hAC, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и hAC можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для болезни Фарбера, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих болезнь Фарбера. Полученный таким образом слитый белок представляет собой слитый белок между гуманизированными антителами против hTfR типа IgG4 и hAC.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или hAC являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их C-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и hAC, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческая α -L-фукозидаза натурального типа (hFUCA1) относится к типу лизосомального фермента, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 87.

Конкретный пример белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (A) согласно настоящему изобретению относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на ее C-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с hFUCA1 натурального типа. Примеры таких белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана на C-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с hFUCA1 пептидной связью. Антитело против hTfR типа IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, а антитело против hTfR типа IgG4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Фукозидоз представляет собой заболевание, вызываемое накоплением в клетках фукозосодержащих олигосахаридов вследствие дефицита активности α -L-фукозидазы в лизосоме. Пациенты с фукозидозом могут иметь сопровождающее расстройство центральной нервной системы. hFUCA1, связанную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих фукозидоз.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая FUCA1" или "hFUCA1" относится, в частности, к hFUCA1, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у hFUCA1 натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем

введения в аминокислотную последовательность hFUCA1 натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью hFUCA1. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hFUCA1 другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hFUCA1 количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот в hFUCA1 их можно добавлять внутрь или на N-терминальной стороне или C-терминальной стороне аминокислотной последовательности hFUCA1, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислот. Аминокислотная последовательность мутантной hFUCA1 имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной hFUCA1 предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hFUCA1 обладает активностью hFUCA1, в данном случае означает, что hFUCA1, слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hFUCA1 натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой типа в действительности обладает hFUCA1 натурального. То же самое также применимо, если hFUCA1, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и hFUCA1 можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 174, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для флукозидоза, в частности, терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих флукозидоз. Полученный таким образом слитый белок представляет собой слитый белок между гуманизированными антителами против hTfR типа IgG4 и hFUCA1.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или hFUCA1 являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их C-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и hFUCA1, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

Человеческая α -маннозидаза натурального типа (hLAMAN) относится к типу лизосомального фермента, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88.

Конкретный пример белка слияния между антителом против hTfR и другим белком (A) согласно настоящему изобретению относится к типу, в котором тяжелую цепь антитела против hTfR сливают на ее C-конце и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser в качестве линкерной последовательности с hLAMAN натурального типа. Примеры таких белков слияния включают белок, легкая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 или 68, и связана на C-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности Gly-Ser с hLAMAN пептидной связью. Антитело против hTfR типа IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, а антитело против hTfR типа IgG4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Человеческая α -маннозидаза (hLAMAN) представляет собой лизосомальный фермент, гидролизующий маннозу α -типа. α -маннозидоз представляет собой заболевание, вызываемое накоплением в клетках маннозосодержащих олигосахаридов вследствие дефицита активности α -маннозидазы в лизосоме. Патенты с α -маннозидозом могут иметь сопровождающее расстройство центральной нервной системы. hLAMAN, связанную с антителом против hTfR, можно использовать в качестве терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих α -маннозидоз.

Согласно настоящему изобретению, хотя термин "человеческая LAMAN" или "hLAMAN" относится, в частности, к hLAMAN, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как у hLAMAN натурального типа, он также включает те аминокислотные последовательности, которые получены путем введения в аминокислотную последовательность hLAMAN натурального типа такой мутации, как замещение, делеция, добавление и тому подобное, поскольку они обладают активностью hLAMAN. При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности hLAMAN другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. При делеции одной

или более аминокислот аминокислотной последовательности hLAMAN количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого замещения и делеции аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот в hLAMAN их можно добавлять внутрь или на N-терминальной стороне или C-терминальной стороне аминокислотной последовательности hLAMAN, и количество подлежащих добавлению аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1 или 2. Также можно вводить комбинированную мутацию такого добавления, замещения и делеции аминокислот. Аминокислотная последовательность мутантной hLAMAN имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной hLAMAN предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Утверждение, что hLAMAN обладает активностью hLAMAN, в данном случае означает, что hLAMAN, слитая с антителом против hTfR, обладает активностью не ниже чем 3% активности, которой в действительности обладает hLAMAN натурального типа. Однако активность составляет предпочтительно не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, еще более предпочтительно не ниже чем 80% активности, которой в действительности обладает hLAMAN натурального типа. То же самое также применимо, если hLAMAN, слитая с антителом против hTfR, является мутантной.

Слитый белок между антителом против hTfR и hLAMAN можно получить, например, посредством трансформации клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих, экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 182, и экспрессирующим вектором, имеющим встроенный сегмент ДНК, кодирующий легкую цепь антитела против hTfR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а затем культивирования клеток-хозяев. Полученный таким образом слитый белок можно использовать в качестве терапевтического средства для α -маннозидоза, в частности терапевтического средства для расстройств центральной нервной системы, сопровождающих α -маннозидоз. Полученный таким образом слитый белок представляет собой слитый белок между гуманизированными антителами против hTfR типа IgG4 и hLAMAN.

Кроме того, в случае, когда антитела против hTfR или hLAMAN являются мутантными за счет добавления к ним одной или более аминокислот на их C-конце или N-конце, если добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и hLAMAN, добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

В качестве примеров белков слияния между антителом против hTfR и другим белком (A), белки слияния, имеющие в качестве другого белка (A) hGAA, hIDS, hIDUA, hPPT-1, haSM, hARSA, hSGSH, hGBA, hTTP-1, hNAGLU, hGUSB, hAC, hFUCal и hLAMAN, соответственно, описаны выше, но нет особых ограничений относительно аминокислотной последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи антитела против hTfR в предпочтительных вариантах осуществления белков слияния между антителом против hTfR и таким другим белком (A), поскольку антитело обладает специфической аффинностью к hTfR.

Однако антителами против TfR, используемыми в настоящем описании, являются антитела, имеющие следующую константу диссоциации, в частности, при измерении описанным в примере 7 способом: константа диссоциации с TfR человека: предпочтительно не более чем 1×10^{-10} М, более предпочтительно не более чем 1×10^{-11} М, еще более предпочтительно не более чем 5×10^{-12} М, еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-12} М; а константа диссоциации с TfR обезьяны: предпочтительно не более чем 1×10^{-9} М, более предпочтительно не более чем 5×10^{-10} М, еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-10} М, например не более чем $7,5 \times 10^{-11}$ М.

Например, константы диссоциации с TfR человека и TfR обезьяны составляют не более чем 1×10^{-10} М и не более чем 1×10^{-9} М, не более чем 1×10^{-11} М и не более чем 5×10^{-10} М, не более чем 5×10^{-12} М и не более чем 1×10^{-10} М, не более чем 5×10^{-12} М и не более чем $7,5 \times 10^{-11}$ М, не более чем 1×10^{-12} М и не более чем 1×10^{-10} М или не более чем 1×10^{-12} М и не более чем $7,5 \times 10^{-11}$ М, соответственно. В этом контексте, хотя нет особенно четкого нижнего предела константы диссоциации с TfR человека, он может составлять, например, 5×10^{-13} М или 1×10^{-13} М. Хотя нет особенно четкого нижнего предела константы диссоциации с TfR обезьяны, он может составлять, например, 1×10^{-11} М или 1×10^{-12} М. То же самое также применимо, если антителом является одноцепочечное антитело.

Также можно связать относительно короткую пептидную цепь с антителом против hTfR таким же образом, как при связывании другого белка (A) с антителом против hTfR. Нет особых ограничений в отношении пептидной цепи, которую нужно связать с антителом против hTfR, поскольку пептидная цепь обладает требуемой физиологической активностью. Например, существуют пептидные цепи, содержащие аминокислотную последовательность такой области различных белков, которая проявляет физиологическую активность. Хотя нет особых ограничений в отношении длины пептидной цепи, они состоят предпочтительно из 2-200 аминокислот, например, из 5-50 аминокислот.

При связывании низкомолекулярного соединения с антителом против hTfR нет особых ограниче-

ний в отношении кандидатных низкомолекулярных соединений, но они представляют собой такое низкомолекулярное соединение, которое хотя и необходимо ввести внутрь головного мозга для проявления там его функции, вследствие их неспособности проходить через гематоэнцефалический барьер самих по себе, нельзя ожидать проявления их функции в головном мозге просто при внутривенном введении. Примеры таких низкомолекулярных соединений включают противораковый препарат, такой как циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан, бусульфан, тиотепа, нимустин, ранимустин, дакарбазин, прокарбазин, темозоломид, кармустин, стрептозоцин, бендамустин, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, недаплатин, 5-фторурацил, сульфадиазин, сульфаметоксазол, метотрексат, триметоприм, пириметамин, фторурацил, флуцитозин, азатиоприн, пентостатин, гидроксимочевина, флударабин, цитарабин, гемцитабин, иринотекан, доксорубин, этопозид, левофлоксацин, цiproфлоксацин, винбластин, винкристин, паклитаксел, доцетаксел, митомицин С, доксорубин, эпирубинин. Дополнительные примеры низкомолекулярного соединения, которое нужно связать с антителом против hTfR включают siRNA, антисмысловые ДНК и короткие пептиды.

При связывании между антителом против hTfR и низкомолекулярным соединением, низкомолекулярное соединение можно связать либо только с одной из легкой цепи и тяжелой цепи, либо его можно связать и с легкой цепью и с тяжелой цепью, соответственно. Кроме того, поскольку оно обладает аффинностью к hTfR, антитело против hTfR может содержать аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть варибельной области легкой цепи, и/или аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть варибельной области тяжелой цепи.

Кандидаты низкомолекулярных соединений, подлежащих слиянию с антителами против hTfR, обычно могут быть эти терапевтические средства для таких заболеваний, как нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона; психические расстройства, такие как шизофрения, депрессия; рассеянный склероз; боковой амиотрофический склероз; опухоль центральной нервной системы, включая опухоль головного мозга; лизосомальные болезни накопления с сопровождающей энцефалопатией; гликогеноз; мышечная дистрофия; церебральная ишемия; энцефалит; прионные заболевания; травматические расстройства центральной нервной системы. Кроме того, терапевтические средства для вирусных и бактериальных заболеваний центральной нервной системы также в общем могут быть кандидатами низкомолекулярных соединений, подлежащих слиянию с антителами против hTfR. Кроме того, те фармацевтические средства, которые можно использовать для восстановления после хирургической операции головного мозга или хирургической операции спинного мозга, также в общем могут быть кандидатами низкомолекулярных соединений, подлежащих слиянию.

Если антитело против hTfR происходит от нечеловекообразного животного, его введение человеку может повлечь за собой существенный риск возникновения взаимодействия антиген-антитело, провоцируя посредством этого неблагоприятные побочные эффекты. За счет преобразования их в гуманизированные антитела антигенность антител нечеловекообразных животных можно снизить и, следовательно, можно подавить провоцирование побочных эффектов вследствие взаимодействия антиген-антитело при введении человеку. Кроме того, сообщалось, что согласно экспериментам с использованием обезьян гуманизированные антитела более устойчивы в крови, чем мышиные антитела, и ожидается, что их терапевтическое действие, следовательно, может стать, соответственно, более продолжительным. Провоцирование побочных эффектов вследствие взаимодействия антиген-антитело можно подавить также за счет использования в качестве антител против hTfR человеческого антитела.

Ниже будет приведено подробное объяснение, касающееся случая, когда антителом против hTfR является гуманизированное антитело или человеческое антитело. В легкой цепи человеческого антитела существуют цепи λ и κ . Легкой цепью, составляющей человеческое антитело, может быть либо λ , либо κ цепь. А в человеческой тяжелой цепи существуют γ , μ , α , σ и ϵ цепи, которые соответствуют IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. Хотя тяжелой цепью, составляющей антитело против hTfR, может быть любая из γ , μ , α , σ и ϵ цепей, предпочтительной является γ цепь. Кроме того, в μ цепи человеческой тяжелой цепи существуют $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ и $\gamma 4$ цепи, которые соответствуют IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, соответственно. Когда тяжелой цепью, составляющей антитело против hTfR, является μ цепь, хотя μ цепью может быть любая из $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ и $\gamma 4$ цепей, предпочтительной является $\gamma 1$ или $\gamma 4$ цепь. В случае, когда антителом против hTfR является гуманизированное антитело или человеческое антитело и IgG, легкой цепью человеческого антитела может быть либо λ цепь, либо κ цепь, и хотя тяжелой цепью человеческого антитела может быть либо $\gamma 1$, либо $\gamma 2$, либо $\gamma 3$, либо $\gamma 4$ цепи, предпочтительной является $\gamma 1$ или $\gamma 4$ цепь. Например, предпочтительный вариант осуществления антитела против hTfR включает белок, легкой цепью которого является λ цепь, а тяжелой цепью является $\gamma 1$ цепь.

В случае, когда антителом против hTfR является гуманизированное антитело или человеческое антитело, антитело против hTfR и другой белок (А) можно связать вместе за счет связывания антитела против hTfR на N-конце (или С-конце) тяжелой цепи или легкой цепи посредством линкерной последовательности или прямо с С-концом (или N-концом), соответственно, другого белка (А) пептидными связями. При связывании другого белка (А) с тяжелой цепью антитела против hTfR на ее N-терминальной стороне (или на С-терминальной стороне) С-конец (или N-конец), соответственно, другого белка (А) свя-

зан с N-концом (или С-концом) γ , μ , α , σ или ϵ цепи антитела против hTfR посредством линкерной последовательности или непосредственно, пептидными связями. При связывании другого белка (А) с легкой цепью антитела против hTfR на ее N-терминальной стороне (или С-терминальной стороне) С-конец (или N-конец), соответственно, другого белка (А) связывают с N-концом (или С-концом) λ цепи и к цепи антитела против hTfR посредством линкерной последовательности или непосредственно, пептидными связями. Однако в случае, когда антитело против hTfR состоит из Fab-области, или из Fab-области и всей или части шарнирной области (Fab, F(ab')₂ и F(ab')), другой белок (А) можно связать на его С-конце (или N-конце) и посредством линкерной последовательности или непосредственно с N-концом (или С-концом), соответственно, тяжелой цепи или легкой цепи, которая составляет Fab, F(ab')₂ и F(ab'), пептидными связями.

В белке слияния, полученном за счет связывания другого белка (А) с легкой цепью антитела против hTfR, которым является гуманизированное антитело или человеческое антитело, на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне, антитело против рецептора трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть варибельной области легкой цепи, и аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть варибельной области тяжелой цепи. Легкая цепь антитела против hTfR и другой белок (А) в данном случае можно связать непосредственно или через линкер.

В белке слияния, полученном за счет связывания другого белка (А) с тяжелой цепью антитела против hTfR, которым является гуманизированное антитело или человеческое антитело, на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне, антитело против рецептора трансферрина человека содержит аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть варибельной области легкой цепи, и аминокислотную последовательность, содержащую всю или часть варибельной области тяжелой цепи. Тяжелую цепь антитела против hTfR и другой белок (А) в данном случае можно связать непосредственно или через линкер.

При помещении линкерной последовательности между антителом или человеческим антителом против hTfR и другим белком (А) линкерной последовательностью предпочтительно является пептидная цепь, состоящая из 1-50 аминокислот, хотя количество аминокислот, составляющих такую линкерную последовательность, при необходимости можно регулировать в соответствии с другим белком (А), который нужно связать с антителом против hTfR, наподобие 1-17, 1-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29 и так далее. Хотя нет особых ограничений в отношении конкретной аминокислотной последовательности такой линкерной последовательности, поскольку антитело против hTfR и другой белок (А), связанные линкерной последовательностью, сохраняют свои соответствующие функции (аффинность к hTfR и активность или функцию в физиологических условиях), она предпочтительно состоит из глицина или серина, например, она состоит из одной аминокислоты, либо глицина, либо серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), аминокислотной последовательности Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) или последовательности, которая содержит 1-10 или 2-5 любых этих последовательно связанных аминокислотных последовательностей. Например, предпочтительно используют содержащую 27 аминокислот линкерную последовательность, которая состоит из аминокислотной последовательности Gly-Ser, за которой следуют последовательно связанные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3). Кроме того, также предпочтительно используют линкерную последовательность, содержащую 25 аминокислот, которая состоит из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

Кроме того, при утверждении в настоящем описании, что другой белок (А), слитый с антителом или человеческим антителом против hTfR, сохраняет свою активность или функцию в физиологических условиях, или просто он "сохраняет активность", это означает, что по сравнению с присущей активностью другого белка (А) натурального типа активность или функция сохраняется не ниже чем 3%. Однако такая активность или функция предпочтительно составляет не ниже чем 10%, более предпочтительно не ниже чем 20%, еще более предпочтительно не ниже чем 50%, а еще более предпочтительно не ниже чем 80% по сравнению с присущей активностью другого белка (А) натурального типа. То же самое также применимо, когда другим белком (А), слитым с антителом против hTfR, является мутантный белок.

Дополнительным примером конкретных вариантов осуществления белка слияния между гуманизированными антителами или человеческим антителом против hTfR и другим белком (А) согласно настоящему изобретению является белок, полученный посредством слияния тяжелой цепи антитела против hTfR на ее С-терминальной стороне с другим белком (А) посредством состоящей из 27 аминокислот линкерной последовательности, которая состоит из аминокислотной последовательности Gly-Ser, за которой следуют последовательно связанные пять копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

В случае, когда антителом против hTfR является Fab, примером конкретных вариантов осуществления белков слияния между гуманизированными антителами или человеческим антителом против hTfR

настоящего изобретения и другим белком (А) является белок, полученный за счет слияния другого белка (А) на его С-терминальной стороне посредством линкерных последовательностей с областью, состоящей из вариабельной области тяжелой цепи антитела против hTfR и сопровождающей ее C_H1 области, в котором линкерная последовательность состоит из 25 аминокислот и состоит из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3). Хотя в данном случае также допускается, что кроме C_H1 области также имеется часть шарнирной области, шарнирная область не содержит цистеинового остатка, который образовал бы между тяжелыми цепями дисульфидную связь.

Специфическая аффинность антитела против hTfR к hTfR свойственна главным образом аминокислотным последовательностям CDR тяжелой цепи и легкой цепи антитела против hTfR. Нет особых ограничений относительно аминокислотных последовательностей этих CDR, поскольку в дополнение к hTfR антитело против hTfR обладает специфической аффинностью к hTfR обезьяны.

Однако согласно настоящему изобретению гуманизованное антителом или человеческим антителом против hTfR, которое представляет собой антитело, обладающее относительно высокой аффинностью к hTfR и обладающее аффинностью к TfR как человека, так и обезьяны, одновременно, является антитело константа диссоциации которого с TfR человека предпочтительно составляет не более чем 1×10^{-10} М, более предпочтительно не более чем $2,5 \times 10^{-11}$ М, еще более предпочтительно не более чем 5×10^{-12} М и еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-12} М, а константа диссоциации которого с TfR обезьяны предпочтительно составляет не более чем 1×10^{-9} М, более предпочтительно не более чем 5×10^{-10} М и еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-10} М, например, не более чем $7,5 \times 10^{-11}$ М, в частности, при измерении описанным в примере 7 способом.

Например, константы диссоциации с TfR человека и TfR обезьяны составляют не более чем 1×10^{-10} М и не более чем 1×10^{-9} М, не более чем 1×10^{-11} М и не более чем 5×10^{-10} М, не более чем 5×10^{-12} М и не более чем 1×10^{-10} М, не более чем 5×10^{-12} М и не более чем $7,5 \times 10^{-11}$ М, не более чем 1×10^{-12} М и не более чем 1×10^{-10} М или не более чем 1×10^{-12} М и не более чем $7,5 \times 10^{-11}$ М, соответственно. В этом контексте, хотя нет особенно четкого нижнего предела константы диссоциации с TfR человека, он может составлять, например, 5×10^{-13} М или 1×10^{-13} М. Кроме того, хотя нет особенно четкого нижнего предела константы диссоциации с TfR обезьяны, он может составлять, например, 1×10^{-11} М или 1×10^{-12} М и тому подобное. То же самое также применимо, если антителом является одноцепочечное антитело.

Примеры предпочтительных вариантов осуществления обладающего аффинностью к hTfR антитела включают антитела, в которых в вариабельной области тяжелой цепи

- (a) CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63,
- (b) CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14, а
- (c) CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

Примеры более конкретных вариантов осуществления обладающего аффинностью к hTfR антитела включают антитела, в которых в вариабельной области тяжелой цепи,

- (a) CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62,
- (b) CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, а
- (c) CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

В упомянутых выше предпочтительных вариантах осуществления обладающего аффинностью к hTfR антитела и более конкретных вариантах осуществления обладающего аффинностью к hTfR антитела предпочтительные примеры аминокислотной последовательности каркасной области 3 тяжелой цепи антитела включают области, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

Примеры предпочтительных комбинаций легкой цепи и тяжелой цепи обладающего аффинностью к hTfR антитела включают цепи, имеющие аминокислотные последовательности ниже в вариабельных областях: комбинацию легкой цепи, в которой:

- (a) CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7,
- (b) CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность Lys-Val-Ser, а
- (c) CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и тяжелой цепи, в которой
- (d) CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63,
- (e) CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14, а
- (f) CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

Примеры конкретных вариантов осуществления комбинаций легкой цепи и тяжелой цепи обладающего аффинностью к hTfR антитела включают цепи, имеющие аминокислотные последовательности ниже в вариабельных областях: комбинацию легкой цепи, содержащей аминокислотные последовательности, показанные как SEQ ID NO: 6 в качестве CDR1, SEQ ID NO: 8 в качестве CDR2 и SEQ ID NO: 10 в качестве CDR3, соответственно, и тяжелой цепи, содержащей аминокислотные последовательности, показанные как SEQ ID NO: 62 в качестве CDR1, SEQ ID NO: 13 в качестве CDR2 и SEQ ID NO: 15 в качестве CDR3, соответственно.

В упомянутых выше предпочтительных комбинациях легкой цепи и тяжелой цепи обладающего аффинностью к hTfR антитела и конкретных вариантах осуществления комбинаций легкой цепи и тяжелой цепи обладающего аффинностью к hTfR антитела предпочтительные примеры аминокислотной последовательности каркасной области 3 тяжелой цепи антитела включают области, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

Примеры предпочтительных вариантов осуществления обладающих аффинностью к hTfR гуманизированных антител включают антитела, имеющие аминокислотные последовательности ниже: антитела против hTfR, переменная область легкой цепи которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22, а переменная область тяжелой цепи которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

В аминокислотных последовательностях переменной области легкой цепи, показанных как SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или 7, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или 9, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. Однако термин CDR, который использован выше в отношении аминокислотных последовательностей переменной области легкой цепи, показанных как SEQ ID NO: 17-22, не ограничен этими конкретными последовательностями, но также может включать область, содержащую аминокислотные последовательности одной из CDR, или включать аминокислотную последовательность, содержащую не менее чем 3 последовательные аминокислоты одной из упомянутых выше CDR.

В аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, показанной как SEQ ID NO: 65:

- (a) CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 или 63,
- (b) CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, а
- (c) CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или 16, а

аминокислотная последовательность, показанная как SEQ ID NO: 64, также содержится в виде каркасной области 3. Однако термин CDR, используемый выше в отношении аминокислотных последовательностей переменной области тяжелой цепи, показанных как SEQ ID NO: 65, не ограничен этими конкретными последовательностями, но также может включать область, содержащую аминокислотные последовательности одной из CDR или включать аминокислотную последовательность, содержащую не менее чем 3 последовательные аминокислоты одной из упомянутых выше CDR. То же самое также применимо для каркасных областей.

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

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, в переменной области легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, в переменной области тяжелой цепи,

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, в переменной области легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, в переменной области тяжелой цепи,

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, в переменной области легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, в переменной области тяжелой цепи и

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, в переменной области легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, в переменной области тяжелой цепи.

Примеры более конкретных вариантов осуществления обладающего аффинностью к hTfR гуманизированного антитела включают

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, в легкой цепи и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, в тяжелой цепи,

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, в легкой цепи и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, в тяжелой цепи,

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, в легкой цепи и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, в тяжелой цепи,

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, в легкой цепи и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, в тяжелой цепи,

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, в легкой цепи и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, в тяжелой цепи,

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, в легкой цепи и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, в тяжелой цепи,

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, в легкой цепи и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, в тяжелой цепи, и

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, в легкой цепи и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, в тяжелой цепи.

В упомянутых выше конкретных вариантах осуществления гуманизированным антителом против hTfR, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, в тяжелой цепи, является антитело типа IgG1, а антителом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, является антитело типа IgG4. Они оба содержат в качестве вариательной области аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

Примеры более конкретных вариантов осуществления гуманизированного антитела, которым является Fab, обладающий аффинностью к hTfR, включают:

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, в легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, в тяжелой цепи Fab,

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, в легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, в тяжелой цепи Fab,

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, в легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, в тяжелой цепи Fab, и

антитело, которое содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, в легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, в тяжелой цепи Fab.

В случае, когда антителом против hTfR является Fab, конкретные примеры антитела, в котором в тяжелую цепь Fab добавляют другую Fc-область, включают

антитело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, в легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, в тяжелой цепи Fab с добавленной в него Fc-областью,

антитело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, в легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, в тяжелой цепи Fab с добавленной в него Fc-областью,

антитело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, в легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, в тяжелой цепи Fab с добавленной в него Fc-областью, и

антитело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, в легкой цепи и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, в тяжелой цепи Fab с добавленной в него Fc-областью.

При добавлении в тяжелую цепь Fab упомянутой выше другой Fc-области, например, тяжелую цепь Fab с добавленной в него Fc-областью можно связать непосредственно или посредством линкерной последовательности с другим белком (A) на его С-терминальной стороне. Кроме того, тяжелой цепью Fab, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, является тяжелая цепь Fab, в которой Fc-область IgG человека, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, связана посредством линкерной последовательности, содержащей 25 аминокислот, которая состоит из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), с N-терминальной стороной аминокислотной последовательности тяжелой цепи Fab (аминокислотная последовательность: 61) гуманизированного антитела против hTfR 3N.

Выше были приведены для примера предпочтительные варианты осуществления обладающего аффинностью к hTfR антитела. При необходимости можно вызвать мутацию легкой цепи и тяжелой цепи этих антител против hTfR посредством замещения, делеции, добавления и тому подобное в аминокислотных последовательностях их вариательных областей для того, чтобы довести аффинность антитела против hTfR к hTfR до должного уровня.

При замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности вариательной области легкой цепи другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и еще более предпочтительно 1-2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности вариательной области легкой цепи количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и еще более предпочтительно 1-2. Также допустимо введение комбинированной мутации такого замещения и делеции аминокислот.

При добавлении одной или более аминокислот с вариательной областью легкой цепи их можно добавить внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности вариательной области легкой цепи, и в количестве предпочтительно 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и еще более предпочтительно 1-2. Также допустимо введение комбинированной мутации такого добавления, замещения и делеции аминокислот. Такая мутантная аминокислотная последовательность вариательной области легкой цепи имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной вариательной области легкой цепи предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

В частности, при замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности соответствующих CDR или соответствующих каркасных областей в легкой цепи другими аминокислотами

количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2 и еще более предпочтительно 1. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности соответствующих CDR или соответствующих каркасных областей количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2 и еще более предпочтительно 1. Также допустимо введение комбинированной мутации такого замещения и делеции аминокислот.

При добавлении одной или более аминокислот в аминокислотную последовательность соответствующих CDR или соответствующих каркасных областей в легкой цепи их добавляют внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности и в количестве предпочтительно 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2 и еще более предпочтительно 1. Также допустимо введение комбинированной мутации такого добавления, замещения и делеции аминокислот. Аминокислотная последовательность каждой из таких мутантных CDR или каркасных областей имеет гомологию с аминокислотной последовательностью соответствующих исходных CDR предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90% и еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

При замене другими аминокислотами одной или более аминокислот аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65, которая является вариабельной областью тяжелой цепи, количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и еще более предпочтительно 1-2. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и еще более предпочтительно 1-2. Также допустимо введение комбинированной мутации такого замещения и делеции аминокислот.

При добавлении одной или более аминокислот в аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, которая является вариабельной областью тяжелой цепи, их можно добавить внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, и в количестве предпочтительно 1-10, более предпочтительно 1-5, еще более предпочтительно 1-3 и еще более предпочтительно 1-2. Также допустимо введение комбинированной мутации такого добавления, замещения и делеции аминокислот. Такая мутантная аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи имеет гомологию с аминокислотной последовательностью исходной вариабельной области тяжелой цепи предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90%, еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

В частности, при замене одной или более аминокислот аминокислотной последовательности соответствующих CDR или соответствующих каркасных областей в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65, другими аминокислотами количество подлежащих замене аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2 и еще более предпочтительно 1. При делеции одной или более аминокислот аминокислотной последовательности соответствующих CDR количество подлежащих делеции аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2 и еще более предпочтительно 1. Также допустимо введение комбинированной мутации такого замещения и делеции аминокислот.

При добавлении одной или более аминокислот в аминокислотную последовательность соответствующих CDR или соответствующих каркасных областей в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65, их добавляют внутрь или на N-терминальной стороне или С-терминальной стороне аминокислотной последовательности и в количестве предпочтительно 1-5, более предпочтительно 1-3, еще более предпочтительно 1-2 и еще более предпочтительно 1. Также допустимо введение комбинированной мутации такого добавления, замещения и делеции аминокислот. Аминокислотная последовательность каждой из таких мутантных CDR имеет гомологию с аминокислотной последовательностью соответствующих исходных CDR предпочтительно не ниже чем 80%, более предпочтительно не ниже чем 90% и еще более предпочтительно не ниже чем 95%.

Кроме того, в случае, когда в аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, которая является вариабельной областью тяжелой цепи антитела против hTfR, вводят описанную выше мутацию, такую как замещение, делеция, добавление, предпочтительно, что аминокислота метионин в позиции 5 с N-терминальной стороны исходной CDR1, показанной как SEQ ID NO: 62 или 63, и аминокислота лейцин в позиции 17 с N-терминальной стороны каркасной области 3, показанной как SEQ ID NO: 64, должны быть сохранены в той же позиции, что и исходные. Кроме того, предпочтительно, что аминокислотные последовательности CDR1 и каркасной области 3 тяжелой цепи также должны быть сохранены в тех же позициях, что и исходные.

Мутацию можно вводить в обе вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи антитела против hTfR, путем комбинирования упомянутой выше мутации вариабельной области легкой цепи антитела против hTfR и упомянутой выше мутации вариабельной области тяжелой цепи антитела против hTfR.

Примеры упомянутого выше замещения одной или более аминокислот в аминокислотной последовательности вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи антитела против hTfR включают ами-

нокислоты, классифицированные на одни и те же группы, такие как ароматические аминокислоты (Phe, Trp, Tyr), алифатические аминокислоты (Ala, Leu, Ile, Val), полярные аминокислоты (Gln, Asn), основные аминокислоты (Lys, Arg, His), кислые аминокислоты (Glu, Asp), аминокислоты, имеющие гидроксильную группу (Ser, Thr).

Кроме того, в случае введения мутации в антитело против hTfR путем добавления одной или более аминокислот на его С-конце или N-конце, если при их слиянии добавленные аминокислоты расположены между антителом против hTfR и другим белком (А), добавленные аминокислоты составляют часть линкера.

В упомянутых выше предпочтительных вариантах осуществления антитела, включая гуманизированное антитело, обладающее аффинностью к hTfR, нет особых ограничений относительно аминокислотной последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи антитела против hTfR, поскольку антитело обладает специфической аффинностью к hTfR и TfR обезьяны.

Однако согласно настоящему изобретению человеческое антитело, обладающее относительно высокой аффинностью к hTfR и обладающее аффинностью к TfR как человека, так и обезьяны, одновременно, представляет собой антитело константа диссоциации которого с TfR человека предпочтительно составляет не более чем 1×10^{-10} М, более предпочтительно не более чем $2,5 \times 10^{-11}$ М, еще более предпочтительно не более чем 5×10^{-12} М и еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-12} М, а константа диссоциации которого с TfR обезьяны предпочтительно составляет не более чем 1×10^{-9} М, более предпочтительно не более чем 5×10^{-10} М и еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-10} М, например, не более чем $7,5 \times 10^{-11}$ М, в частности, при измерении описанным в примере 7 способом.

Например, константы диссоциации с TfR человека и TfR обезьяны составляют не более чем 1×10^{-10} М и не более чем 1×10^{-9} М, не более чем 1×10^{-11} М и не более чем 5×10^{-10} М, не более чем 5×10^{-12} М и не более чем 1×10^{-10} М, не более чем 5×10^{-12} М и не более чем $7,5 \times 10^{-11}$ М, не более чем 1×10^{-12} М и не более чем 1×10^{-10} М или не более чем 1×10^{-12} М и не более чем $7,5 \times 10^{-11}$ М, соответственно. В этом контексте, хотя нет особенно четкого нижнего предела константы диссоциации с TfR человека, он может составлять, например, 5×10^{-13} М или 1×10^{-13} М. Кроме того, хотя нет особенно четкого нижнего предела константы диссоциации с TfR обезьяны, он может составлять, например, 5×10^{-11} М, 1×10^{-11} М, 1×10^{-12} М и так далее. То же самое применимо, когда антителом является одноцепочечное антитело.

Конкретные варианты осуществления белка слияния между гуманизированными антителами, которое обладает аффинностью к hTfR, и другим белком (А), описанным выше, включают: белки слияния, в которых другим белком (А) является человеческая кислая α -глюкозидаза (hGAA), человеческая идуронат-2-сульфатаза (hI2S), человеческая α -L-идуронидаза (hIDUA), человеческая пальмитоил-белок тиоэстераза 1 (hPPT-1), человеческая кислая сфингомиелиназа (hASM), человеческая арилсульфатаза А (hARSA), человеческая гепаран-N-сульфатаза (hSGSH), человеческая глюкоцереброзидаза (hGBA), человеческая трипептидил-пептидаза 1 (hTPP-1), человеческая α -N-ацетилглюкозаминидаза (hNAGLU), человеческая β -глюкуронидаза (hGUSB), человеческая кислая керамидидаза (hAC), человеческая α -L-фукозидаза (hFUCAL) или α -маннозидаза (hLAMAN).

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является человеческая кислая α -глюкозидаза (hGAA), включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на ее С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGAA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на ее С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGAA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на ее С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGAA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 27,

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на ее С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGAA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29.

В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, ами-

нокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 из них, которые последовательно связаны.

В данном случае антитело, имеющее SEQ ID NO: 66 в тяжелой цепи, относится к типу IgG1, а антитело, имеющее SEQ ID NO: 68, относится к типу IgG4. Кроме того, hGAA является hGAA, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 или 56, или ее мутанты.

Более конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является человеческая кислая α -глюкозидаза (hGAA), включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с hGAA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 57, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23, и

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с hGAA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 58, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

Антитело (1) относится к типу IgG1, а антитело (2) относится к типу IgG4. Кроме того, hGAA является hGAA, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.

В упомянутом выше (1) аминокислотной последовательностью тяжелой цепи hTfR, которая включена в SEQ ID NO: 57, является последовательность, показанная как SEQ ID NO: 66. А именно, слитый белок согласно (1) выше содержит в качестве гуманизированного антитела аминокислотную последовательность легкой цепи, показанную как SEQ ID NO: 23, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, показанную как SEQ ID NO: 66. В упомянутом выше (2) аминокислотной последовательностью тяжелой цепи hTfR, которая включена в SEQ ID NO: 58, является последовательность, показанная как SEQ ID NO: 68. А именно, слитый белок согласно (2) выше содержит в качестве гуманизированного антитела аминокислотную последовательность легкой цепи, показанную как SEQ ID NO: 23, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, показанную как SEQ ID NO: 68.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является человеческая кислая α -глюкозидаза (hGAA), а гуманизированным антителом является Fab-антитело, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи Fab hTfR, связанной на ее С-терминальной стороне или N-конце и посредством линкерной последовательности с hGAA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab показана как SEQ ID NO: 61, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи Fab hTfR, связанной на ее С-терминальной стороне или N-конце и посредством линкерной последовательности с hGAA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab показана как SEQ ID NO: 61, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи Fab hTfR, связанной на ее С-терминальной стороне или N-конце и посредством линкерной последовательности с hGAA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab показана как SEQ ID NO: 61, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 27,

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи Fab hTfR, связанной на ее С-терминальной стороне или N-конце и посредством линкерной последовательности с hGAA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab показана как SEQ ID NO: 61, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29.

В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 из них, которые последовательно связаны.

Более конкретный пример белка слияния, когда другим белком (А) является человеческая кислая α -глюкозидаза (hGAA), а гуманизированным антителом является Fab-антитело, включает: белок, который состоит из участка, состоящего из тяжелой цепи Fab hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности, причем эта линкерная последовательность состоит из трех последовательно связанных аминокислотных последовательностей, каждая из которых показана как SEQ ID NO: 3, с hGAA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 89, а аминокислотная последовательность последнего

показана как SEQ ID NO: 23.

Слитый белок, где другим белком (А) является человеческая кислая α -глюкозидаза (hGAA), обладает аффинностью к TfR как человека, так и обезьяны, одновременно, и представляет собой белок константа диссоциации которого с TfR обезьяны предпочтительно составляет не более чем 1×10^{-10} М, более предпочтительно не более чем 5×10^{-11} М, константа диссоциации которого с TfR человека предпочтительно составляет не более чем 1×10^{-10} М, более предпочтительно не более чем 5×10^{-11} М, еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-11} М и еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-12} М, при измерении описанным в примере 7 способом.

Например, константы диссоциации с TfR обезьяны и TfR человека составляют не более чем 1×10^{-10} М и не более чем 1×10^{-10} М, не более чем 1×10^{-10} М и не более чем 1×10^{-11} М, не более чем 1×10^{-10} М и не более чем 1×10^{-12} М, не более чем 5×10^{-11} М и не более чем 1×10^{-11} М, не более чем 5×10^{-11} М и не более чем 1×10^{-11} М или не более чем 5×10^{-11} М и не более чем 1×10^{-12} М, соответственно. В этом контексте, хотя нет особенно четкого нижнего предела константы диссоциации с TfR обезьяны, он может составлять, например, 1×10^{-11} М, 1×10^{-12} М или 1×10^{-13} М. Хотя нет особенно четкого нижнего предела константы диссоциации с TfR человека, он может составлять, например, 1×10^{-12} М, 5×10^{-13} М или 1×10^{-13} М. То же самое также применимо, если антителом является одноцепочечное антитело.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является человеческая идуронат-2-сульфатаза (hI2S), включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hI2S, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hI2S, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hI2S, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 27,

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hI2S, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29.

В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 из них, которые последовательно связаны.

В данном случае антитело, имеющее SEQ ID NO: 66 в тяжелой цепи, относится к типу IgG1, а антитело, имеющее SEQ ID NO: 68, относится к типу IgG4.

Более конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является человеческая идуронат-2-сульфатаза (hI2S), включают: белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с hI2S, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 53, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23. В этом случае антитело относится к типу IgG1. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи hTfR, которая включена в SEQ ID NO: 53, является последовательностью, показанная как SEQ ID NO: 66. А именно, этот слитый белок содержит в качестве гуманизированного антитела аминокислотную последовательность легкой цепи, показанную как SEQ ID NO: 23, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, показанную как SEQ ID NO: 66. Антитело может относиться к типу IgG4, и в этом случае аминокислотную последовательность тяжелой цепи, показанную как SEQ ID NO: 66, можно заменить аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является человеческая идуронат-2-сульфатаза (hI2S), а гуманизированным антителом является Fab-антитело, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи Fab hTfR, связанной на ее С-терминальной стороне или N-конце и посредством линкерной последовательности с hI2S, и другого уча-

стка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab показана как SEQ ID NO: 61, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23.

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи Fab hTfR, связанной на ее C-терминальной стороне или N-конце и посредством линкерной последовательности с hI2S, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab показана как SEQ ID NO: 61, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25.

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи Fab hTfR, связанной на ее C-терминальной стороне или N-конце и посредством линкерной последовательности с hI2S, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab показана как SEQ ID NO: 61, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 27.

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи Fab hTfR, связанной на ее C-терминальной стороне или N-конце и посредством линкерной последовательности с hI2S, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab показана как SEQ ID NO: 61, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29.

В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 из них, которые последовательно связаны.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hIDUA, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его C-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hIDUA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23.

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hIDUA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25.

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его C-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hIDUA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 27, и

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его C-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hIDUA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29. В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 или 1-20 из них, которые последовательно связаны.

В данном случае антителo, имеющее SEQ ID NO: 66 в тяжелой цепи, относится к типу IgG1, а анти-телo, имеющее SEQ ID NO: 68, относится к типу IgG4. Кроме того, hIDUA является hIDUA, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 или 76, или ее мутанты.

Более конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hIDUA, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с hIDUA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 90, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, содержащий в общей сложности 42 аминокислота, который состоит из аминокислотной последовательности Gly-Ser, за которой следуют последовательно связанные восемь копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hIDUA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 91.

а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hIDUA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 92, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных трех копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hIDUA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 93, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(5) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hIDUA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 94, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(6) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hIDUA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 95, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(7) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hIDUA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 96, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(8) белок, который состоит из: участка, состоящего из hIDUA, связанной с аминокислотной последовательностью на ее С-терминальной стороне, которая состоит из последовательно связанных двух копий тяжелой цепи hTfR (Fab), имеющей на ее С-терминальной стороне линкер, состоящий из последовательно связанных шести копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 97, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23, и

(9) белок, который состоит из: участка, состоящего из hIDUA, связанной с одноцепочечным гуманизированным антителом против hTfR № 3N(2), показанным как SEQ ID NO: 98, на его С-терминальной стороне и через линкер, содержащий семь аминокислот, который состоит из аминокислотной последовательности Gly-Gly, следующей за аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, который показан как SEQ ID NO: 99.

Белки слияния (1)-(3) представляют собой белки, антитело которых относится к типу IgG1, а белки слияния (4)-(9) представляют собой белки, антитело которых относится к типу Fab.

В данном случае аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (1)-(3) показаны как SEQ ID NO: 68. А именно, упомянутые выше белки слияния (1)-(3) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. Кроме того, аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (4)-(9) показаны как SEQ ID NO: 61. А именно, упомянутые выше белки слияния (4)-(9) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого (Fab) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hPPT-1, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hPPT-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hPPT-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hPPT-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой

цепи показана как SEQ ID NO: 27, и

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hPPT-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29. В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 или 1-20 из них, которые последовательно связаны.

В данном случае антитело, имеющее SEQ ID NO: 66 в тяжелой цепи, относится к типу IgG1, а антитело, имеющее SEQ ID NO: 68, относится к типу IgG4. Кроме того, hPPT-1 является hPPT, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, или ее мутанты.

Более конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hPPT-1, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с hPPT-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 100, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hPPT-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 101, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hPPT-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 102, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hPPT-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 103, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(5) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных трех копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hPPT-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 104, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23, а

(6) белок, который состоит из: участка, состоящего из hPPT-1, связанной с аминокислотной последовательностью на ее С-терминальной стороне, которая состоит из последовательно связанных двух копий тяжелой цепи hTfR (Fab), имеющей на ее С-терминальной стороне линкер, состоящий из последовательно связанных шести копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 105, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

Белки слияния (1)-(4) представляют собой белки, антитело которых относится к типу IgG1, а белки слияния (5) и (6) представляют собой белки, антитело которых относится к типу Fab.

В данном случае аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (1)-(4) показаны как SEQ ID NO: 68. А именно, упомянутые выше белки слияния (1)-(4) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. Кроме того, аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (5) и (6) показаны как SEQ ID NO: 61. А именно, упомянутые выше белки слияния (5) и (6) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого (Fab) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является haSM, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с haSM, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-

(9) белок, который состоит из: участка, состоящего из haSM, связанной с аминокислотной последовательностью на ее С-терминальной стороне, которая состоит из последовательно связанных двух копий тяжелой цепи hTfR (Fab), имеющей на ее С-терминальной стороне линкер, состоящий из последовательно связанных шести копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 114, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

Белки слияния (1)-(4) представляют собой белки, антитело которых относится к типу IgG1, а белки слияния (5)-(9) представляют собой белки, антитело которых относится к типу Fab.

В данном случае аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (1)-(4) показаны как SEQ ID NO: 68. А именно, упомянутые выше белки слияния (1)-(4) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. Кроме того, аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (5) и (6) показаны как SEQ ID NO: 61. А именно, упомянутые выше белки слияния (5) и (6) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого (Fab) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hARSA, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hARSA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hARSA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hARSA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 27, и

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hARSA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29. В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 или 1-20 из них, которые последовательно связаны.

В данном случае антитело, имеющее SEQ ID NO: 66 в тяжелой цепи, относится к типу IgG1, а антитело, имеющее SEQ ID NO: 68, относится к типу IgG4. Кроме того, hARSA является hARSA, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, или ее мутанты.

Более конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hARSA, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с hARSA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 115, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hARSA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 116, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hARSA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 117, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислот-

ной последовательности SEQ ID NO: 3, с hARSA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 118, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(5) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных трех копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hARSA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 119, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(6) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hARSA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 120, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(7) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hARSA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 121, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(8) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hARSA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 122, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23, и

(9) белок, который состоит из: участка, состоящего из hARSA, связанной с аминокислотной последовательностью на ее С-терминальной стороне, которая состоит из последовательно связанных двух копий тяжелой цепи hTfR (Fab), имеющей на ее С-терминальной стороне линкер, состоящий из последовательно связанных шести копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 123, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

Белки слияния (1)-(4) представляют собой белки, антитело которых относится к типу IgG1, а белки слияния (5)-(9) представляют собой белки, антитело которых относится к типу Fab.

В данном случае аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (1)-(4) показаны как SEQ ID NO: 68. А именно, упомянутые выше белки слияния (1)-(4) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. Кроме того, аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (5)-(9) показаны как SEQ ID NO: 61. А именно, упомянутые выше белки слияния (5)-(9) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого (Fab) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hSGSH, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hSGSH, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hSGSH, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hSGSH, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 27, и

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hSGSH, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29. В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последова-

тельности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 или 1-20 из них, которые последовательно связаны.

В данном случае антитело, имеющее SEQ ID NO: 66 в тяжелой цепи, относится к типу IgG1, а антитело, имеющее SEQ ID NO: 68, относится к типу IgG4. Кроме того, hSGSH является hSGSH, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, или ее мутанты.

Более конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hSGSH, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с hSGSH, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 124, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hSGSH, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 125, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hSGSH, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 126, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hSGSH, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 127, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(5) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных трех копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hSGSH, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 128, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23, и

(6) белок, который состоит из: участка, состоящего из hSGSH, связанной с аминокислотной последовательностью на ее С-терминальной стороне, которая состоит из последовательно связанных двух копий тяжелой цепи hTfR (Fab), имеющей на ее С-терминальной стороне линкер, состоящий из последовательно связанных шести копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 129, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

Белки слияния (1)-(4) представляют собой белки, антитело которых относится к типу IgG1, а белки слияния (5) и (6) представляют собой белки, антитело которых относится к типу Fab.

В данном случае аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (1)-(4) показаны как SEQ ID NO: 68. А именно, упомянутые выше белки слияния (1)-(4) имеют гуманизованное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. Кроме того, аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (5) и (6) показаны как SEQ ID NO: 61. А именно, упомянутые выше белки слияния (5) и (6) имеют гуманизованное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого (Fab) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hGBA, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGBA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGBA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGBA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой

цепи показана как SEQ ID NO: 27, и

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или

N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGBA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29. В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 или 1-20 из них, которые последовательно связаны.

В данном случае антитело, имеющее SEQ ID NO: 66 в тяжелой цепи, относится к типу IgG1, а антитело, имеющее SEQ ID NO: 68, относится к типу IgG4. Кроме того, hGBA является hGBA, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, или ее мутанты.

Более конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hGBA, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с hGBA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 130, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGBA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 131, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGBA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 132, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGBA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 133, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(5) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных трех копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGBA, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 134, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23, и

(6) белок, который состоит из: участка, состоящего из hGBA, связанной с аминокислотной последовательностью на ее С-терминальной стороне, которая состоит из последовательно связанных двух копий тяжелой цепи hTfR (Fab), имеющей на ее С-терминальной стороне линкер, состоящий из последовательно связанных шести копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 135, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

Белки слияния (1)-(4) представляют собой белки, антитело которых относится к типу IgG1, а белки слияния (5) и (6) представляют собой белки, антитело которых относится к типу Fab.

В данном случае аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (1)-(4) показаны как SEQ ID NO: 68. А именно, упомянутые выше белки слияния (1)-(4) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. Кроме того, аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (5) и (6) показаны как SEQ ID NO: 61. А именно, упомянутые выше белки слияния (5) и (6) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого (Fab) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hTPP-1, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hTPP-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hTPP-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hTPP-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 27, и

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hTPP-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29. В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 или 1-20 из них, которые последовательно связаны.

В данном случае антитело, имеющее SEQ ID NO: 66 в тяжелой цепи, относится к типу IgG1, а антитело, имеющее SEQ ID NO: 68, относится к типу IgG4. Кроме того, hTPP-1 является hTPP-1, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, или ее мутанты.

Более конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hTPP-1, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с hTPP-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 136, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hTPP-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 137, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hTPP-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 138, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hTPP-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 139, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(5) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных трех копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hTPP-1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 140, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23, а

(6) белок, который состоит из: участка, состоящего из hTPP-1, связанной с аминокислотной последовательностью на ее С-терминальной стороне, которая состоит из последовательно связанных двух копий тяжелой цепи hTfR (Fab), имеющей на ее С-терминальной стороне линкер, состоящий из последовательно связанных шести копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 141, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

Белки слияния (1)-(4) представляют собой белки, антитело которых относится к типу IgG1, а белки слияния (5) и (6) представляют собой белки, антитело которых относится к типу Fab.

В данном случае аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (1)-(4) показаны как SEQ ID NO: 68. А именно, упомянутые выше белки слияния (1)-(4) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. Кроме того, аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (5) и (6) показаны как SEQ ID NO: 61. А именно, упомянутые выше белки слияния (5) и (6) имеют

терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hNAGLU, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 148, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23, и

(8) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hNAGLU, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 149, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

Белки слияния (1)-(4) представляют собой белки, антитело которых относится к типу IgG1, а белки слияния (5)-(8) представляют собой белки, антитело которых относится к типу Fab.

В данном случае аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (1)-(4) показаны как SEQ ID NO: 68. А именно, упомянутые выше белки слияния (1)-(4) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. Кроме того, аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (5)-(8) показаны как SEQ ID NO: 61. А именно, упомянутые выше белки слияния (5)-(8) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого (Fab) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hGUSB, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGUSB, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGUSB, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGUSB, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 27, и

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGUSB, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29. В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 или 1-20 из них, которые последовательно связаны.

В данном случае антитело, имеющее SEQ ID NO: 66 в тяжелой цепи, относится к типу IgG1, а антитело, имеющее SEQ ID NO: 68, относится к типу IgG4. Кроме того, hGUSB является hGUSB, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, или ее мутанты.

Более конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hGUSB, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с hGUSB, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 150, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGUSB, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 151, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGUSB, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 152, а аминокис-

лотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGUSB, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 153, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(5) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных трех копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGUSB, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 154, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(6) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGUSB, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 155, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(7) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGUSB, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 156, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23, и

(8) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGUSB, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 157, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

Белки слияния (1)-(4) представляют собой белки, антитело которых относится к типу IgG1, а белки слияния (5)-(8) представляют собой белки, антитело которых относится к типу Fab.

В данном случае аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (1)-(4) показаны как SEQ ID NO: 68. А именно, упомянутые выше белки слияния (1)-(4) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. Кроме того, аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (5)-(8) показаны как SEQ ID NO: 61. А именно, упомянутые выше белки слияния (5)-(8) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого (Fab) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hGALC, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGALC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGALC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGALC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 27, и

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hGALC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29. В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 или 1-20 из них, которые последовательно связаны.

В данном случае антитело, имеющее SEQ ID NO: 66 в тяжелой цепи, относится к типу IgG1, а антитело, имеющее SEQ ID NO: 68, относится к типу IgG4. Кроме того, hGALC является hGALC, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, или ее мутанты.

Более конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hGALC, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с hGALC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 158, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGALC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 159 а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGALC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 160, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGALC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 161, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

(5) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее C-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных трех копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGALC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 162, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(6) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGALC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 163, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

(7) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGALC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 164, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23, и

(8) блок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hGALC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 165, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

Белки слияния (1)-(4) представляют собой белки, антитело которых относится к типу IgG1, а белки слияния (5)-(8) представляют собой белки, антитело которых относится к типу Fab.

В данном случае аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (1)-(4) показаны как SEQ ID NO: 68. А именно, упомянутые выше белки слияния (1)-(4) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. Кроме того, аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (5)-(8) показаны как SEQ ID NO: 61. А именно, упомянутые выше белки слияния (5)-(8) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого (Fab) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hAC, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его C-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hAC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23.

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его C-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hAC, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность

В данном случае аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (1)-(4) показаны как SEQ ID NO: 68. А именно, упомянутые выше белки слияния (1)-(4) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. Кроме того, аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (5)-(8) показаны как SEQ ID NO: 61. А именно, упомянутые выше белки слияния (5)-(8) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого (Fab) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (A) является hFUCA1, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hFUCA1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hFUCA1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hFUCA1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 27, и

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hFUCA1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29. В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 или 1-20 из них, которые последовательно связаны.

В данном случае антитело, имеющее SEQ ID NO: 66 в тяжелой цепи, относится к типу IgG1, а антитело, имеющее SEQ ID NO: 68, относится к типу IgG4. Кроме того, hFUCA1 является hFUCA1, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, или ее мутанты.

Более конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (A) является hFUCA1, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с hFUCA1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 174, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hFUCA1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 175, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hFUCA1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 176, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hFUCA1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 177, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(5) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных трех копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hFUCA1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 178, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(6) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hFUCA1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 179, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(7) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных десяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hFUCA1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 180, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23, и

(8) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR (Fab), связанной на ее С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных 20 копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hFUCA1, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 181, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23.

Белки слияния (1)-(4) представляют собой белки, антитело которых относится к типу IgG1, а белки слияния (5)-(8) представляют собой белки, антитело которых относится к типу Fab.

В данном случае аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (1)-(4) показаны как SEQ ID NO: 68. А именно, упомянутые выше белки слияния (1)-(4) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. Кроме того, аминокислотные последовательности тяжелых цепей hTfR в упомянутых выше белках слияния (5)-(8) показаны как SEQ ID NO: 61. А именно, упомянутые выше белки слияния (5)-(8) имеют гуманизированное антитело, легкая цепь которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а тяжелая цепь которого (Fab) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hLAMAN, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hLAMAN, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hLAMAN, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hLAMAN, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 27, и

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне или N-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности с hLAMAN, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29. В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 или 1-20 из них, которые последовательно связаны.

В данном случае антитело, имеющее SEQ ID NO: 66 в тяжелой цепи, относится к типу IgG1, а антитело, имеющее SEQ ID NO: 68, относится к типу IgG4. Кроме того, hLAMAN является hLAMAN, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, или ее мутанты.

Более конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является hLAMAN, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с hLAMAN, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность первого показана как SEQ ID NO: 182, а аминокислотная последовательность последнего показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи hTfR, связанной на его С-терминальной стороне и через линкер, состоящий из последовательно связанных пяти копий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, с hLAMAN, и другого участка, состоящего из легкой цепи

аминокислотная последовательность тяжелой цепи показана как SEQ ID NO: 66 или 68, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29.

В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 из них, которые последовательно связаны.

В данном случае антитело, имеющее SEQ ID NO: 66 в тяжелой цепи, относится к типу IgG1, а антитело, имеющее SEQ ID NO: 68, относится к типу IgG4.

Конкретные примеры белка слияния, когда другим белком (А) является человеческий лизосомальный фермент, а гуманизированным антителом является Fab-антитело, включают:

(1) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи Fab hTfR, связанной на ее С-терминальной стороне или N-конце и посредством линкерной последовательности с человеческим лизосомальным ферментом, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab показана как SEQ ID NO: 61, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 23,

(2) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи Fab hTfR, связанной на ее С-терминальной стороне или N-конце и посредством линкерной последовательности с человеческим лизосомальным ферментом, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab показана как SEQ ID NO: 61, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 25,

(3) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи Fab hTfR, связанной на ее С-терминальной стороне или N-конце и посредством линкерной последовательности с человеческим лизосомальным ферментом, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab показана как SEQ ID NO: 61, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 27,

(4) белок, который состоит из: участка, состоящего из тяжелой цепи Fab hTfR, связанной на ее С-терминальной стороне или N-конце и посредством линкерной последовательности с человеческим лизосомальным ферментом, и другого участка, состоящего из легкой цепи hTfR, при этом аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab показана как SEQ ID NO: 61, а аминокислотная последовательность легкой цепи показана как SEQ ID NO: 29.

В данном случае предпочтительно, что линкерной последовательностью является последовательность, состоящая из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser,

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 1-10 из них, которые последовательно связаны.

Человеческий лизосомальный фермент, отличающийся от описанного выше, также можно получить в виде белка слияния с антителом против hTfR согласно таким же вариантам осуществления, как варианты осуществления, описанные относительно hGAA и hI2S. Примеры человеческого лизосомального фермента включают β -галактозидазу, белок-активатор GM2, β -гексозаминидазу А, β -гексозаминидазу В, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу, β -маннозидазу, галактозилцерамидазу, сапозин С, аспартилглюкозаминидазу, α -галактозидазу А, α -N-ацетилглюкозаминидазу, ацетил-КоА: α -глюкозаминид-N-ацетилтрансферазу, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат-сульфатазу, амило-1,6-глюкозидазу, сиалидазу, гиалуронидазу 1, CLN1 и CLN2, хотя ими не ограничены. Также, при слиянии белка, не являющегося лизомой, слитый белок можно получить таким же образом.

Слитый белок, где другим белком (А) является человеческий лизосомальный фермент, обладает аффинностью как к TfR человека, так и TfR обезьяны, и имеет следующую константу диссоциации при измерении описанным в примере 7 способом: константа диссоциации с TfR обезьяны: предпочтительно не более чем 1×10^{-10} М, более предпочтительно не более чем 5×10^{-11} М; а константа диссоциации с TfR человека: предпочтительно не более чем 1×10^{-10} М, более предпочтительно не более чем 5×10^{-11} М, еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-11} М, еще более предпочтительно не более чем 1×10^{-12} М.

Например, константы диссоциации с TfR обезьяны и TfR человека составляют не более чем 1×10^{-10} М и не более чем 1×10^{-10} М, не более чем 1×10^{-10} М и не более чем 1×10^{-11} М, не более чем 1×10^{-10} М и не более чем 1×10^{-12} М, не более чем 5×10^{-11} М и не более чем 1×10^{-11} М, не более чем 5×10^{-11} М и не более чем 1×10^{-11} М или не более чем 5×10^{-11} М и не более чем 1×10^{-12} М, соответственно. В этом контексте, хотя нет особенно четкого нижнего предела константы диссоциации с TfR обезьяны, он может составлять, например, 1×10^{-11} М, 1×10^{-12} М или 1×10^{-13} М. Хотя нет особенно четкого нижнего предела константы диссоциации с TfR человека, он может составлять, например, 1×10^{-12} М, 5×10^{-13} М или 1×10^{-13} М. То же самое также применимо, если антителом является одноцепочечное антитело.

Антитело против hTfR согласно настоящему изобретению можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения болезненного состояния центральной нервной системы посредством его связывания с молекулой физиологически активного белка или фармакологически активного низкомолекулярного соединения. А антитело против hTfR, конъюгированное с молекулой физиологически активного белка или фармакологически активного низкомолекулярного соединения, можно использовать в способе лечения пациента с болезненным состоянием центральной нервной системы, в котором терапевтически эффективное количество физиологически активного белка или фармакологически активного низкомолекулярного соединения вводят пациенту с заболеванием центральной нервной системы парентерально (включая внутривенную инъекцию, такую как внутривенная инфузия). Антитело против hTfR, конъюгированное с молекулой физиологически активного белка или фармакологически активного низкомолекулярного соединения, после парентерального введения, может не только попадать внутрь головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессируется hTfR. Кроме того, фармацевтическое средство можно использовать для предотвращения наступления заболевания.

В частности, так как антитело против hTfR согласно настоящему изобретению в виде конъюгата с человеческой кислотой α -глюкозидазой (hGAA) может обеспечивать прохождение hGAA через гематоэнцефалический барьер и функционирование в головном мозге, антитело можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения болезненного состояния центральной нервной системы, сопровождающего болезнь Помпе. Кроме того, антитело против hTfR, конъюгированное с hGAA, можно использовать в способе лечения пациента с болезненным состоянием при расстройстве центральной нервной системы, сопровождающем болезнь Помпе, в котором пациенту с болезнью Помпе парентерально вводят терапевтически эффективное количество антител (включая внутривенную инъекцию, такую как внутривенная инфузия). После парентерального введения антитело против hTfR, конъюгированное с hGAA, может не только попадать внутрь головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессируется hTfR. Кроме того, фармацевтическое средство можно использовать для предотвращения наступления болезненного состояния.

В частности, так как антитело против hTfR согласно настоящему изобретению в виде конъюгата с человеческой идуронат-2-сульфатазой (hI2S) может обеспечивать прохождение hI2S через гематоэнцефалический барьер и функционирование в головном мозге, антитело можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения болезненного состояния центральной нервной системы, сопровождающего синдром Хантера. Кроме того, антитело против hTfR, конъюгированное с hI2S, можно использовать в способе лечения пациента с болезненным состоянием при расстройстве центральной нервной системы, сопровождающем синдром Хантера, в котором терапевтически эффективное количество антител парентерально вводят пациенту с синдромом Хантера (включая внутривенную инъекцию, такую как внутривенная инфузия). После парентерального введения антитело против hTfR, конъюгированное с hI2S, может не только попадать внутрь головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессируется hTfR. Кроме того, фармацевтическое средство можно использовать для предотвращения наступления расстройств.

В частности, так как антитело против hTfR согласно настоящему изобретению в виде конъюгата с человеческой α -L-идуронидазой (hIDUA) может обеспечивать прохождение hIDUA через гематоэнцефалический барьер и функционирование в головном мозге, антитело можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения болезненного состояния центральной нервной системы, сопровождающего синдром Гурлера. Кроме того, антитело против hTfR, конъюгированное с hIDUA, можно использовать в способе лечения пациента с болезненным состоянием при расстройстве центральной нервной системы, сопровождающем синдром Гурлера, в котором терапевтически эффективное количество антител парентерально вводят пациенту с синдромом Гурлера (включая внутривенную инъекцию, такую как внутривенная инфузия). После парентерального введения антитело против hTfR, конъюгированное с hIDUA, может не только попадать внутрь головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессируется hTfR. Фармацевтическое средство также можно использовать для профилактики таких болезненных состояний.

Кроме того, в частности, так как антитело против hTfR согласно настоящему изобретению в виде конъюгата с человеческим лизосомальным ферментом может обеспечивать прохождение человеческого лизосомального фермента через гематоэнцефалический барьер и функционирование в головном мозге, антитело можно использовать для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения болезненного состояния центральной нервной системы, вызванного дефицитом человеческого лизосомального фермента. Кроме того, антитело против hTfR, конъюгированное с человеческим лизосомальным ферментом, можно использовать в способе лечения пациента с болезненным состоянием центральной нервной системы, вызванным дефицитом человеческого лизосомального фермента, в котором терапевтически эффективное количество антител парентерально вводят пациенту (включая внутривенную инъекцию, такую как внутривенная инфузия). Антитело против hTfR, конъюгированное с человеческим лизосомальным ферментом, после парентерального введения, может не только попадать внутрь

головного мозга, но также достигать других органов, где экспрессируется человеческий лизосомальный фермент. Кроме того, фармацевтическое средство можно использовать для предотвращения наступления болезненного состояния.

Белки, низкомолекулярное соединение и тому подобное, которые конъюгируют с антителом против hTfR согласно настоящему изобретению, можно использовать в качестве фармацевтических средств, которые должны проявлять их функции в центральной нервной системе (CNS) после парентерального введения. Такие фармацевтические средства обычно можно вводить пациентам посредством внутривенной инъекции, такой как внутривенная инъекция, подкожная инъекция, внутримышечная инъекция и тому подобное, хотя нет особых ограничений в отношении пути их введения.

Белки, низкомолекулярные соединения и тому подобное, которые конъюгируют с антителом против hTfR согласно настоящему изобретению, можно поставлять в медицинские учреждения в качестве фармацевтических средств в таких формах лиофилизированного продукта или водного препарата. В случае водного препарата их можно поставлять в виде препаратов, в которых одно из фармацевтических средств заранее растворяют в растворе, содержащем стабилизатор, буфер и изотонирующее средство, и герметично закрывают во флаконах или шприцах. Тип препаратов, герметично закрытых в шприце, обычно называется предварительно заполненным в шприц препарат. Форма предварительно заполненного в шприц препарата облегчает самостоятельное введение пациентами фармацевтического средства.

При поставке водного препарата концентрация белка, низкомолекулярного соединения и тому подобного, конъюгированного с антителом против hTfR в водном препарате, составляет, например, 1-4 мг/мл, хотя ее при необходимости нужно регулировать в соответствии с дозировкой. Когда нет особых ограничений в отношении стабилизаторов, которые должны содержаться в водном препарате, поскольку они являются фармацевтически доступными, можно предпочтительно использовать неионные поверхностно-активные вещества. Примеры таких неионных поверхностно-активных веществ включают полисорбат и полоксамер, любой из которых можно использовать отдельно или в комбинации. Среди полисорбатов предпочтительно используют полисорбат 20 и полисорбат 80. В качестве полоксамера особенно предпочтительным является полоксамер 188 (полиоксиэтилен (160) полиоксипропилен (30) гликоль). Кроме того, концентрация неионного поверхностно-активного вещества, содержащегося в водном препарате, предпочтительно составляет 0,01-1 мг/мл, более предпочтительно, 0,01-0,5 мг/мл и еще более предпочтительно 0,1-0,5 мг/мл. В качестве стабилизаторов также можно использовать аминокислоты, такие как гистидин, аргинин, метионин и глицин. При использовании в качестве стабилизатора концентрация аминокислоты в водном препарате предпочтительно составляет 0,1-40 мг/мл, более предпочтительно 0,2-5 мг/мл и еще более предпочтительно 0,5-4 мг/мл. Хотя нет особых ограничений в отношении буфера, который должен содержаться в водном препарате, поскольку он является фармацевтически доступным, предпочтительным является фосфатный буфер, а более предпочтительным является натрий-фосфатный буфер. При использовании в качестве буфера концентрация натрия фосфата предпочтительно составляет 0,01-0,04 М. pH водного препарата, отрегулированного с помощью буфера, предпочтительно составляет 5,5-7,2. Хотя нет особых ограничений в отношении изотонирующего средства, которое должно содержаться в водном препарате, поскольку оно является фармацевтически доступным, в качестве изотонирующего средства предпочтительно можно использовать натрия хлорид или маннитол отдельно или в комбинации.

Примеры

Хотя настоящее изобретение описано более подробно ниже со ссылкой на примеры, эти примеры не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Примеры 1-15 относятся к справочному примеру (антитела № 3).

Пример 1. Конструирование экспрессирующего вектора hTfR.

Используя в качестве матрицы кДНК Quick Clone человеческой селезенки (Clontech Inc.) и используя праймер hTfR5' (SEQ ID NO: 41) и праймер hTfR3' (SEQ ID NO: 42), проводили ПЦР для амплификации фрагмента гена, кодирующего рецептор трансферрина человека (hTfR). Амплифицированный фрагмент, кодирующий hTfR, расщепляли с помощью MluI и NotI, а затем вставляли между участками MluI и NotI вектора pCI-neo (Promega Inc.). Полученный таким образом вектор обозначали pCI-neo (hTfR). Затем этот вектор расщепляли с помощью MluI и NotI для вырезания фрагмента гена, кодирующего hTfR, и этот фрагмент вставляли между участками MluI и NotI pE-mIRES-GS-puro, экспрессирующего вектора, раскрытого в международной публикации WO 2012/063799 для получения экспрессирующего вектора hTfR, pE-mIRES-GS-puro (hTfR).

Пример 2. Получение рекомбинантного hTfR.

В клетки CHO-K1 посредством электропорации вводили pE-mIRES-GS-puro(hTfR), и клетки затем подвергали селекционному культивированию в среде CD OptiCHO™ (Invitrogen Inc.), содержащей метионин сульфоксимиин (MSX) и пурамицин для получения экспрессирующих рекомбинантный hTfR клеток. Экспрессирующие рекомбинантный hTfR клетки культивировали, и получали рекомбинантный hTfR.

Пример 3. Иммунизация мышей рекомбинантным hTfR Мышей иммунизировали рекомбинантным hTfR, полученным в примере 2 в качестве антигена. Иммунизацию проводили посредством внутривен-

ной или внутривенной инъекции мышам антигена.

Пример 4. Получение клеток гибридомы.

Приблизительно через одну неделю после последней инъекции селезенки мышей иссекали и гомогенизировали для выделения клеток селезенки. Полученные таким образом клетки селезенки сливали с клетками клеточной линии миеломы мышей (P3.X63.Ag8,653) полиэтиленгликолем методом. После слияния клеток клетки суспендировали в среде RPMI 1640, содержащей добавку (1X) HAT (Life Technologies Inc.) и 10% эмбриональную телячью сыворотку с ультранизким IgG (Life Technologies Inc.), и суспензию клеток распределяли на 20 96-луночных планшетов, по 200 мкл/лунку. После культивирования клеток в течение 10 дней в инкубаторе с углекислым газом (37°C, 5% CO₂), каждую лунку исследовали под микроскопом, и отбирали лунки, которые содержат одну колонию.

Когда клетки в каждой лунке почти достигали слияния, супернатант культуры собирали в качестве супернатанта культуры гибридомы и подвергали следующему процессу скрининга.

Пример 5. Скрининг вырабатывающей высокоаффинные антитела клеточной линии.

Раствор рекомбинантного hTfR (Sino Biologics Inc.) разводили 50 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 9,5-9,6) до 5 мкг/мл для получения твердофазного раствора. После добавления в каждую лунку плоскодонного 96-луночного планшета Nunc MaxiSorp™ 50 мкл твердофазного раствора (субстрат: полистирол, произв. Nunc Inc.), планшет оставляли стоять в течение одного часа при комнатной температуре, обеспечивая адгезию и иммобилизацию рекомбинантного hTfR на планшете. Твердофазный раствор выбрасывали, каждую лунку три раза промывали 250 мкл промывочного раствора (PBS, содержащий PBS-T: 0,05% Tween20), затем в каждую лунку добавляли 200 мкл блокирующего раствора (PBS, содержащий 1% BSA), и планшет оставляли стоять в течение одного часа при комнатной температуре.

Блокирующий раствор выбрасывали, и каждую лунку три раза промывали 250 мкл PBS-T. В каждую лунку добавляли 50 мкл супернатанта культуры гибридомы, и планшет оставляли стоять в течение одного часа при комнатной температуре, обеспечивая связывание содержащихся в супернатанте культуры мышинных антител против hTfR с рекомбинантным hTfR. В то же самое время в некоторые лунки в качестве контроля добавляли 50 мкл супернатанта культуры гибридомы, которая не вырабатывала мышинные антитела против hTfR. Кроме того, в лунки добавляли 50 мкл среды для культуры гибридомы, в качестве макетных лунок, кроме тех лунок, в которые добавляли супернатант культуры. Измерение проводили в режиме n=2. Затем раствор выбрасывали, и каждую лунку три раза промывали 250 мкл PBS-T.

В каждую из упомянутых выше лунок добавляли 100 мкл раствора меченых HRP козьих антител против мышинного иммуноглобулина (Promega Inc.), и планшет оставляли стоять в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем раствор выбрасывали, а каждую лунку три раза промывали 250 мкл PBS-T. В каждую лунку добавляли 50 мкл раствора хромогенного субстрата, стабилизированного TMB субстрата для пероксидазы хрена (Promega Inc.), и лунки оставляли стоять в течение 10-20 минут при комнатной температуре. Затем после добавления 100 мкл останавливающего раствора (2N серная кислота), на планшет-ридере при 450 нм измеряли поглощающую способность каждой лунки. Для каждого из супернатанта культуры и контроля, соответственно, брали средние значения двух лунок, и из каждого из средних значений, вычитали соответствующее среднее значение для двух макетных лунок, размещенных в соответствии с каждым из супернатанта культуры и контроля, обеспечивая измерение.

Четырнадцать типов клеток гибридомы, соответствующих супернатантам культуры, добавленных в лунки, которые продемонстрировали более высокие измерения, отбирали в качестве клеточных линий (вырабатывающая высокоаффинные антитела клеточная линия), которые вырабатывают антитела обладающие высокой аффинностью к hTfR (высокоаффинные антитела против hTfR). Эти четырнадцать типов клеточных линий обозначали клональная линия 1 - клональная линия14. Из этих клеточных линий выбирали клональную линию 3 и использовали в экспериментах ниже. Кроме того, антитела против hTfR, полученные с помощью клональной линии 3, обозначали как антитела против hTfR № 3.

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

Из клональной линии 3, выбранной в примере 5, получали кДНК, используя которую в качестве матрицы амплифицировали гены, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела. За счет трансляции нуклеотидной последовательности амплифицированных генов определяли соответствующие аминокислотные последовательности варибельных областей легкой цепи и тяжелой цепи для антитела против hTfR № 3, полученного с помощью клеточной линии.

Было обнаружено, что антитело против hTfR № 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, в качестве варибельной области легкой цепи, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, в качестве варибельной области тяжелой цепи. Было обнаружено, что варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или 7, в качестве CDR1; SEQ ID NO: 8 или 9 в качестве CDR2 и SEQ ID NO: 10 в качестве CDR3; а варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или 12 в качестве CDR1, SEQ ID NO: 13 или 14 в качестве CDR2 и SEQ ID NO: 15 или 16 в качестве CDR3. Однако также считалось, что CDR не ограничены CDR, которые состоят из этих аминокислотных последовательностей, но ими также могут быть области либо аминокислотных последовательностей, которые содержат любую из упомяну-

тых выше последовательностей, либо аминокислотных последовательностей, состоящих из не менее чем трех последовательных аминокислот, содержащих часть упомянутых выше последовательностей.

В табл. 1 собраны все SEQ ID NO соответствующих аминокислотных последовательностей, содержащихся в CDR1-CDR3 вариательной области легкой цепи, и CDR1-CDR3 вариательной области тяжелой цепи антитела против hTfR № 3. Однако в табл. 1 эти аминокислотные последовательности показаны только в качестве примеров и не ограничивают аминокислотную последовательность каждой CDR аминокислотными последовательностями в табл. 1, но считалось, что CDR не ограничены CDR, которые состоят из этих аминокислотных последовательностей, но ими также могут быть области либо аминокислотных последовательностей, которые содержат любую из упомянутых выше последовательностей, либо аминокислотных последовательностей, состоящих из не менее чем трех последовательных аминокислот, содержащих часть упомянутых выше последовательностей.

Таблица 1. Номера соответствующих аминокислотных последовательностей, содержащихся в CDR1-CDR3 вариательных областей легкой цепи и тяжелой цепи антитела против hTfR № 3

Антитело №	вариабельная область легкой цепи			вариабельная область тяжелой цепи		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
	3	6, 7	8, 9 10	11, 12	13, 14	15, 16

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

Аффинность антитела против hTfR к TfR человека и обезьяны измеряли на Octet RED96 (ForteBio Inc., подразделение Pall Corporation), системе для анализа взаимодействий между биомолекулами с использованием интерферометрии биослоя (BLI). Основные принципы интерферометрии биослоя кратко объяснены ниже. Когда слой биомолекулы, иммобилизованной на поверхности наконечника датчика, облучают светом с определенной длиной волны, свет отражается от двух поверхностей, одной у биомолекулы и другой у внутреннего, эталонного слоя, создающего интерферирующие световые волны. Молекула в измеряемом образце связана с биомолекулой на поверхности наконечника датчика и таким образом увеличивает толщину слоев на наконечнике датчика, что приводит к сдвигу между интерферирующими волнами. За счет измерения колебаний этого сдвига между интерферирующими волнами можно в реальном времени проводить определение количества молекул, связанных со слоем биомолекул, иммобилизованных на поверхности наконечника датчика и их кинетический анализ. Измерение проводили в общем согласно инструкции по использованию, прилагаемой к Octet RED96. В качестве TfR человека использовали рекомбинантный TfR человека (г TfR человека: Sino Biological Inc.), который имел аминокислотную последовательность внеклеточной области hTfR, т.е. цистеиновый остаток в позиции 89 от N-терминальной стороны до фенилаланина на С-конце, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, с гистидиновой меткой, присоединенной к N-концу. В качестве TfR обезьяны использовали рекомбинантный TfR обезьяны (г TfR обезьяны: Sino Biological Inc.), который имел аминокислотную последовательность внеклеточной области TfR обезьяны-крабеда, т.е. цистеиновый остаток в позиции 89 с N-терминальной стороны до фенилаланина на С-конце, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, с гистидиновой меткой, присоединенной к N-концу.

Клональную линию 3, выбранную в примере 5, разводили средой RPMI 1640, содержащей добавку (1X) NAT (Life Technologies Inc.) и 10% эмбриональную телячью сыворотку с ультра низким IgG (Life Technologies Inc.) для того, чтобы регулировать плотность клеток до приблизительно 2×10^5 клеток/мл. В 1-л коническую колбу добавляли 200 мл каждой суспензии клеток, и культивирование проводили в течение 6-7 дней во влажных окружающих условиях при 37°C, 5% CO₂ и 95% воздуха, со встряхиванием со скоростью приблизительно 70 об/мин. Для сбора супернатанта культуры культуральную среду центрифугировали, а затем фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.). Собранный таким образом супернатант культуры загружали на колонку Protein G (объем колонки: 1 мл, GE Healthcare Inc.), которую заранее уравнивали тремя объемами колонки 20 mM буфера Tris (pH 8,0), содержащего 150 mM NaCl. После промывания колонки 5 объемами колонки того же самого буфера, адсорбированные антитела элюировали 4 объемами колонки 50 mM глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 mM NaCl, и собирали элюированные фракции. Элюированные фракции доводили до pH 7,0 посредством добавления 1 М буфера Tris (pH 8,0). В описанных ниже экспериментах их использовали в качестве очищенных продуктов антител против hTfR № 3.

Очищенный продукт антител против hTfR № 3 подвергали этапам 2-кратного разведения HBS-P+ (10 mM HEPES, содержащий 150 mM NaCl, 50 мкМ EDTA и 0,05% поверхностно-активное вещество P20) для получения растворов антител 7 разных концентраций, 0,78125-50 нМ (0,117-7,5 мкг/мл). Раствор антител использовали в качестве раствора образца. г TfR обезьяны и человека, соответственно, разводили HBS-P+ для получения 25 мкг/мл растворов, которые использовали в качестве раствора г TfR человека-ECD (Histag) и раствора г TfR-ECD обезьяны (Histag), соответственно.

Каждый из полученных выше растворов образцов добавляли посредством этапов 2-кратного разведения, 200 мкл/лунку, в 96-луночный планшет, черный (Greiner Bio-One Inc.). Каждый из полученных выше растворов г TfR-ECD человека (Histag) и растворов г TfR-ECD обезьяны (Histag) добавляли, 200

мкл/лунку, в заданные лунки. В соответствующие лунки для исходного уровня, диссоциации и промывания добавляли HBS-P+, 200 мкл/лунку. В лунки для регенерации добавляли 10 mM глицин-HCl (pH 1,7), 200 мкл/лунку. В лунки для активации добавляли 0,5 mM раствора NiCl_2 , 200 мкл/лунку. Планшет и биодатчик (Biosensor/Ni-NTA: ForteBio Inc., подразделение Pall Corporation) устанавливали в предписанные позиции Octet RED96.

Octet RED96 использовали в условиях, показанных в табл. 2 ниже, для сбора данных, по которым затем, используя программное обеспечение для анализа, прилагаемое к Octet RED96, и подгоняя кривую реакции связывания к модели связывания 1:1 или модели связывания 2:1, измеряли константу скорости ассоциации (k_{on}) и константу скорости диссоциации (k_{off}) антител против hTfR с r TfR человека и r TfR обезьяны, и рассчитывали константу диссоциации (K_D). Измерение проводили при 25-30°C.

Таблица 2. Рабочие условия Octet RED96

	Стадия	Время контакта (сек)	Скорость (об/мин)	Пороговый уровень
1	Исходный уровень 1	60	1000	-
2	Загрузка	600	1000	1, 5-2, 0
3	Исходный уровень 2	60	1000	-
4	Ассоциация	180	1000	-
5	Диссоциация	540	1000	-
6	Регенерация	5	1000	-
7	Промывание	5	1000	-
Стадии 6-7 повторяли 6-7 раз				
8	Активация	60	1000	-
Стадии 1-8 повторяли до измерения всех образцов				

Табл. 3 показывает результаты измерения константы скорости ассоциации (k_{on}), константы скорости диссоциации (k_{off}) антител против hTfR № 3 и константы диссоциации (K_D) с TfR человека и TfR обезьяны.

Таблица 3. Аффинность антител против hTfR № 3 для TfR человека и TfR обезьяны

	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
TfR человека	$6,53 \times 10^5$	$<1,0 \times 10^{-7}$	$<1,0 \times 10^{-12}$
TfR обезьяны	$3,89 \times 10^5$	$<1,0 \times 10^{-7}$	$<1,0 \times 10^{-12}$

В результате измерения аффинности антител против hTfR с TfR человека константа диссоциации антител против hTfR № 3 с TfR человека составляла не более чем 1×10^{-12} M, а константа диссоциации с TfR обезьяны составляла не более чем 1×10^{-12} M. Результат показывает, что антитело против hTfR № 3 представляет антитело, имеющее высокую аффинность не только к TfR человека, но также к TfR обезьяны.

Пример 7-2. Оценка переноса антител против hTfR в головной мозг, используя мышей.

Затем проводили оценку переноса в головной мозг через BBB для антител против hTfR № 3 посредством использования нокаутированных по hTfR мышей (мышей hTfR-KI), у которых ген, кодирующий внеклеточную область рецептора трансферрина мышей был заменен геном, кодирующим внеклеточную область рецептора трансферрина человека. Мышей hTfR-KI получали посредством способа, в целом описанного ниже. Кроме того, в качестве антител против hTfR № 3 использовали очищенные полученные в примере 7 продукты.

Химически синтезировали фрагмент ДНК, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 45, в котором ген устойчивости к неомицину, фланкированный последовательностями loxP, помещали на 3'-стороне кДНК, кодирующей химерный hTfR, внутриклеточная область которого состояла из аминокислотной последовательности мышиного TfR, а внеклеточная область состояла из аминокислотной последовательности человеческой hTfR последовательности. Этот фрагмент ДНК обычным способом вставляли в направленный вектор, имеющий в качестве последовательности 5'-плеча нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 46, а в качестве последовательности 3'-плеча нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 47, и конструкцию вводили в мышинные ES клетки посредством электропорации. Мышинные ES клетки, в которые был введен ген, подвергали селекционному культивированию в среде в присутствии неомицина для селекции тех мышинных ES клеток, в которых направленный вектор был встроен в хромосому через гомологичную рекомбинацию. Полученные таким образом рекомбинантные мышинные ES клетки инъецировали в эмбрионы ICR мышей на стадии 8 клеток (эмбрионы-хозяева), и полученные таким образом эмбрионы имплантировали псевдобеременным мышам (мышам-реципиентам), которые были получены посредством спаривания с мышами, подвергнутыми вазолигатуре. Полученное потомство (химерных мышей) обследовали на цвет их шерсти, и отбирали тех мышей, которые имели более высокую долю белой шерсти в их общем волосяном покрове, т.е. тех мышей, у ко-

торых ES клетки вносили большой вклад в развитие отдельных организмов. Каждую из этих химерных мышей спаривали с ICR мышами для получения мышей F1. Отбирали мышей F1 с белой шерстью, анализировали ДНК, выделенную из ткани их хвостов, и тех мышей, у которых ген рецептор трансферрина мышей в их хромосомах был заменен химерным hTfR, относили к мышам hTfR-KI.

Очищенный продукт антител против hTfR № 3 флуоресцентно метили флуоресцинизоцианатом (FITC), используя Fluorescein Labeling Kit-NH2 (Dojindo Laboratories) согласно приложенной инструкции. Получали раствор PBS, содержащий флуоресцентно меченые FITC антитела. Раствор PBS антител внутривенно инъецировали мышам hTfR-KI (самец, в возрасте 10-12 недель) с дозировкой антител против hTfR 3 мг/кг. В качестве контроля, раствор PBS, содержащий мышиный IgG1 (Sigma Inc.), флуоресцентно меченый FITC таким же образом, как описано выше, внутривенно инъецировали мышам hTfR-KI (самец, в возрасте 10-12 недель) в дозе 3 мг/кг. Приблизительно через восемь часов после внутривенной инъекции все тело промывали физиологическим солевым раствором, и получали головной мозг (часть, включающую большой мозг и мозжечок). Вырезанный таким образом головной мозг взвешивали (сырая масса), а затем ткани головного мозга гомогенизировали с помощью T-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.), содержащего смесь ингибиторов протеаз (Sigma Inc.). Гомогенат центрифугировали, супернатант собирали, и количество флуоресцентно меченых FITC антител, содержащихся в супернатанте, измеряли следующим образом. Сперва в каждую лунку планшета с высокой степенью связывания (Meso Scale Diagnostics Inc.) добавляли 10 мкл антител против FITC (Bethyl Inc.) и оставляли стоять в течение одного часа для того, чтобы иммобилизовать их на планшете. Затем планшет блокировали посредством добавления в каждую лунку 150 мкл блокирующего буфера SuperBlock в PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) и встряхивания планшета в течение одного часа. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл супернатанта гомогената тканей головного мозга, и планшет встряхивали в течение одного часа. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл антимышиных антител (Козьих) SULFO-TAG (Meso Scale Diagnostics Inc.), и встряхивание продолжали в течение одного часа. Затем в каждую лунку добавляли 150 мкл буфера считывания T (Meso Scale Diagnostics Inc.), и величину люминесценции из каждой лунки считывали на ридере Sector™ Imager 6000. Количество антител против hTfR, содержащихся на один грамм головного мозга (сырая масса) (концентрация антител против hTfR в тканях головного мозга) рассчитывали посредством получения стандартной кривой на основе измерений стандартных образцов, содержащих известные концентрации флуоресцентно меченых FITC антител против hTfR, а затем интерполируя измерение каждого из образцов со ссылкой на стандарт. Результаты показаны в табл. 4.

Концентрация антител против hTfR № 3 в тканях головного мозга была приблизительно в 27,8 раз больше, чем концентрация в контроле. Результат означает, что антитела против hTfR № 3 проходят в головной мозг, активно проходя через BBB.

Таблица 4. Концентрация антител против hTfR в тканях головного мозга

Антитела №	Ткани головного мозга (мкг/г сырой массы)	Относительное значение к контролю
Контроль	0,003	1
3	0,0833	27,8

Пример 8. Фармакокинетический анализ антител против hTfR у обезьяны.

Антитело против hTfR № 3 вводили внутривенно один раз самцу обезьяны-крабоведа в дозировке 5,0 мг/кг, а через 8 часов после введения проводили промывание всего тела физиологическим солевым раствором. В качестве отрицательного контроля обезьяну, которая не получала антител против hTfR, таким же образом подвергали промыванию всего тела. После промывания иссекали ткани головного мозга, включая продолговатый мозг. Используя ткани головного мозга измеряли концентрацию антител против hTfR, и проводили иммуногистохимическое окрашивание. Используемыми антителами против hTfR № 3 были продукты очистки антител, описанных в примере 7.

Измерение концентрации антител против hTfR в тканях головного мозга проводили, в значительной степени следуя описанной ниже методике. Собранные ткани головного мозга делили на большой мозг, мозжечок, гиппокамп и продолговатый мозг, и их, соответственно, гомогенизировали буфером RIPA (Wako Pure Chemical Industries Inc.), содержащим смесь ингибиторов протеаз (Sigma-Aldrich Inc.), и центрифугировали для сбора супернатанта. В лунки планшета с высокой степенью связывания (Meso Scale Diagnostics Inc.) добавляли аффинно очищенные козы антимышиные IgG Fcγ pAb (Jackson ImmunoResearch Inc.), 10 мкл каждого, и планшет оставляли стоять в течение одного часа для иммобилизации антител. Затем планшет блокировали посредством добавления в каждую лунку 150 мкл блокирующего буфера SuperBlock в PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) и встряхивали в течение одного часа. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл супернатанта гомогената тканей головного мозга, и планшет встряхивали в течение одного часа. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл аффинно очищенных козьих антимышиных IgG Fab-Biotin (Jackson ImmunoResearch Inc.), и встряхивание продолжали в течение одного часа. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл стрептавидина SULFO-Tag (Meso Scale Diagnostics Inc.), и встряхивание продолжали в течение 30 минут. В каждую лунку добавляли 150 мкл буфера считывания T (Meso Scale

Diagnostics Inc.), и величину люминесценции из каждой лунки считывали на ридере Sector™ Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics). Количество антител против hTfR, содержащихся на один грамм головного мозга (сырая масса) (концентрацию антител против hTfR в тканях головного мозга) рассчитывали посредством получения стандартной кривой на основе измерения стандартных образцов, содержащих известные концентрации антител против hTfR, а затем интерполируя измерение каждого из образцов со ссылкой на стандарт.

Результат измерения концентрации антител против hTfR в тканях головного мозга показан в табл. 5. Наблюдали, что антитела против hTfR № 3 накапливаются во всех частях из большого мозга, мозжечка, гиппокампа и продолговатого мозга. Эти результаты демонстрируют, что антитела против hTfR № 3 обладали свойством проходить через гематоэнцефалический барьер и накапливаться в тканях головного мозга, и показывают, что посредством связывания этих антител с фармацевтическим средством, которое необходимо доставить для функционирования в тканях головного мозга, можно обеспечить эффективное накопление этих фармацевтических средств в тканях головного мозга.

Таблица 5. Концентрация антител против hTfR в тканях головного мозга (мкг/г сырой массы)

Антитело №	большой мозг	мозжечок	гиппокамп	шейный отдел спинного мозга
3	0,72	0,6	0,33	0,31

Иммуногистохимическое окрашивание антител против hTfR в этих тканях головного мозга проводили, в целом следуя описанным ниже методикам. Собранные ткани быстро замораживали до -80°C в Tissue-Tek Cryo 3DM (Sakura Finetek Inc.) для получения замороженных блоков тканей. Замороженные блоки нарезали на 4-мкм срезы, которые накладывали на покрытые MAS предметные стекла (Matsunami Glass Inc.). Срезы тканей вводили в реакцию с 4% параформальдегидом (Wako Pure Chemical Industries Inc.) в течение 5 минут при 4°C и фиксировали на предметных стеклах. Затем срезы тканей вводили в реакцию с раствором метанола, содержащим 0,3% перекись водорода (Wako Pure Chemical Industries Inc.) в течение 30 мин. Для инактивации собственных пероксидаз. Затем предметные стекла блокировали посредством реакции с блокирующим буфером SuperBlock в PBS в течение 30 мин. При комнатной температуре. Затем срезы тканей вводили в реакцию с антителами против тяжелой и легкой цепи IgG мышей (Bethyl Laboratories Inc.) в течение одного часа при комнатной температуре. Срезам тканей обеспечивали возможность изменения цвета с помощью субстрата DAB (3,3'-диаминобензидин, Vector Laboratories Inc.), доокрашивали раствором гематоксилина Майера (Merck Inc.), обезвоживали, очищали, укладывали и рассматривали под микроскопом.

На фиг. 1 представлен результат иммуногистохимического окрашивания антител против hTfR в коре головного мозга. В коре головного мозга обезьян, которым вводили антитела против hTfR № 3, наблюдали специфическое окрашивание кровеносных сосудов (фиг. 1b). Кроме того, также наблюдали специфическое обширное окрашивание области паренхимы головного мозга вне кровеносных сосудов. В отличие от этого, в коре головного мозга контрольной обезьяны, которой не вводили антитела против hTfR, окрашивание не наблюдалось, указывая, что фонового окрашивания почти не было (фиг. 1a).

На фиг. 2 представлен результат иммуногистохимического окрашивания антител против hTfR в гиппокампе. В коре головного мозга обезьян, которым вводили антитела против hTfR № 3, наблюдали специфическое окрашивание кровеносных сосудов (фиг. 2b). Кроме того, также наблюдали специфическое окрашивание нервоподобных клеток, а также наблюдали специфическое и обширное окрашивание области паренхимы головного мозга вне кровеносных сосудов. С другой стороны, окрашивание не наблюдалось в гиппокампе контроля без введения антител против hTfR, указывая, что фонового окрашивания почти не было (фиг. 2a).

На фиг. 3 представлен результат иммуногистохимического окрашивания антител против hTfR в мозжечке. В коре головного мозга обезьян, которым вводили антитела против hTfR № 3, наблюдали специфическое окрашивание кровеносных сосудов (фиг. 3b). Кроме того, также наблюдали специфическое окрашивание клеток Пуркинью. В отличие от этого, окрашивание не наблюдалось в мозжечке контроля без введения антител против hTfR, указывая, что фонового окрашивания почти не было (фиг. 3a).

Из приведенных выше результатов иммуногистохимического окрашивания большого мозга, гиппокампа и мозжечка было обнаружено, что антитела против hTfR № 3 могут связываться с hTfR, находящимися на эндотелии кровеносных сосудов головного мозга, а после связывания с hTfR они проходят через гематоэнцефалический барьер и переходят в паренхиму головного мозга, а дальше из паренхимы головного мозга в нервоподобные клетки в гиппокампе, и поглощаются клетками Пуркинью в мозжечке.

Пример 9. Получение гуманизированных антител против hTfR.

Проводили гуманизацию аминокислотной последовательности, содержащейся в вариабельных областях легкой цепи и тяжелой цепи антитела против hTfR № 3. Таким образом, получали гуманизированную вариабельную область легкой цепи, имеющую одну из аминокислотных последовательностей, показанных как SEQ ID NO: 17 - SEQ ID NO: 22, и гуманизированную вариабельную область тяжелой цепи, имеющую одну из аминокислотных последовательностей, показанных как SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 36.

Пример 10. Получение генов, кодирующих гуманизированные антитела против hTfR.

Для упомянутых выше антител против hTfR № 3 искусственно синтезировали фрагменты ДНК, которые содержали ген, кодирующий полноразмерную легкую цепь и тяжелую цепь, имеющие переменные области легкой цепи и тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR, соответственно. При этом добавляли последовательности MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, в этом порядке от 5' конца, на 5' стороне гена, кодирующего полноразмерную легкую цепь, а на 3' стороне добавляли последовательность NotI. И добавляли последовательности MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, в этом порядке от 5' конца, на 5' стороне гена, кодирующего полноразмерную тяжелую цепь, а на 3' стороне добавляли последовательность NotI. Введенный выше лидерный пептид предназначен для функционирования в качестве сигнала секреции при экспрессии легкой цепи и тяжелой цепи гуманизированного антитела в клетках млекопитающих в качестве клеток-хозяев для того, чтобы секретировать из клеток легкую цепь и тяжелую цепь.

Для легкой цепи антитела против hTfR № 3 синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 24), который содержал ген, кодирующий полноразмерную легкую цепь (легкую цепь гуманизированного антитела против hTfR № 3), состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, которая имела в переменной области аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В отношении легкой цепи антитела против hTfR № 3, также синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 26), кодирующий полноразмерную аминокислотную последовательность легкой цепи (легкой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3-2), состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25, которая имела в переменной области аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 28), кодирующий полноразмерную аминокислотную последовательность легкой цепи (легкой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3-3), состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, которая имела в переменной области аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 30), кодирующий полноразмерную аминокислотную последовательность легкой цепи (легкой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3-4), состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29, которая имела в переменной области аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

Для тяжелой цепи антитела против hTfR № 3 синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 38), который кодировал полноразмерную тяжелую цепь (тяжелую цепь гуманизированного антитела против hTfR № 3), состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37, которая имела в переменной области аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. Тяжелой цепью гуманизированного антитела против hTfR, кодируемой фрагментом ДНК, показанным как SEQ ID NO: 38, является IgG1.

Кроме того, для тяжелой цепи антитела против hTfR № 3 также синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 40), кодирующий полноразмерную аминокислотную последовательность тяжелой цепи (тяжелой цепи IgG4 гуманизированного антитела против hTfR № 3), состоящей из аминокислотной последовательности SEQ NO: 39, которая имела в переменной области аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

Тяжелой цепью гуманизированного антитела против hTfR, кодируемой фрагментом ДНК, показанным как SEQ ID NO: 40, является IgG4.

Пример 11. Конструирование экспрессирующего вектора гуманизированного антитела против hTfR.

Вектор pEF/myc/nuc (Invitrogen Inc.) расщепляли с помощью KpnI и NcoI для вырезания области, содержащей промотор EF-loc и его первый интрон, и это была T4 ДНК полимеразы с тупыми концами. Область, содержащую энхансер/промотор CMV и интрон, удаляли из pCI-neo (Invitrogen Inc.) посредством ее расщепления BglII и EcoRI, а остальным фрагментом, оставшимся таким образом, была T4 ДНК полимеразы с тупыми концами. Для получения вектора pE-neo в нее вставляли упомянутую выше область, содержащую промотор EF-1α и его первый интрон. Этот вектор, pE-neo, расщепляли с помощью SfiI и BstXI для удаления области приблизительно 1 kb, содержащей ген устойчивости к неомицину. ПЦР проводили с использованием в качестве матрицы pcDNA3.1/Hygro(+)(Invitrogen) и с использованием праймера Hyg-Sfi5' (SEQ ID NO: 43) и праймера Hyg-BstX3' (SEQ ID NO: 44) для амплификации гена гидромицина. Для получения вектора pE-hygr амплифицированный таким образом ген гидромицина расщепляли с помощью SfiI и BstXI и вставляли в упомянутый выше вектор pE-neo, из которого был удален ген устойчивости к неомицину.

Векторы pE-hygr и pE-neo расщепляли с помощью как MluI, так и NotI. Фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 24), кодирующий легкую цепь гуманизированного антитела против hTfR № 3, и фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 38), кодирующий тяжелую цепь антитела, оба синтезированы в примере 10, расщепляли с помощью MluI и NotI, и полученные таким образом фрагменты вставляли в вектор pE-hygr и вектор pE-neo, соответственно, между их участками MluI и NotI. Полученные таким образом векторы в описанных ниже экспериментах использовали в качестве экспрессирующего вектора для легкой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3, pE-hygr(LC3), и в качестве экспрессирующего вектора для тяжелой цепи антитела, pE-neo (HC3).

Кроме того, в отношении легкой цепи антитела против hTfR № 3, следующие фрагменты, синтезированные в примере 10, а именно:

фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 26), кодирующий легкую цепь гуманизированного антитела против hTfR № 3-2,

фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 28), кодирующий легкую цепь гуманизированного антитела против hTfR № 3-3, и

фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 30), кодирующий легкую цепь гуманизированного антитела против hTfR № 3-4,

расщепляли с помощью MluI и NotI и вставляли в вектор pE-hygr между его участками MluI и NotI для получения

pE-hygr (LC3-2), экспрессирующего вектора для легкой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3-2,

pE-hygr (LC3-3), экспрессирующего вектора для легкой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3-3, а

pE-hygr (LC3-4), экспрессирующего вектора для легкой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3-4, соответственно.

Кроме того, таким же образом, как описано выше в отношении тяжелой цепи антитела против hTfR № 3, фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 40), кодирующий тяжелую цепь IgG4 гуманизированного антитела против hTfR № 3, синтезированную в примере 10, расщепляли с помощью MluI и NotI и вставляли в вектор pE-neo между его участками MluI и NotI для получения pE-neo (HC3-IgG4), экспрессирующего вектора для тяжелой цепи IgG4 гуманизированного антитела против hTfR № 3.

Пример 12. Получение клеток для экспрессии гуманизированных антител против hTfR.

Клетки CHO (CHO-K1: купленные у американской коллекции типовых культур) трансформировали с помощью pE-hygr(LC3), вектора для экспрессии легкой цепи, и pE-neo(HC3), вектора для экспрессии тяжелой цепи, и тот и другой получали в примере 11, следующим образом, используя GenePulser (Bio-Rad Inc.). Трансформацию клеток в целом проводили следующим образом. Клетки CHO-K1, 5×10^5 , высевали в 3,5-см чашку для культивирования, содержащую среду CD OptiCHO™ (Life Technologies Inc.), и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. Среду заменяли средой Opti-MEM™ I (Life Technologies Inc.), и клетки суспендировали при плотности 5×10^6 клеток/мл. Брали одну сотую мкл суспензии клеток, в которую добавляли 5 мкл каждого из раствора pE-hygr (LC3) и раствора плазмидной ДНК pE-neo(HC3), оба разводили средой Opti-MEM™ I до 100 мкг/мл. Эти плазмиды вводили в клетки посредством электропорации, используя GenePulser (Bio-Rad Inc.). Затем клетки культивировали в течение ночи в условиях 37°C, 5% CO₂ и подвергали селекционному культивированию в среде D OptiCHO™, дополненной 0,5 мг/мл гидромицина и 0,8 мг/мл G418.

Затем клетки, отобранные выше посредством селекционного культивирования, высевали на 96-луночные планшеты таким образом, чтобы посеять не более чем одну клетку на лунку посредством предельного разведения. Затем клетки культивировали в течение приблизительно 10 дней таким образом, чтобы образовались моноклональные колонии. Собирали соответствующие супернатанты культуры лунок, в которых образовалась моноклональная колония, количество гуманизированных антител, содержащихся в супернатантах культур, определяли посредством ELISA, и отбирали клеточные линии с высокой экспрессией гуманизированных антител.

Упомянутый выше ELISA проводили в общем следующим образом. В каждую лунку 96-луночных микротитровальных планшетов (Nunc Inc.) добавляли 100 мкл раствора козьих поликлональных антител против IgG человека, разведенных 0,05 М натриево бикарбонатного буфера (pH 9,6) до 4 мкг/мл, и планшет оставляли стоять в течение по меньшей мере одного часа при комнатной температуре для того, чтобы обеспечить адсорбцию антител планшетами. Затем после промывания лунок три раза PBS-T в каждую лунку добавляли 200 мкл блокирующего буфера Starting Block (PBS) (Thermo Fisher Scientific Inc.), и планшеты оставляли стоять в течение 30 минут при комнатной температуре. После промывания каждой лунки PBS-T три раза в каждую лунку добавляли супернатант культуры или стандартный продукт IgG человека, который был разведен PBS, дополненным 0,5% BSA и 0,05% Tween20 (PBS-BT) до нужных концентраций, в количестве 100 мкл, и планшеты оставляли стоять в течение по меньшей мере одного часа при комнатной температуре. После промывания планшетов три раза PBS-T в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора меченых HRP поликлональных антител против IgG человека, который был разведен PBS-BT, и планшеты оставляли стоять в течение по меньшей мере одного часа при комнатной температуре. После промывания лунок три раза PBS-T в каждую лунку добавляли 0,4 мг/мл о-фенилендиамина в цитратно-фосфатном буфере (pH 5,0) в количестве 100 мкл, и лунки оставляли стоять в течение 8-20 минут при комнатной температуре. Затем для завершения реакции в каждую лунку добавляли 1 моль/л серной кислоты в количестве 100 мкл, и измеряли поглощающую способность для каждой лунки при 490 нм, используя 96-луночный планшет-ридер. Клетки, соответствующие лункам, которые демонстрировали упомянутые выше измерения, относили к клеточной линии с высокой экспрессией для гуманизированных антител против hTfR № 1. Их обозначали, как экспрессирующая антитела № 3 кле-

точная линия.

Кроме того, таким же образом клетки СНО трансформировали с помощью экспрессирующего вектора легкой цепи рЕ-hygr (LC3-2) и экспрессирующего вектора тяжелой цепи рЕ-нео(НС3), и тот и другой получали в примере 11, и получали клеточную линию с высокой экспрессией для гуманизированных антител против hTfR № 3-2. Их обозначали экспрессирующая антитела № 3-2 клеточная линия.

Кроме того, таким же образом клетки СНО трансформировали с помощью экспрессирующего вектора легкой цепи рЕ-hygr (LC3-3) и экспрессирующего вектора тяжелой цепи рЕ-нео (НС3), и тот и другой получали в примере 11, и получали клеточную линию с высокой экспрессией для гуманизированных антител против hTfR № 3-3. Их обозначали экспрессирующая антитела № 3-3 клеточная линия.

Кроме того, таким же образом клетки СНО трансформировали с помощью экспрессирующего вектора легкой цепи рЕ-hygr (LC3-4) и экспрессирующего вектора тяжелой цепи рЕ-нео (НС3), и тот и другой получали в примере 11, и получали клеточную линию с высокой экспрессией для гуманизированных антител против hTfR № 3-4. Их обозначали экспрессирующая антитела № 3-4 клеточная линия.

Кроме того, таким же образом клетки СНО трансформировали с помощью экспрессирующего вектора легкой цепи рЕ-hygr(LC3) и экспрессирующего вектора тяжелой цепи рЕ-нео (НС3-IgG4), и тот и другой получали в примере 11, и получали клеточную линию с высокой экспрессией для гуманизированных антител против hTfR № 3 (IgG4). Их обозначали экспрессирующая антитела № 3 (IgG4) клеточная линия.

Кроме того, таким же образом клетки СНО трансформировали с помощью экспрессирующего вектора легкой цепи рЕ-hygr (LC3-2) и экспрессирующего вектора тяжелой цепи рЕ-нео (НС3-IgG4), и тот и другой получали в примере 11, и получали клеточную линию с высокой экспрессией для гуманизированных антител против hTfR № 3-2 (IgG4). Их обозначали экспрессирующая антитела № 3-2 (IgG4) клеточная линия.

Пример 13. Очистка гуманизированных антител против hTfR.

Экспрессирующую антитела № 3 клеточную линию, экспрессирующую антитела № 3-2 клеточную линию, экспрессирующую антитела № 3-3 клеточную линию и экспрессирующую антитела № 3-4 клеточную линию, полученные в примере 12, соответственно, разводили средой CD OptiCHO™ до плотности приблизительно 2×10^5 клеток/мл. Суспензии клеток, 200 мл, добавляли в коническую колбу 1 л, и культивировали в течение 6-7 дней во влажных окружающих условиях при 37°C, 5% CO₂, 95% воздуха со встряхиванием со скоростью приблизительно 70 об/мин. Для получения супернатанта культуры каждый супернатант культуры собирали посредством центрифугирования и фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.). В каждый полученный таким образом супернатант культуры добавляли пять объемов 20 мМ буфера Tris (pH 8,0), содержащего 150 мМ NaCl, и загружали на колонку Protein A (объем колонки: 1 мл, Bio-Rad Inc.), которую заранее уравнивали тремя объемами колонки 20 мМ буфера Tris (pH 8,0), содержащего 150 мМ NaCl. Затем колонку промывали пятью объемами колонки того же самого буфера, и адсорбированные гуманизированные антитела элюировали четырьмя объемами колонки 50 мМ глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 мМ NaCl, и собирали элюированные фракция. Элюированные фракции добавляли и нейтрализовали 1 М буфера Tris (pH 8,0) и использовали в качестве препарата очищенных антител.

В сказанном выше очищенные антитела из супернатанта культуры экспрессирующей антитела № 3 клеточной линии обозначали гуманизированные антитела против hTfR № 3. Очищенные антитела из супернатанта культуры экспрессирующей антитела № 3-2 клеточной линии обозначали гуманизированные антитела против hTfR № 3-2. Очищенные антитела из супернатанта культуры экспрессирующей антитела № 3-3 клеточной линии обозначали гуманизированные антитела против hTfR № 3-3. Очищенные антитела из супернатанта культуры экспрессирующей антитела № 3-4 клеточной линии обозначали гуманизированные антитела против hTfR № 3-4.

Кроме того, экспрессирующую антитела № 3(IgG4) клеточную линию и экспрессирующую антитела № 3-2 (IgG4) клеточную линию, полученные в примере 12, также культивировали таким же образом, как описано выше, и из их супернатантов культуры получали очищенные гуманизированные антитела против hTfR № 3(IgG4) и гуманизированные антитела против hTfR № 3-2 (IgG4), соответственно. Два этих антитела использовали в фармакокинетическом анализе, используя обезьян, описанных в примере 15.

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

Аффинность гуманизированных антител против hTfR, полученных в примере 13, к TfR человека и обезьяны измеряли посредством способа, описанного в примере 7. Табл. 6 показывает результат измерения константы скорости ассоциации (kon), константы скорости диссоциации (koff) и константы диссоциации (K_D) гуманизированных антител против hTfR № 3-3-4 (соответствующих № 3-3-4, соответственно, в таблице) с TfR человека.

Таблица 6. Аффинность гуманизированных антител против hTfR с TfR человека

Антитело №	Kon ($M^{-1}s^{-1}$)	Koff (s^{-1})	k_D (M)
3	$1,19 \cdot 10^6$	$<1,0 \cdot 10^{-7}$	$<1,0 \cdot 10^{-12}$
3-2	$6,06 \cdot 10^5$	$1,45 \cdot 10^{-5}$	$<2,39 \cdot 10^{-11}$
3-3	$6,00 \cdot 10^5$	$1,25 \cdot 10^{-5}$	$<2,09 \cdot 10^{-11}$
3-4	$1,01 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^{-7}$	$<1,0 \cdot 10^{-12}$

В табл. 7 показан результат измерения константы скорости ассоциации (kon), константы скорости диссоциации (koff) и константы диссоциации (k_D) гуманизированных антител против hTfR № 3-3-4 (соответствующих № 3-3-4, соответственно, в таблице) с TfR обезьяны.

Таблица 7

Антитело №	Kon ($M^{-1}s^{-1}$)	Koff (s^{-1})	k_D (M)
3	$6,03 \cdot 10^5$	$6,76 \cdot 10^{-4}$	$1,12 \cdot 10^{-9}$
3-2	$4,95 \cdot 10^5$	$8,76 \cdot 10^{-4}$	$1,77 \cdot 10^{-9}$
3-3	$4,88 \cdot 10^5$	$9,32 \cdot 10^{-4}$	$1,91 \cdot 10^{-9}$
3-4	$5,19 \cdot 10^5$	$1,35 \cdot 10^{-4}$	$2,60 \cdot 10^{-10}$

Результат измерения аффинности гуманизированных антител против hTfR № 3-3-4 к TfR человека показал, что константа диссоциации между гуманизированными антителами против hTfR № 3 и 3-4 и TfR человека была менее чем $1 \cdot 10^{-12}$ М (табл. 6). А константа диссоциации между гуманизированными антителами против hTfR № 3-2 и 3-3 и TfR человека была $2,39 \cdot 10^{-11}$ М и $2,09 \cdot 10^{-11}$ М, соответственно. В то же самое время константа диссоциации между предварительно гуманизированными антителами против hTfR (антитела № 3), соответствующими этим антителам и TfR человека была: $1 \cdot 10^{-12}$ М (табл. 3). Эти результаты демонстрируют, что высокая аффинность этих предварительно гуманизированных антител против hTfR к TfR человека сохранялась после гуманизации антител.

Затем глядя на результат измерения аффинности гуманизированных антител против hTfR к TfR обезьяны, в отношении гуманизированных антител против hTfR № 3-3-4, хотя константа диссоциации антител против hTfR № 3, соответствующих им предварительно гуманизированных антител, с TfR обезьяны была менее чем $1 \cdot 10^{-12}$ М, их константа диссоциации после гуманизации была от $2,60 \cdot 10^{-10}$ М до $1,91 \cdot 10^{-9}$ М, показывая снижение аффинности к TfR обезьяны. В отношении гуманизированных антител против hTfR № 3, хотя наблюдали снижение аффинности к TfR обезьяны, результат означает, что высокая аффинность при предварительной гуманизации антител против hTfR к TfR обезьяны не была потеряна после их гуманизации, но в целом сохранялась.

Пример 15. Фармакокинетический анализ гуманизированных антител против hTfR у обезьяны.

Используя обезьян, проводили фармакокинетические анализ четырех антител: гуманизированных антител против hTfR № 3, гуманизированных антител против hTfR № 3-2, гуманизированных антител против hTfR № 3 (IgG4) и гуманизированных антител против hTfR № 3-2 (IgG4). Кроме того, тяжелой цепью гуманизированного антитела против hTfR № 3 был IgG1, хотя в гуманизированном антителе против hTfR № 3 (IgG4) тяжелая цепь гуманизированного антитела против hTfR № 3 была преобразована в IgG4, причем ее варибельная область осталась незатронутой. Кроме того, тяжелой цепью гуманизированного антитела против hTfR № 3-2 был IgG1, хотя в гуманизированном антителе против hTfR № 3-2 (IgG4) тяжелая цепь гуманизированного антитела против hTfR № 3-2 была преобразована в IgG4, причем ее варибельная область осталась незатронутой. Эти четыре антитела, соответственно, один раз внутривенно вводили самцам обезьян-крабоедов в дозировке 5,0 мг/кг, и образец их периферической крови брали перед введением, через 2 минуты, 30 минут, 2 часа, 4 часа и через 8 часов после введения, а затем их подвергали промыванию всего тела. В качестве отрицательного контроля трастузумаб (Герцептин™, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), гуманизированные антитела против белка HER2, таким же образом вводили внутривенно один раз одной обезьяне, и образец ее периферической крови брали перед введением, через 2 минуты, 30 минут, 2 часа, 4 часа и через 8 часов после введения, а затем ее подвергали промыванию всего тела. После промывания иссекали ткани головного мозга и спинного мозга, включая продолговатый мозг и другие ткани (печень, сердце, селезенку и костный мозг). Используя эти ткани головного мозга и спинного мозга и другие ткани, измеряли концентрацию гуманизированного антитела против hTfR, и проводили иммуногистохимическое окрашивание.

Измерение концентрации гуманизированных антител против hTfR в тканях и периферической крови проводили, в значительной степени следуя описанной ниже методике. Кроме того, что касается головного мозга, полученные ткани разделяли на кору головного мозга, мозжечок, гиппокамп и продолговатый мозг, а затем измеряли концентрацию гуманизированных антител против hTfR. Соответствующие ткани, полученные таким образом, гомогенизировали с помощью буфера RIPA (Wako Pure Chemical Industries Inc.), содержащего смесь ингибиторов протеаз (Sigma-Aldrich Inc.), центрифугировали и собирали супернатант. Из упомянутой выше периферической крови выделяли сыворотку. Козьи биотинилированные антитела против Карра легкой цепи IgG человека (Immuno-Biological Laboratories Co, Ltd.), антитела Sul-

fo-tag против человеческого IgG (H+L) (Bethyl Inc.) и гомогенат ткани головного мозга добавляли на стрептавидиновый планшет (Meso Scale Diagnostics Inc.), блокировали блокирующим буфером Super-Block в PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.), и планшет встряхивали в течение одного часа для иммобилизации. В каждую лунку добавляли 150 мкл буфера считывания Т (Meso Scale Diagnostics Inc.), и величину люминесценции из каждой лунки измеряли на ридере Sector™ Imager 6000. Количество антител, содержащихся в каждой ткани и периферической крови, рассчитывали посредством получения стандартной кривой на основе измерения стандартных образцов, содержащих известные концентрации антител против hTfR, и затем интерполируя измерение каждого из образцов со ссылкой на стандарт. Измерение концентрации повторяли три раза для каждого образца.

В табл. 9 показан результат измерения концентрации гуманизированных антител против hTfR в тканях головного мозга и спинного мозга.

Таблица 8. Концентрация гуманизированных антител против hTfR в тканях головного мозга (мкг/г сырой массы)

Антитело №	кора	мозжечок	гиппокамп	продолговатый	спинной
	головного мозга			мозг	мозг
3	0,67±0,12	0,61±0,02	0,49±0,02	0,59±0,10	0,46±0,17
3-2	1,05±0,07	0,72±0,04	0,72±0,07	0,69±0,03	0,46±0,02
3(IgG4)	0,65±0,05	0,59±0,03	0,56±0,02	0,59±0,02	0,46±0,07
3-2(IgG4)	0,76±0,02	0,57±0,07	0,62±0,05	0,73±0,16	0,48±0,03
Отрицательный контроль	0,0082±0,00 32	0,0090±0,0067	0,0053±0,0009	0,011±0,003	0,15±0,04

Наблюдали, что все антитела, т.е. гуманизированное антитело против hTfR № 3, гуманизированное антитело против hTfR № 3-2, гуманизированное антитело против hTfR № 3 (IgG4) и гуманизированное антитело против hTfR № 3-2 (IgG4), накапливаются в коре головного мозга, мозжечке, гиппокампе, продолговатом мозге и спинном мозге (табл. 8). Соответствующее накопленное количество было следующим:

у гуманизированных антител против hTfR № 3 больше приблизительно в 82 раза в коре головного мозга, приблизительно в 68 раз в мозжечке, приблизительно в 92 раза в гиппокампе, приблизительно в 54 раз в продолговатом мозге и приблизительно в 3,1 раза в спинном мозге по сравнению с отрицательным контролем, трастузумабом (Герцептин™),

у гуманизированных антител против hTfR № 3-2 больше приблизительно в 128 раз в коре головного мозга, приблизительно в 80 раз в мозжечке, приблизительно в 136 раз в гиппокампе, приблизительно в 63 раза в продолговатом мозге, приблизительно в 3,1 раза в спинном мозге по сравнению с отрицательным контролем, трастузумабом,

у гуманизированных антител против hTfR № 3 (IgG4) больше приблизительно в 79 раз в коре головного мозга, приблизительно в 66 раз в мозжечке, приблизительно в 106 раз в гиппокампе, приблизительно в 54 раза в продолговатом мозге, приблизительно в 3,1 раза в спинном мозге по сравнению с отрицательным контролем, трастузумабом, а

у гуманизированных антител против hTfR № 3-2 (IgG4) больше приблизительно в 93 раза в коре головного мозга, приблизительно в 63 раза в мозжечке, приблизительно в 117 раз в гиппокампе, приблизительно в 66 раз в продолговатом мозге, приблизительно в 3,2 раза в спинном мозге по сравнению с отрицательным контролем, трастузумабом (табл. 9).

Эти результаты показывают, что эти четыре гуманизированных антитела против hTfR обладают свойством, которое позволяет им проходить через гематоэнцефалический барьер и накапливаться в тканях головного мозга, и что теперь можно обеспечить эффективное накопление там фармацевтических средств, которые должны быть задействованы в тканях головного мозга, посредством связывания таких фармацевтических средств с одним из этих антител.

Таблица 9. Количество гуманизированных антител против hTfR, накапливающихся в тканях головного мозга (факторы по сравнению с отрицательным контролем)

Антитело №	кора головного мозга	мозжечок	гиппокамп	продолговатый мозг	спинной мозг
3	82	68	92	54	3,1
3-2	128	80	136	63	3,1
3(IgG4)	79	66	106	54	3,1
3-2(IgG4)	93	63	117	66	3,2
Отрицательный контроль	1	1	1	1	1

Затем на фиг. 4 представлен результат измерения концентрации гуманизированных антител против hTfR в тканях печени, сердца, селезенки и костного мозга. Наблюдала, что четыре гуманизированных антитела против hTfR, а также отрицательный контроль, трастузумаб, накапливались в печени и селезенке, и их накопленное количество было равно у четырех гуманизированных антител против hTfR и трастузумаба. В сердце гуманизированные антитела против hTfR имели тенденцию к накоплению больше, чем трастузумаб, отрицательный контроль, но их количество было только приблизительно в 1,5-2,8 раз больше количества у отрицательного контроля. В костном мозге гуманизированные антитела против hTfR имели тенденцию к накоплению заметно больше, чем трастузумаб, отрицательный контроль, и их количество было в 3,5-16 раз больше количества у отрицательного контроля, полагают, что причина этого накопления гуманизированных антител против hTfR в костном мозге состоит в том, что TfR экспрессируется с высокими уровнями в костном мозге, кроветворном органе, и следовательно больше гуманизированных антител против hTfR накапливается за счет связывания с TfR, чем в отрицательном контроле. Эти данные показывают, что четыре гуманизированных антитела против hTfR обладают свойством, которое обеспечивает их специфическое накопление в большом мозге, мозжечке, гиппокампе и продолговатом мозге, которые составляют центральную нервную систему, и что теперь можно обеспечить эффективное накопление там фармацевтических средств, которые должны быть задействованы в тканях головного мозга, посредством связывания таких фармацевтических средств с одним из этих антител.

Затем табл. 9-2 показывает результат фармакокинетического измерения гуманизированных антител против hTfR в крови. В качестве фармакокинетического измерения отрицательного контроля, трастузумаба, концентрация в крови четырех гуманизированных антител против hTfR сохранялась на высоких уровнях, выше чем 60 мкг/мл, даже восемь часов после введения, указывая, что они устойчивы в крови (табл. 9-2).

Таблица 9-2. Фармакокинетика гуманизированных антител против hTfR в крови (мкг/мл крови)

№ антитела	Время после введения				
	2 мин	30 мин	2 час	4 час	8 час
3	173	147	128	117	97,5
3-2	124	99,5	78,5	76,5	61
3 (IgG4)	141	113	99	95	83
3-2 (IgG4)	132	111	98,5	99	95,5
Отрицательный контроль	124	92,5	96	75,5	60,5

Иммуногистохимическое окрашивание гуманизированных антител против hTfR в тканях головного мозга проводили посредством способа, описанного в примере 8. Однако при этом вместо антител против тяжелой и легкой цепи IgG мышей (Bethyl Laboratories Inc.) использовали антитела против тяжелой и легкой цепи IgG человека (Bethyl Laboratories Inc.).

На фиг. 5 представлен результат иммуногистохимического окрашивания гуманизированных антител против hTfR в коре головного мозга. Специфическое окрашивание кровеносных сосудов и нервоподобных клеток наблюдали в коре головного мозга обезьян, которым вводили гуманизированные антитела против hTfR № 3, гуманизированные антитела против hTfR № 3-2, гуманизированные антитела против hTfR № 3 (IgG4) и гуманизированные антитела против hTfR № 3-2 (IgG4) (фиг. 5b-e, соответственно). В коре головного мозга обезьян, которым вводили гуманизированные антитела против hTfR № 3-2, в частности, (фиг. 5c), также наблюдали специфическое обширное окрашивание области паренхимы головного мозга вне кровеносных сосудов. Кроме того, окрашивание не наблюдалось в коре головного мозга обезьян, которым в качестве контроля вводили герцептин, указывая, что наблюдаемое на фиг. 5b-e окрашивание тканей было специфическим к гуманизированным антителам против hTfR (фиг. 5a).

На фиг. 6 представлен результат иммуногистохимического окрашивания гуманизированных антител против hTfR в гиппокампе. Специфическое окрашивание кровеносных сосудов и нервоподобных

клеток наблюдали в гиппокампе обезьян, которым вводили гуманизированные антитела против hTfR № 3, гуманизированные антитела против hTfR № 3-2, гуманизированные антитела против hTfR № 3 (IgG4) и гуманизированные антитела против hTfR № 3-2 (IgG4) (фиг. 6b-e, соответственно). Кроме того, окрашивание не наблюдалось в гиппокампе обезьян, которым в качестве контроля вводили герцептин, указывая, что наблюдаемое на фиг. 6b-e окрашивание тканей было специфическим к гуманизированным антителам против hTfR (фиг. 6a).

На фиг. 7 представлен результат иммуногистохимического окрашивания гуманизированных антител против hTfR в мозжечке. Специфическое окрашивание кровеносных сосудов и клеток Пуркинье наблюдали в мозжечке обезьян, которым вводили гуманизированные антитела против hTfR № 3, гуманизированные антитела против hTfR № 3-2, гуманизированные антитела против hTfR № 3 (IgG4) и гуманизированные антитела против hTfR № 3-2 (IgG4) (фиг. 7b-e, соответственно). Кроме того, окрашивание не наблюдалось в мозжечке обезьян, которым в качестве контроля вводили герцептин, указывая, что наблюдаемое на фиг. 7b-e окрашивание тканей было специфическим к гуманизированным антителам против hTfR (фиг. 7a).

На фиг. 8 представлен результат иммуногистохимического окрашивания гуманизированных антител против hTfR в продолговатом мозге. Специфическое окрашивание кровеносных сосудов и нервоподобных клеток наблюдали в продолговатом мозге обезьян, которым вводили гуманизированные антитела против hTfR № 3, гуманизированные антитела против hTfR № 3-2, гуманизированные антитела против hTfR № 3 (IgG4) и гуманизированные антитела против hTfR № 3-2 (IgG4) (фиг. 8b-e, соответственно). Кроме того, окрашивание не наблюдалось в продолговатом мозге обезьян, которым в качестве контроля вводили герцептин, указывая, что наблюдаемое на фиг. 8b-e окрашивание тканей было специфическим к гуманизированным антителам против hTfR (фиг. 8a).

Из результата иммуногистохимического окрашивания большого мозга и мозжечка в примере 8 выше было показано, что антитела против hTfR № 3, предварительно гуманизированные мышинные антитела, могут связываться с hTfR, находящимся на эндотелии кровеносных сосудов в головном мозге, а после связывания с hTfR проходить через гематоэнцефалический барьер в паренхиме головного мозга и дополнительно поглощаться паренхимой головного мозга и нервоподобными клетками в гиппокампе и клетками Пуркинье в мозжечке.

Из результата иммуногистохимического окрашивания большого мозга, гиппокампа, мозжечка и продолговатого мозга в примере 15 было выявлено, что тестируемые четыре гуманизированных антитела против hTfR, полученных посредством гуманизации антитела против hTfR № 3, подвергнутых эксперименту, могут связываться с hTfR, находящимися на эндотелии кровеносных сосудов головного мозга, и после связывания с hTfR, проходить через гематоэнцефалический барьер и проходить в паренхиму головного мозга, и кроме того, поглощаться нервоподобными клетками в коре головного мозга; в паренхиме головного мозга и нервоподобные клетки в гиппокампе; в клетки Пуркинье в мозжечке; и в нервоподобные клетки в продолговатом мозге.

Пример 16. Введение мутации в тяжелую цепь гуманизированного антитела против hTfR № 3.

В варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3, показанной как SEQ ID NO: 37, когда CDR1 была CDR1, показанная как SEQ ID NO: 12, для получения тяжелой цепи гуманизированного антитела одну аминокислоту в аминокислотной последовательности CDR1 заменяли другой аминокислотой, в то время как одну аминокислоту в аминокислотной последовательности каркасной области 3 заменяли другой аминокислотой. В результате замены двух аминокислот, составляющих аминокислотную последовательность тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3, изложенную в SEQ ID NO: 37, тяжелая цепь этого нового антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 или 63, в CDR1 и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, в каркасной области 3. Тяжелая цепь этого нового антитела (тяжелая цепь гуманизированного антитела против hTfR № 3N) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, а варибельная область в аминокислотной последовательности содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

В табл. 10 показано выравнивание между CDR1, показанной как SEQ ID NO: 12, в тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3 и CDR1, показанной как SEQ ID NO: 62, в тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3N. при выравнивании аминокислоту треонин в позиции 5 с N-терминальной стороны заменяли метионином.

В табл. 11 показано выравнивание между каркасной областью 3 (SEQ ID NO: 73) в тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3 и каркасной областью 3 (SEQ ID NO: 64) в тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3N. при выравнивании аминокислоту триптофан в позиции 17 с N-терминальной стороны заменяли лейцином.

Таблица 10. Выравнивание аминокислотной последовательности CDR1

	CDR1
Гуманизированное антитело против hTfR № 3	GYSETNYW **** *
Гуманизированное антитело против hTfR № 3N	GYSFMNYW

* представляет идентичные аминокислоты.

[0403] [Таблица 11]

Таблица 11. Выравнивание аминокислотной последовательности каркасной области

	FR3
Гуманизированное антитело против hTfR № 3	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC *****
Гуманизированное антитело против hTfR № 3N	QVTISADKSISTAYLQLSSLKASDTAMYYC

* представляет идентичные аминокислоты.

Пример 17. Получение клеток для экспрессии гуманизированных антител против hTfR № 3N.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 67), который содержал ген, кодирующий тяжелую цепь антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66. В этот фрагмент ДНК добавляли на его 5' стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид в этом порядке от 5' конца, а на его 3' стороне последовательность NotI. Синтезированную таким образом ДНК вставляли в вектор pE- neo посредством описанного в примере 11 способа, и полученный таким образом вектор использовали в качестве экспрессирующего вектора для тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3N, pE-neo (HC3)N. Для получения экспрессирующей гуманизированное антитело против hTfR № 3N клеточной линии клетки CHO трансформировали посредством описанного в примере 12 способа, используя этот pE-neo(HC3)N и вектор для экспрессии легкой цепи, pE-hygr(LC3), полученный в примере 11.

Пример 18. Очистка гуманизированных антител против hTfR № 3N.

Очищенный продукт гуманизированных антител против hTfR № 3N получали посредством описанного в примере 13 способа, используя экспрессирующую гуманизированные антитела против hTfR № 3N клеточную линию, полученную в примере 17. Кроме того, гуманизированное антитело против hTfR № 3N имеет замещение двух аминокислот, показанных в табл. 10 и табл. 11, в аминокислотной последовательности тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3. С другой стороны, легкие цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3N и гуманизированного антитела против hTfR № 3 имеют идентичные аминокислотные последовательности.

Пример 19. Сравнение аффинности к TfR человека и TfR обезьяны между гуманизированными антителами против hTfR № 3 и гуманизированными антителами против hTfR № 3N.

Аффинность гуманизированных антител против hTfR № 3, полученных в примере 13, и гуманизированных антител против hTfR № 3N, полученных в примере 17, к TfR человека и TfR обезьяны измеряли посредством описанного в примере 7 способа. В табл. 12 показаны результаты измерения константы скорости ассоциации (kon), константы скорости диссоциации (koff) каждого антитела и константы диссоциации (KD) с TfR человека. Кроме того, измерение, показывающее аффинность гуманизированных антител против hTfR № 3 к TfR человека, отличалось от измерения, показанного в табл. 6, но составляло ошибку эксперимента.

Таблица 12. Аффинность гуманизированных антител против hTfR к TfR человека

	kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	koff (s ⁻¹)	K _D (M)
Гуманизированное антитело против hTfR 3	8,47×10 ⁵	<1,0×10 ⁻⁷	<1,0×10 ⁻¹²
Гуманизированное антитело против hTfR 3N	7,84×10 ⁵	<1,0×10 ⁻⁷	<1,0×10 ⁻¹²

Аффинность гуманизированных антител против hTfR № 3, полученных в примере 13, и гуманизированных антител против hTfR № 3N, полученных в примере 17, к TfR человека и TfR обезьяны измеряли посредством описанного в примере 7 способа. В табл. 13 показаны результаты измерения константы скорости ассоциации (kon), константы скорости диссоциации (koff) каждого антитела и константы диссоциации (KD) с TfR обезьяны. Кроме того, измерение, показывающее аффинность гуманизированных антител против hTfR № 3 к TfR обезьяны, отличалось от измерения, показанного в табл. 7, но составляло ошибку эксперимента.

Таблица 13. Аффинность гуманизированных антител против hTfR к TfR обезьяны

	kon ($M^{-1}s^{-1}$)	koff (s^{-1})	K_D (M)
Гуманизированное антитело против hTfR 3	$6,09 \times 10^5$	$8,06 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-9}$
Гуманизированное антитело против hTfR 3N	$3,86 \times 10^5$	$1,96 \times 10^{-5}$	$5,07 \times 10^{-11}$

При сравнении K_D с TfR обезьяны между гуманизированными антителами против hTfR № 3N и гуманизированными антителами против hTfR № 3 первая была $5,07 \times 10^{-11}$ M, а последняя была $1,32 \times 10^{-9}$ M; таким образом, K_D гуманизированных антител против hTfR № 3N с TfR обезьяны составляла приблизительно 1/30 от K_D гуманизированных антител против hTfR № 3. С другой стороны, при сравнении K_D с TfR человека между гуманизированными антителами против hTfR № 3N и гуманизированными антителами против hTfR № 3, обе были меньше, чем 1×10^{-12} M; таким образом, оба антитела имели высокую аффинность к TfR человека. Также, оба антитела имели более высокую аффинность к TfR человека, чем аффинность к TfR обезьяны.

В качестве части неклинических испытаний, которые необходимо провести для разработки гуманизированных антител против hTfR в качестве фармацевтических средств, часто выполняют фармакологические тесты, используя обезьян. Так как результаты этих фармакологических тестов с использованием обезьян используют для решения об обоснованности клинических испытаний с использованием людей, предпочтительно, чтобы поведение в организмах обезьян было бы ближе к поведению в организмах людей. Как показано в приведенных выше результатах, гуманизированное антитело против hTfR № 3N демонстрирует приблизительно в 30 раз более высокую аффинность к TfR обезьяны, чем аффинность гуманизированного антитела против hTfR № 3, и следовательно поведение гуманизированного антитела против hTfR № 3N в организмах обезьян можно считать более близким к его поведению в организмах людей. Таким образом, за счет использования гуманизированных антител против hTfR № 3N, получают результаты, больше отражающие поведение в организмах людей в тестах с использованием обезьян. Таким образом, с помощью тестов с использованием обезьян получают более полезные результаты для принятия решения о проведении клинических испытаний с использованием людей.

Пример 20. Сравнение переноса в ткань головного мозга у обезьяны между гуманизированными антителами против hTfR № 3 и гуманизированными антителами против hTfR № 3N.

Каждое из гуманизированного антитела против hTfR № 3, полученного в примере 13, и гуманизированного антитела против hTfR № 3N, полученного в примере 17, вводили внутривенно один раз самцу обезьяны-крабоеда в дозировке 5,0 мг/кг, а через 8 часов после введения проводили промывание всего тела. После промывания иссекали ткани головного мозга и спинного мозга, включая продолговатый мозг. Вырезанные таким образом ткани головного мозга разделяли на кору головного мозга, мозжечок, гиппокамп и продолговатый мозг.

Измерение концентрации гуманизированных антител против hTfR, содержащихся в каждой ткани, проводили в соответствии с описанным в примере 15 способом измерения.

Результат измерения концентрации антител против hTfR в тканях головного мозга показан в таблице 14. при сравнении концентрации в большом мозге, мозжечке и гиппокампе между гуманизированными антителами против hTfR № 3N и гуманизированными антителами против hTfR № 3 концентрация гуманизированных антител против hTfR № 3N была приблизительно в 1,42 раза в большом мозге, приблизительно в 1,56 раза в мозжечке и приблизительно в 1,29 раз в гиппокампе выше, чем концентрация гуманизированных антител против hTfR № 3. В продолговатом мозге их концентрации были почти равны. В шейном отделе позвоночника также концентрация гуманизированных антител против hTfR № 3N была приблизительно в 1,47 раз выше, чем концентрация гуманизированных антител против hTfR № 3. Эти результаты демонстрируют, что гуманизированные антитела против hTfR № 3N по сравнению с гуманизированными антителами против hTfR № 3 имели свойство более эффективного прохождения через гематоэнцефалический барьер и накопления в тканях большого мозга, мозжечка, гиппокампа и тому подобное. А именно, результаты показывают, что посредством связывания этих антител с фармацевтическим средством, которое необходимо доставить для функционирования в тканях головного мозга, гуманизированные антитела против hTfR № 3N имели свойство обеспечения эффективного накопления этих фармацевтических средств в тканях головного мозга.

Таблица 14 Концентрация антител против hTfR в ткани головного мозга (мкг/г сырой массы)

Антитела №	Большой мозг	Мозжечок	Гиппокамп	Продолговатый мозг	Шейный отдел спинного мозга
3	0,670	0,610	0,490	0,589	0,589
3N	0,953	0,950	0,631	0,586	0,672

Пример 20-2. Получение клеток для экспрессии hFc-гуманизированных антител против hTfR.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 72), который содержал ген, кодирующий

аминокислотную последовательность тяжелой цепи Fab гуманизированного антитела против hTfR 3N с добавленной Fc-областью IgG человека, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71. В этот фрагмент ДНК добавляли на его 5' стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, в этом порядке от 5' конца, а на его 3' стороне последовательность NotI. Синтезированную таким образом ДНК вставляли в вектор pE-нео посредством описанного в примере 11 способа, и полученный таким образом вектор обозначали pE-нео(Fc-Fab HC(3N)). Для получения экспрессирующей Fc-Fab(3N) клеточной линии клетки CHO трансформировали посредством описанного в примере 12 способа, используя этот pE-нео(Fc-Fab HC(3N)) и вектор для экспрессии легкой цепи, pE-hygr(LC3), полученный в примере 11.

Пример 20-3. Получение hFc-гуманизированных антител против hTfR Очищенный продукт Fc-Fab (3N) получали посредством описанного в примере 13 способа, используя экспрессирующую Fc-Fab(3N) клеточную линию.

Пример 20-4. Сравнение аффинности hFc-гуманизированных антител против hTfR между TfR человека и TfR обезьяны.

Аффинность очищенного продукта Fc-Fab (3N), полученного в примере 20-3, к TfR человека и TfR обезьяны измеряли посредством описанного в примере 7 способа. Результаты показаны в табл. 14-2. Fc-Fab (3N) проявляли высокую аффинность ($K_D < 1,0 \times 10^{-12}$) к TfR человека. Эти результаты показывают, что Fc-Fab (3N) имеет свойство, которое обеспечивает эффективное накопление в тканях головного мозга фармацевтических средств, которые должны быть задействованы в тканях головного мозга, посредством связывания таких фармацевтических средств с одним из этих антител.

Таблица 14-2. Аффинность hFc-гуманизированных антител против hTfR к TfR человека и TfR обезьяны

	kon ($M^{-1}s^{-1}$)	koff (s^{-1})	K_D (M)
TfR человека	$6,67 \times 10^5$	$< 1,0 \times 10^{-7}$	$< 1,0 \times 10^{-12}$
TfR обезьяны	$2,43 \times 10^5$	$2,09 \times 10^{-4}$	$8,61 \times 10^{-10}$

Пример 20-5. Измерение переноса hFc-гуманизированных антител против hTfR в ткани головного мозга у обезьяны Fc-Fab (3N), полученные в примере 20-3, вводили внутривенно один раз самцу обезьяны-крабода в дозировке 5,0 мг/кг, а через 8 часов после введения проводили промывание всего тела. После промывания иссекали ткани головного мозга и спинного мозга, включая продолговатый мозг. Вырезанные таким образом ткани головного мозга разделяли на кору головного мозга, мозжечок, гиппокамп и продолговатый мозг.

Измерение концентрации содержащихся в каждой ткани гуманизированных антител против hTfR проводили в соответствии с описанным в примере 15 способом измерения.

Результат измерения концентрации антител против hTfR в тканях головного мозга показан в табл. 14-3. Концентрации Fc-Fab (3N) в большом мозге, мозжечке и гиппокампе были 0,80 мкг/г в показателях сырой массы, 0,80 мкг/г в показателях сырой массы и 1,05 мкг/г, соответственно. Концентрации в продолговатом мозге и спинном мозге были 0,68 мкг/г в показателях сырой массы и 0,67 мкг/г в показателях сырой массы, соответственно. Эти результаты показывают, что антитела против hTfR могут проходить через BBB, даже когда гуманизированные антитела против hTfR, которые представляют собой Fab, связаны на их N-терминальной стороне с Fc-областью. Когда конъюгат, в котором требуемое вещество (белок или физиологически активное вещество) связано с Fab, вводят внутривенно, и он является неустойчивым, Fab связывают на его N-терминальной стороне с Fc-областью, за счет чего можно стабилизировать такой конъюгат в организме, например, увеличить период полураспада конъюгата в крови, сохраняя в то же время свойство прохождения через BBB.

Таблица 14-3. Концентрация hFc-гуманизированных антител против hTfR в тканях головного мозга (мкг/г сырой массы)

	Большой мозг	Мозжечок	Гиппокамп	Продолговатый мозг	Шейный отдел спинного мозга
hFc-гуманизированные антитела против hTfR	0,80	0,80	1,05	0,67	0,68

Пример 21. Получение клеток, экспрессирующих слитый белок hI2S-гуманизированных антител против hTfR.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 52, который содержал ген, кодирующий белок, в котором тяжелая цепь гуманизированного антитела против hTfR № 3, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, была связана на ее С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности (Gly Ser) с hI2S, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50. Этот фрагмент ДНК кодировал белок, в котором тяжелая цепь гуманизированного антитела против hTfR, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 247, была связана посредством линкерной последовательности (Gly Ser) с hI2S. Этот фрагмент ДНК имел на его 5' стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид,

выступающий в качестве сигнала секреции в этом порядке от 5' конца, а на его 3' стороне последовательность NotI. Для получения pE-neo(HC-I2S-1) фрагмент ДНК расщепляли с помощью MluI и NotI и вставляли в вектор pE-neo между его MluI и NotI.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 54, который содержал ген, кодирующий белок, в котором тяжелая цепь гуманизированного антитела против hTfR № 3N, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, была связана на ее С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности (Gly Ser) с hI2S, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50. Этот фрагмент ДНК, кодирующий белок, в котором тяжелая цепь гуманизированного антитела против hTfR, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, была связана посредством линкерной последовательности (Gly Ser) с hI2S. Этот фрагмент ДНК имел на его 5' стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, выступающий в качестве сигнала секреции в этом порядке от 5' конца, а на его 3' стороне последовательность NotI. Для получения pE-neo(HC-I2S-2) фрагмент ДНК расщепляли с помощью MluI и NotI и вставляли в вектор pE-neo между его MluI и NotI.

Для получения клеточной линии, экспрессирующей слитый белок между hI2S и гуманизированным антителом против hTfR, клетки CHO (CHO-K1: купленные у американской коллекции типовых культур) трансформировали с помощью pE-neo(HC-I2S-3) и pE-hygr(LC3), которые были получены в примере 11. Эту клеточную линию обозначали экспрессирующая hI2S-антитело против hTfR клеточная линия 3. Слитый белок между hI2S и гуманизированным антителом против hTfR, экспрессируемый клеточными линиями, обозначали I2S-антитело против hTfR 3.

Для получения клеточной линии, экспрессирующей слитый белок между hI2S и гуманизированным антителом против hTfR клетки CHO трансформировали с помощью pE-neo(HC-I2S-3N) и pE-hygr(LC3). Эту клеточную линию обозначали экспрессирующая hI2S-антитело против hTfR клеточная линия 3N. Экспрессируемый клетками слитый белок между hI2S и гуманизированным антителом против hTfR обозначали I2S-антитело против hTfR 3N.

Пример 22. Получение I2S-антител против hTfR I2S-антитела против hTfR получали с помощью следующего способа, полученные в примере 21 экспрессирующие hI2S-антитела против hTfR клеточные линии 3 и 3N разводили средой CD OptiCHO™ до плотности приблизительно 2×10^5 клеток/мл, соответственно. Суспензии клеток, 200 мл, добавляли в соответствующие конические колбы 1 л и культивировали в течение 6-7 дней во влажных окружающих условиях 37°C, 5% CO₂, 95% воздуха со встряхиванием со скоростью приблизительно 70 об/мин. Для получения супернатанта культуры каждый супернатант культуры собирали посредством центрифугирования и фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.). В каждый полученный таким образом супернатант культуры добавляли пять объемов колонки 20 мМ буфера Tris (pH 8,0), содержащего 150 мМ NaCl, и загружали на колонку Protein A (объем колонки: 1 мл, Bio-Rad Inc.), которую заранее уравнивали тремя объемами колонки 20 мМ буфера Tris (pH 8,0), содержащего 150 мМ NaCl. Затем колонку промывали пятью объемами колонки того же самого буфера и адсорбированные I2S-антитела против hTfR элюировали четырьмя объемами колонки 50 мМ глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 мМ NaCl. Для получения очищенных продуктов I2S-антитело против hTfR 3 и I2S-антитело против hTfR 3N рН элюата, содержащего I2S-антитела против hTfR, доводили до pH 7,0 с помощью 1 М буфера Tris (pH 8,0), а затем буфер заменяли буфером PBS, используя мембрану Amicon Ultra 30 кДа (Millipore Inc.).

Пример 23. Измерение аффинности I2S-антител против hTfR к TfR человека и TfR обезьяны.

Аффинность полученных в примере 22 I2S-антител против hTfR к TfR человека и TfR обезьяны измеряли согласно описанному в примере 7 способу. В табл. 15 показаны результаты измерения константы скорости ассоциации (kon), константы скорости диссоциации (koff) I2S-антител против hTfR 3 и I2S-антител против hTfR 3N и константы диссоциации (K_D) с TfR человека. В табл. 16 показаны результаты измерения константы скорости ассоциации (kon), константы скорости диссоциации (koff) I2S-антител против hTfR 3 и I2S-антител против hTfR 3N и константы диссоциации (K_D) с TfR обезьяны.

I2S-антитела против hTfR 3N проявили аффинность к TfR человека приблизительно в 5 раз больше, чем у I2S-антител против hTfR (табл. 15). Кроме того, I2S-антитела против hTfR 3N проявили значительно более высокую аффинность к TfR обезьяны чем аффинность I2S-антител против hTfR (табл. 16). I2S-антитела против hTfR 3N проявили более высокую аффинность к TfR человека и TfR обезьяны, чем аффинность I2S-антител против hTfR 3.

Таблица 15. Аффинность I2S-антител против hTfR к TfR

	kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	koff (s ⁻¹)	K _D (M)
I2S-антитело против hTfR 3	8,29×10 ⁵	1,04×10 ⁻⁴	1,26×10 ⁻¹⁰
I2S-антитело против hTfR 3N	6,92×10 ⁵	1,90×10 ⁻⁵	2,75×10 ⁻¹¹

Таблица 16. Аффинность I2S-антител против hTfR к TfR обезьяны

	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
I2S-антитело против hTfR 3	$3,77 \times 10^5$	$4,10 \times 10^{-4}$	$1,09 \times 10^{-9}$
I2S-антитело против hTfR 3N	$3,83 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$

Пример 24. Сравнение переноса в ткань головного мозга у обезьяны между I2S-антителами против hTfR 3 и I2S-антителами против hTfR 3N.

Каждое из I2S-антител против hTfR 3 и I2S-антитела против hTfR 3N, полученных в примере 22, вводили внутривенно один раз самцу обезьяны-крабода в дозировке 5,0 мг/кг, а через 8 часов после введения проводили промывание всего тела. После промывания иссекали ткани головного мозга и спинного мозга, включая продолговатый мозг. Вырезанные таким образом ткани головного мозга разделяли на кору головного мозга, мозжечок, гиппокамп и продолговатый мозг.

Измерение концентрации I2S-антител против hTfR, содержащихся в каждой ткани, проводили, в значительной степени следуя описанной в примере 20 методике. Результат измерения концентрации I2S-антител против hTfR в тканях головного мозга показан в табл. 17. при сравнении концентрации в большом мозге, мозжечке, гиппокампе, продолговатом мозге и шейной части позвоночника между I2S-антителом против hTfR 3N и I2S-антителом против hTfR 3 концентрация I2S-антител против hTfR 3N была приблизительно в 2,12 раза в большом мозге, приблизительно в 1,97 раз в мозжечке, приблизительно в 2,41 раза в гиппокампе, в 1,94 раза в продолговатом мозге и в 1,63 раза в шейном отделе позвоночника выше, чем концентрация I2S-антител против hTfR 3. Этот результат демонстрирует, что I2S-антитело против hTfR 3N может проходить через гематоэнцефалический барьер более эффективно, чем I2S-антитело против hTfR 3.

Таблица 17. Концентрация I2S-антител против hTfR в ткани головного мозга (мкг/г сырой массы)

	Большой мозг	Мозжечок	Гиппокамп	Продолговатый мозг	Шейный отдел спинного мозга
I2S-антитело против hTfR 3	0,224	0,249	0,183	0,229	0,188
I2S-антитело против hTfR 3N	0,475	0,491	0,441	0,450	0,306

Пример 25. Получение клеток для экспрессии белка слияния hGAA-гуманизированное антитело против hTfR.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 59, который содержал ген, кодирующий белок, в котором тяжелая цепь гуманизированного антитела против hTfR 3N, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, была связана на ее С-терминальной стороне и посредством линкерной последовательности (Gly Ser) с hGAA, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55. Этот фрагмент ДНК, кодирующий белок, в котором тяжелая цепь (IgG4) гуманизированного антитела против hTfR 3N, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, была связана с hGAA посредством линкерной последовательности (Gly Ser). Этот фрагмент ДНК имел на его 5' стороне последовательность MluI и последовательность, кодирующую лидерный пептид, выступающий в качестве сигнала секреции в этом порядке от 5' конца, а на его 3' стороне последовательность NotI. Для получения pE-neo(HC-GAA-3N (IgG4)) фрагмент ДНК расщепляли с помощью MluI и NotI и вставляли в вектор pE-neo между его MluI и NotI.

Для получения клеточной линии, экспрессирующей слитый белок между hGAA и гуманизированным антителом против hTfR, клетки CHO (CHO-K1: купленные у американской коллекции типовых культур) трансформировали с помощью pE-neo(HC-GAA-3N(IgG4)) и pE-hygr(LC3), полученных в примере 11. Эту клеточную линию обозначали экспрессирующая hGAA-антитело против hTfR клеточная линия 3N(IgG4). Экспрессируемый клетками слитый белок между hGAA и гуманизированным антителом против hTfR обозначали GAA-антитело против hTfR 3N(IgG4).

Пример 26. Получение GAA-антител против hTfR 3N (IgG4).

GAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) получали, в значительной степени следуя описанному в примере 22 способу, используя экспрессирующую hGAA-антитела против hTfR клеточную линию 3N (IgG4), полученную в примере 25.

Пример 27. Измерение аффинности hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) к TfR человека и TfR обезьяны.

Аффинность полученных в примере 26 hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) к TfR человека и TfR обезьяны измеряли согласно описанному в примере 23 способу. Также здесь описаны результаты измерения аффинности Fab GS-GAA, полученных в примере 31 ниже, к TfR человека и TfR обезьяны.

hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) проявили очень высокую аффинность как к TfR человека, так и к TfR обезьяны. Результаты показаны в табл. 17-2. Fab GS-GAA также проявили высокую аффинность как к TfR человека, так и к TfR обезьяны, но аффинность была ниже, чем аффинность hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4).

Таблица 17-2. Аффинность hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) и Fab GS-GAA к TfR человека и TfR обезьяны

		kon (1/Ms)	koff (1/s)	K _D (M)
hGAA-антитело против hTfR 3N (IgG4)	TfR человека	4,86×10 ⁵	<1,00×10 ⁻⁷	<1,00×10 ⁻¹²
	TfR обезьяны	2,03×10 ⁵	<1,00×10 ⁻⁷	<1,00×10 ⁻¹²
Fab GS-GAA	TfR человека	4,14×10 ⁵	1,67×10 ⁻⁴	4,04×10 ⁻¹⁰
	TfR обезьяны	3,29×10 ⁵	5,01×10 ⁻³	1,52×10 ⁻⁸

Пример 28. Оценка переноса hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) в ткани головного мозга у обезьяны.

Перенос полученных в примере 26 hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) в ткани головного мозга можно оценить согласно описанному в примере 24 способу. Конкретно, hGAA-антитело против hTfR 3N (IgG4) вводили внутривенно один раз самцу обезьяны-крабоеда в дозировках 5,0 мг/кг и 20 мг/кг. В качестве средства контроля самцу обезьяны-крабоеда один раз внутривенно вводили в дозировке 5,0 мг/кг и 20 мг/кг hGAA, поставляемую на рынок в качестве терапевтического средства для болезни Помпе. Трём обезьянам вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, и одной обезьяне вводили другие антитела. каждую из обезьян, которым вводили hGAA-антитело против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, подвергали промыванию всего тела физиологическим солевым раствором (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) через 4 часа, 8 часов и 24 часа после введения. Других обезьян подвергали промыванию всего тела через 8 часов после введения.

После промывания иссекали ткани головного мозга, включая продолговатый мозг, ткани спинного мозга и ткани скелетных мышц. Ткани головного мозга делили на кору головного мозга, мозжечок, гиппокамп, продолговатый мозг и мост головного мозга. Для тканей скелетных мышц иссекали прямую мышцу бедра, мышцу длинного разгибателя пальцев, камбаловидную мышцу, трехглавую мышцу плеча, большую поясничную мышцу, диафрагму и мышцу языка. Одного самца обезьяны-крабоеда, которому не вводили фармацевтическое средство, подвергали промыванию всего тела физиологическим солевым раствором (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), и иссекали кору головного мозга и прямую мышцу бедра. Для сбора супернатанта вырезанные ткани гомогенизировали с помощью T-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.), содержащей смесь ингибиторов протеаз (Sigma Inc.) и центрифугировали. Используя полученный супернатант измеряли концентрации hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) и hGAA посредством следующего способа ECL, и проводили иммуногистохимическое окрашивание.

Измерение концентрации белка посредством способа ECL.

Для получения SULFO-меченых антител против hGAA кроличьи поликлональные антитела против hGAA метили SULFO с помощью NHS эфира MSD GOLD Sulfo-TAG (Meso Scale Discovery Inc.). Кроме того, для получения меченых биотином антител против hGAA кроличьи поликлональные антитела против hGAA метили биотином с помощью EZ-Link NHS-PEG₄-Биотина (Thermo Fisher Scientific Inc.). Для получения реакционноспособного образца антител получали раствор смеси равных количеств SULFO-меченых антител против hGAA и меченых биотином антител против hGAA, в этот раствор добавляли полученный, как описано выше, супернатант, и полученную в результате смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. В каждую лунку 96-луночного планшета Streptavidin Gold (Meso Scale Diagnostics Inc.), который представляет собой покрытый стрептавидином планшет, добавляли 1% раствор BSA/PBS, и планшет оставляли стоять в течение 1 часа для блокирования планшета.

После блокирования каждую лунку планшета промывали 200 мкл PBS-T (Sigma Inc.), а затем в каждую лунку добавляли реакционноспособный образец антител и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После инкубации каждую лунку планшета промывали PBS-T, затем добавляли смешанную жидкость равных количеств 4X буфера считывания T (Meso scale Diagnostics Inc.) и воды для инъекции (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), и измеряли величину люминесценции из каждой лунки, используя Sector™ Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics Inc.). Рассчитывали количество антител, содержащихся в одном грамме головного мозга (сырая масса), посредством получения стандартной кривой на основе измерения стандартных образцов, содержащих известные концентрации hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) или hGAA, и интерполируя измерение каждого образца со ссылкой на стандартную кривую для определения количеств hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) и hGAA.

Результаты измерения концентраций посредством способа ELC показаны в табл. 18. Сперва результаты для тканей головного мозга будут обсуждаться. У обезьяны, которой вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4), концентрации вводимых hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 5 мг/кг и 20 мг/кг повышались зависимым от концентрации образом до 0,740 мкг/г в показателях сырой массы и 1,42 мкг/г в показателях сырой массы, соответственно, в коре головного мозга через 8 часов после введе-

ния. Такие же результаты получали для мозжечка, гиппокампа, продолговатого мозга и моста головного мозга. С другой стороны, у обезьяны, которой вводили hGAA, концентрации вводимой hGAA в дозировках 5 мг/кг и 20 мг/кг показывали почти равные значения, составляющие 0,414 мкг/г в показателях сырой массы и 0,435 мкг/г в показателях сырой массы, соответственно, в коре головного мозга через 8 часов после введения. Такие же результаты получали для мозжечка, гиппокампа, продолговатого мозга и моста головного мозга. С учетом того, что значение концентрации собственной GAA в коре головного мозга, имеющей определенное количество hGAA у обезьяны, которой не вводили фармацевтическое средство, было 0,425 мкг/г в показателях сырой массы, очевидно, что в головной мозг попадает немного внутривенно вводимой hGAA. С другой стороны, очевидно, что внутривенно вводимое hGAA-антитело против hTfR 3N (IgG4) попадает в головной мозг за счет прохождения через BBB.

Далее будут обсуждаться результаты для тканей скелетных мышц. У обезьяны, которой вводили каждое из hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) и hGAA в дозировке 5 мг/кг, концентрация hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) и hGAA в прямой мышце бедра через 8 часов после введения была 0,311 мкг/г в показателях сырой массы для hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) и 0,251 мкг/г в показателях сырой массы для hGAA. А именно, концентрация hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) была в 1,23 раза больше концентрации hGAA. Такие же результаты получали, когда эти антитела вводили в дозировке 20 мг/кг. Кроме того, такие же результаты получали для мышцы длинного разгибателя пальцев, камбаловидной мышцы, трехглавой мышцы плеча, большой поясничной мышцы, диафрагмы и мышцы языка. А именно, очевидно, что внутривенно вводимые hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) попадают в ткани скелетных мышц в большем количестве, чем количество внутривенно вводимой hGAA.

Таблица 18. Концентрация hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) в тканях головного мозга и скелетных мышцах (мкг/г сырой массы)

Вводимое вещество		hGAA-антитело против hTfR 3N (IgG4)				hGAA		Собственная GAA
Доза		5 мг/кг			20 мг/кг	5 мг/кг	20 мг/кг	
Время, прошедшее после введения (ч)		4	8	24	8	8	8	
Головной мозг	Кора головного мозга	1,07	0,740	1,00	1,42	0,414	0,435	0,425
	Мозжечок	0,776	0,625	0,509	1,16	0,275	0,279	-
	Гиппокамп	1,34	0,966	1,14	1,68	0,471	0,467	-
	Продолговатый мозг	0,886	0,678	0,869	1,22	0,371	0,394	-
	Мост головного мозга	0,904	0,627	0,730	1,12	0,403	0,371	-
Скелетные мышцы	Прямая мышца бедра	0,445	0,311	0,458	0,425	0,251	0,377	0,140
	Мышца длинного разгибателя пальцев	0,463	0,293	0,379	0,554	0,261	0,449	-
	Камбаловидная мышца	0,527	0,361	0,377	0,485	0,277	0,320	-
	мышца							
	Трехглавая мышца плеча	0,315	0,311	0,250	0,482	0,231	0,314	-
	Большая поясничная мышца	0,301	0,241	0,275	0,383	0,238	0,225	-
	Диафрагма	0,289	0,212	0,238	0,339	0,199	0,381	-
	Мышца языка	0,882	0,631	0,794	1,10	0,316	0,915	-

Иммуногистохимическое окрашивание.

Иммуногистохимическое окрашивание hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) и hGAA в тканях головного мозга проводили, следуя методикам, в целом описанным ниже. Ткани головного мозга, полученные, как описано выше, быстро замораживали до -80°C в Tissue-Tek Cryo 3DM (Sakura Finetek Inc.), полученный таким образом замороженный блок нарезали на 4-мкм срезы с помощью криостата LEICA CM 1860 UV (Leica Biosystems Nussloch Inc.), а затем срезы тканей укладывали на покрытые MAS предметные стекла (Matsunami Glass Inc.). Срезы тканей вводили в реакцию с 4% параформальдегидом (Wako

Pure Chemical Industries Inc.) при 4°C в течение 5 минут, и прикрепляли к предметным стеклам. После этого срезы тканей вводили в реакцию с раствором метанола, содержащим 0,3% перекись водорода (Wako Pure Chemical Industries Inc.) в течение 30 минут для инактивации собственной пероксидазы. Затем предметные стекла блокировали посредством проведения реакции с блокирующим буфером Super-Block в PBS при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем срезы тканей вводили в реакцию с кроличьими поликлональными антителами против hGAA в качестве первичных антител при 4°C в течение 16 часов. Затем срезы тканей обрабатывали кроличьим линкером CSAII (Agilent Inc.) и набором для не содержащей биотин системы усиления сигнала с помощью тирамида CSAII (Agilent Inc.). Затем срезы тканей вводили в реакцию с конъюгированными с пероксидазой хрена антителами против флуоресцеина при комнатной температуре в течение 15 минут. Срезам тканей обеспечивали возможность изменения цвета с помощью субстрата DAB (3,3'-диаминобензидин, Vector Laboratories Inc.), доокрашивали раствором гематоксилина Майера (Merck Inc.), обезживали, очищали, укладывали и рассматривали под микроскопом. Необходимо заметить, что иммуногистохимическое окрашивание проводили только на мозжечке обезьян, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, и которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг. Следовательно, время, прошедшее после введения, составляет 8 часов для обоих антител.

На фиг. 9 представлены результаты иммуногистохимического окрашивания hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) и hGAA в мозжечке. В мозжечке обезьян, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4), наблюдали специфическое окрашивание кровеносных сосудов и клеток Пуркинье (фиг. 9a). С другой стороны, в мозжечке обезьян, которым вводили hGAA, такое окрашивание не наблюдалось (фиг. 9b). Эти результаты показывают, что за счет слияния hGAA, которая обычно не проходит через гематоэнцефалический барьер, с антителом против hTfR 3N (IgG4) можно обеспечить возможность прохождения hGGA через гематоэнцефалический барьер и поглощение клетками Пуркинье в мозжечке.

Пример 29. Оценка фармакологического действия hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) у мышей: определение концентрации гликогена (1).

На основе нокаутных мышей в качестве животной модели болезни Помпе, у которых не работает ген кислой α -глюкозидазы (GAA), получали мышей с отсутствующим геном GAA при гомологии и имеющих химерный ген TfR при гетерологичности (GAA-KO/мыши hTfR-KI) путем замены гена, кодирующего внеклеточную область мышинового TfR, геном, кодирующим внеклеточную область гена рецептора TfR человека посредством описанного в примере 7-2 способа. Мышей делили на семь групп, и им внутривенно вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) или hGAA в соответствии с использованием и дозировкой, показанными в табл. 19. Нормальных мышей, которым не вводили фармацевтическое средство, классифицировали как нормальный контроль (первая группа), а GAA-KO/мышей hTfR-KI, которым не вводили фармацевтическое средство, классифицировали как контроль заболевания (вторая группа). В каждой группе содержалось пять мышей. Кроме того, использовали самцов и самок мышей в возрасте 9-14-недель (в начале введения).

Таблица 19. Группирование мышей

Группа	Тестируемое вещество	Мышь	Дозировка (мг/кг)	Интервал введения	Количество введенный
1	-	Нормальная	-	-	-
		мышь			
2	-	Мышь GAA-KO/hTfR-KI	-	-	-
3	hGAA	Мышь GAA-KO/hTfR-KI	20	2 недели	4 недели
4	hGAA-антитело против hTfR 3N (IgG4)	Мышь GAA-KO/hTfR-KI	2,5		
5			5,0		
6			10		
7			20		

При втором и третьем введении тестируемого вещества дифенгидрамин вводили в дозировке 10 мл/кг мыши за 10-20 минут перед введением. Это лечение нацелено на предотвращение возникновения у экспериментальных животных иммунологической реакции, такой как анафилактический шок, вследствие введения тестируемого вещества. Через 13 дней после последнего введения мышь обезглавливали при анестезии изофлюраном, и быстро иссекали правое полушарие головного мозга и шейный отдел спинного мозга, а затем быстро погружали в жидкий азот для быстрого замораживания. После замораживания измеряли сырую массу тканей каждого из органов. Для сердца, диафрагмы, печени, селезенки, четырехглавой мышцы бедра, камбаловидной мышцы, прямой мышцы бедра, мышцы длинного разгибателя пальцев и икроножной мышцы (собранные скелетные мышцы: правая нога), за счет кровопускания в достаточной мере удаляли кровь, затем собирали ткани и промывали физиологическим солевым раствором,

и измеряли сырую массу тканей каждого из органов. После измерения каждый орган герметично закрывали в 1,5 мл пробирке, и мгновенно замораживали в жидком азоте.

В ткани каждого органа добавляли воду для инъекции в количестве в 20 раз больше сырой массы тканей, и ткани гомогенизировали, используя шаровую мельницу. Гомогенизированные ткани переносили в центрифужную пробирку, нагревали при 100°C в течение 5 минут и оставляли стоять на льду. После этого ткани центрифугировали при 13000 об/мин при 4°C в течение 5 минут, и собирали супернатант. Супернатант замораживали и сохраняли при температуре -70°C или ниже.

Концентрацию содержащегося в супернатанте гликогена измеряли с помощью набора для анализа гликогена (Viovision Inc.). Результаты измерения показаны на фигурах 10 и 11. На фиг. 10 показаны концентрации гликогена в правом полушарии головного мозга, шейном отделе спинного мозга, сердце, диафрагме, печени и селезенке (фиг. 10a-10f, соответственно). Кроме того, на фиг. 11 показаны концентрации гликогена в четырехглавой мышце бедра, камбаловидной мышце, прямой мышце бедра, мышце длинного разгибателя пальцев и икроножной мышце (фиг. 11a-11e, соответственно). Однако группу мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, исключили, по причине их смерти через 5 дней после последнего введения.

Результаты на фиг. 10 и 11 будут обсуждаться ниже.

Головной мозг.

Концентрации гликогена в тканях головного мозга нормальной контрольной группы, контрольной группы заболевания, группы мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг, составляли 0,0815 мг/г, 3,08 мг/г, 2,36 мг/г, 2,07 мг/г, 1,00 мг/г, 0,891 мг/г и 0,592 мг/г, соответственно, в показателях сырой массы (фиг. 10(a)). Группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке не ниже чем 5,0 мг/кг, показывали значительное уменьшение концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания и группой мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг. Кроме того, уменьшение концентрации гликогена за счет hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) зависело от дозировки.

Шейный отдел спинного мозга.

Концентрации гликогена в тканях шейного отдела спинного мозга нормальной контрольной группы, контрольной группы заболевания, группы мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и групп мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг, составляли 0,0459 мг/г, 3,10 мг/г, 2,68 мг/г, 2,26 мг/г, 1,77 мг/г, 1,06 мг/г и 0,795 мг/г, соответственно, в показателях сырой массы (фиг. 10(b)). Все группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4), показывали значительное уменьшение концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания. Кроме того, группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке не ниже чем 5,0 мг/кг, показывали значительное уменьшение концентрации гликогена в тканях по сравнению с группой мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг. Кроме того, уменьшение концентрации гликогена за счет hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) зависело от дозировки.

Сердце.

Концентрации гликогена в сердце нормальной контрольной группы, контрольной группы заболевания, группы мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и групп мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг, составляли 0,0816 мг/г, 32,4 мг/г, 4,54 мг / г, 12,3 мг / г, 3,45 мг / г, 1,10 мг / г и 0,205 мг / г, соответственно, в показателях сырой массы (фиг. 10(c)). Все группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4), показывали значительное уменьшение концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания. Группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, показывали значительное уменьшение концентрации гликогена по сравнению с группой мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг.

Диафрагма.

Концентрации гликогена в тканях диафрагмы нормальной контрольной группы, контрольной группы заболевания, группы мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и групп мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг, составляли 0,0824 мг/г, 14,1 мг/г, 6,96 мг/г, 12,4 мг/г, 5,57 мг/г, 2,68 мг/г и 0,564 мг/г, соответственно, в показателях сырой массы (фиг. 10(d)). Группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке не ниже чем 5,0 мг/кг, показывали значительное уменьшение концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания. Группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 10 мг/кг, показывали значительное уменьшение концентрации гликогена по сравнению с группой мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг.

Печень.

Концентрации гликогена в печени нормальной контрольной группы, контрольной группы заболевания, группы мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и групп мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг, составляли 1,16 мг/г, 22,5

мг/г, 2,65 мг/г, 8,88 мг/г, 2,95 мг/г, 3,01 мг/г и 1,46 мг/г, соответственно, в показателях сырой массы (фиг. 10 (e)). Все группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4), а также группа мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, показывали значительное уменьшение концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания.

Селезенка.

Концентрации гликогена в селезенке нормальной контрольной группы, контрольной группы заболевания, группы мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и групп мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг, составляли 0,0295 мг/г, 3,15 мг/г, 0,182 мг/г, 0,368 мг/г, 0,165 мг/г, 0,122 мг/г и 0,0990 мг/г, соответственно, в показателях сырой массы (фиг. 10(f)). Все группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4), а также группа мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, показывали значительное уменьшение концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания.

Четырехглавая мышца бедра.

Концентрации гликогена в тканях четырехглавой мышцы бедра нормальной контрольной группы, контрольной группы заболевания, группы мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и групп мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг, составляли 0,0529 мг/г, 8,66 мг/г, 7,41 мг/г, 6,40 мг/г, 2,68 мг/г, 1,71 мг/г и 0,282 мг/г, соответственно, в показателях сырой массы (фиг. 11 (a)). Группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке не ниже чем 5,0 мг/кг, показывали значительное уменьшение концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания и группой мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг. Группа мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, не показали значительного уменьшения концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания.

Икроножная мышца.

Концентрации гликогена в тканях икроножной мышцы нормальной контрольной группы, контрольной группы заболевания, группы мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и групп мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг, составляли 0,173 мг/г, 7,68 мг/г, 5,09 мг/г, 5,23 мг/г, 2,40 мг/г, 1,58 мг/г и 0,221 мг/г, соответственно, в показателях сырой массы (фиг. 11 (b)). Группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке не ниже чем 5,0 мг/кг, показывали значительное уменьшение концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания. Группа мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, не показали значительного уменьшения концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания.

Камбаловидная мышца.

Концентрации гликогена в тканях камбаловидной мышцы нормальной контрольной группы, контрольной группы заболевания, группы мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и групп мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг, составляли 0,116 мг/г, 12,08 мг/г, 2,233 мг/г, 7,20 мг/г, 2,74 мг/г, 1,07 мг/г и 0,378 мг/г, соответственно, в показателях сырой массы (фиг. 11(c)). Все группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4), показывали значительное уменьшение концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания. Кроме того, группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке не ниже чем 5,0 мг/кг, а также группа мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, показывали значительное уменьшение концентрации гликогена в тканях.

Прямая мышца бедра.

Концентрации гликогена в тканях прямой мышцы бедра нормальной контрольной группы, контрольной группы заболевания, группы мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и групп мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг, составляли 0,0419 мг/г, 9,68 мг/г, 8,23 мг/г, 4,13 мг/г, 2,56 мг/г, 0,895 мг/г и 0,277 мг/г, соответственно, в показателях сырой массы (фиг. 11(d)). Все группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4), показывали значительное уменьшение концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания и группой мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг. Группа мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, не показали значительного уменьшения концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания.

Мышца длинного разгибателя пальцев.

Концентрации гликогена в тканях мышцы длинного разгибателя пальцев нормальной контрольной группы, контрольной группы заболевания, группы мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и групп мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг, составляли 0,0950 мг/г, 10,4 мг/г, 9,11 мг/г, 4,79 мг/г, 2,59 мг/г, 1,34 мг/г и 0,188 мг/г, соответственно, в показателях сырой массы (фиг. 11(e)). Все группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4), показывали значительное уменьшение концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания. Кроме того, группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке не ниже чем 5,0 мг/кг, показывали значительное уменьше-

ние концентрации гликогена в тканях по сравнению с группой мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг. Группа мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, не показали значительного уменьшения концентрации гликогена в тканях по сравнению с контрольной группой заболевания.

Пример 30. Оценка фармакологического действия hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) у мышей: гистопатологическая оценка (2).

Левое полушарие головного мозга, шейный отдел спинного мозга, четырехглавую мышцу бедра, камбаловидную мышцу и мышцу длинного разгибателя пальцев, которые собрали в примере 29, погружали в достаточное количество 10% буферного раствора нейтрального формалина, приблизительно через 24 часа 10% буферный раствор нейтрального формалина заменяли. Через 3 дня после сбора тканей ткани погружали в 80% этанол, и таймер программировали на 48-часовую задержку таким образом, чтобы заменять этанол толуолом с помощью устройства автоматической фиксации и погружения (Sakura Rotary), в конце концов ткани погружали в парафин, и полученные таким образом образцы подвергали окрашиванию PAS и окрашиванию HE.

Результаты окрашивания PAS будут обсуждаться ниже.

Кора головного мозга.

Что касается окрашиваемости PAS в клетках, все из контрольной группы заболевания и группы мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, имели умеренную окрашиваемость, тогда как группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 2,5-20 мг/кг, демонстрировали уменьшение окрашиваемости. Что касается окрашиваемости PAS в кровеносных сосудах, группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, демонстрировали уменьшение окрашиваемости.

Гиппокамп/зубчатая извилина и базальная ганглия.

Группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, демонстрировали уменьшение окрашиваемости PAS в клетках и кровеносных сосудах по сравнению с контрольной группой заболевания. В базальной ганглии группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 2,5 мг/кг, и группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 5,0 мг/кг, также демонстрировали уменьшение окрашиваемости.

Межуточный мозг (таламус/гипоталамус).

Группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 2,5-20 мг/кг, демонстрировали уменьшение окрашиваемости PAS по сравнению с контрольной группой заболевания.

Средний мозг-мост головного мозга.

Группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 5,0-20 мг/кг, демонстрировали уменьшение окрашиваемости PAS.

Продолговатый мозг.

Группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, демонстрировали уменьшение окрашиваемости PAS по сравнению с контрольной группой заболевания.

Мозжечок.

В слое клеток Пуркинье/зернистом слое группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 2,5-20 мг/кг, имели тенденцию демонстрировать уменьшение окрашиваемости PAS в клетках на периферии клеток Пуркинье по сравнению с контрольной группой заболевания. В белом веществе группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 2,5 и 20 мг/кг, имели тенденцию демонстрировать уменьшение окрашиваемости PAS.

Четырехглавая мышца бедра.

Группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировках 5,0 и 10 мг/кг, имели тенденцию демонстрировать уменьшение окрашиваемости PAS по сравнению с контрольной группой заболевания, а группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, показывали заметное уменьшение окрашиваемости.

Камбаловидная мышца.

Группа мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 10 мг/кг, демонстрировали уменьшение окрашиваемости PAS по сравнению с контрольной группой заболевания, а группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, показывали заметное уменьшение окрашиваемости.

Далее результаты окрашивания HE будут обсуждаться ниже.

Кора головного мозга.

Кора головного мозга: группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 5,0-20 мг/кг, имели тенденцию демонстрировать уменьшение роста клеточной опухоли по сравнению с контрольной группой заболевания. Белое вещество большого мозга (мозолистое тело, базальный ганглий и передняя комиссура) и желудочек мозга: группа мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 5,0-20 мг/кг, демонстрировали уменьшение содержания вакуолей белого вещества по сравнению с контрольной группой заболевания.

Только группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, имели тенденцию демонстрировать уменьшение роста клеточной опухоли по сравнению с контрольной группой заболевания продолговатого мозга.

Мозжечок.

Группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, имели тенденцию демонстрировать уменьшение роста клеточной опухоли в белом веществе.

Четырехглавая мышца бедра.

Группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 10 мг/кг, имели тенденцию демонстрировать уменьшение образования вакуолей/лакунов в мышечных волокнах по сравнению с контрольной группой заболевания, а группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, демонстрировали дополнительное уменьшение образования вакуолей/лакунов в мышечных волокнах.

Камбаловидная мышца.

Группа мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг, и группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 5,0-10 мг/кг, демонстрировали уменьшение образования вакуолей/лакунов в мышечных волокнах по сравнению с контрольной группой заболевания, а группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 20 мг/кг, показывали небольшое уменьшение образования вакуолей/лакунов в мышечных волокнах.

Мышца длинного разгибателя пальцев.

Группа мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 5,0 мг/кг, демонстрировали уменьшение образования вакуолей/лакунов в мышечных волокнах по сравнению с контрольной группой заболевания, а группы мышей, которым вводили hGAA-антитела против hTfR 3N (IgG4) в дозировке 10-20 мг/кг, демонстрировали дополнительное уменьшение образования вакуолей/лакунов в мышечных волокнах.

Приведенные выше результаты фармакологического действия hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) у мышей показывают, что введение hGAA-антител против hTfR 3N (IgG4) в дозировке не ниже чем 5 мг/кг является более эффективным в качестве терапевтического средства для болезни Помпе с гистопатологической точки зрения, чем введение поставляемой на рынок hGAA в дозировке 20 мг/кг, и демонстрирует чрезвычайно заметное действие в центральной нервной системе и тканях скелетных мышц.

Пример 31. Получение белка слияния между Fab-антителом против hTfR 3N и hGAA (Fab GS-GAA).

Для получения экспрессирующего вектора pE-neo (Fab HC-GS-GAA) искусственно синтезировали фрагмент ДНК, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 89, и содержащий ген, кодирующий слитый белок между hGAA и тяжелой цепью Fab гуманизированного антитела против hTfR, и вставляли в вектор pE-neo между его MluI и NotI. В данном случае в ген, кодирующий слитый белок, на 5'-терминальной стороне гена вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерный пептид, выступающий в качестве сигнала секреции. Клетки CHO (CHO-K1: купленные у американской коллекции типовых культур) трансформировали с помощью pE-neo (Fab HC-GS-GAA) и pE-hygr (LC3), полученных в примере 11 для получения клеточной линии, экспрессирующей слитый белок между hGAA и антителом против hTfR 3N, представляющим собой Fab (Fab GS-GAA). Супернатант культуры получали путем культивирования экспрессирующей клеточной линии согласно описанному в примере 22 способу. Супернатант культуры загружали на колонку CaptureSelect IgG-CH1, представляющую собой колонку аффинности к CH1 (объем колонки: приблизительно 1,0 мл, Thermo Fisher Scientific Inc.), которую уравнивали пятью объемами колонки 20 мМ буферного раствора HEPES-NaOH (pH: 7,0), содержащего 100 мМ NaCl, для адсорбции белка слияния на колонке аффинности к CH1. Затем колонку промывали путем подачи пяти объемов колонки 20 мМ буферного раствора HEPES-NaOH (pH: 7,0), содержащего 100 мМ NaCl. Затем слитый белок, адсорбированный на колонке аффинности к CH1, элюировали пятью объемами колонки 100 мМ глицинового буферного раствора (pH: 3,0), содержащего 50 мМ NaCl. Элюат сразу нейтрализовали путем добавления элюата в контейнер, в который заранее подавали 1 М буферного раствора HEPES-NaOH (pH: 7,5). полученный таким образом продукт в следующих экспериментах использовали в качестве продукта очистки Fab GS-GAA.

Пример 32. Оценка фармакологического действия Fab GS-GAA у мышей.

Мышам (мыши GAA-KO/hTfR-KI), описанным в примере 28, внутривенно вводили Fab GS-GAA, полученный в примере 31, или hGAA в соответствии с применением и дозировкой, описанными в табл. 19-2. Нормальных мышей, которым не вводили фармацевтическое средство, классифицировали как нормальный контроль (первая группа), а мышей GAA-KO/hTfR-KI, которым не вводили фармацевтическое средство, классифицировали как контроль заболевания (вторая группа). В каждую группу, входило три или четыре мыши. Кроме того, использовали самцов и самок мышей, возраст которых составлял 9-14 недель (в начале введения). Через одну неделю после введения правое полушарие головного мозга, сердце, диафрагму, четырехглавую мышцу бедра, камбаловидную мышцу и прямую мышцу бедра собирали посредством способа описанного в примере 29, измеряли концентрацию гликогена, содержащегося в тканях каждого из органов. Результаты измерения показаны на фиг. 12. По сравнению с группой мышей,

которым вводили hGAA, группа мышей, которым вводили Fab GS-GAA, демонстрировали заметное уменьшение концентрации гликогена во всех органах, в которых измеряли концентрацию гликогена. Группа мышей, которым вводили Fab GS-GAA, показывали особенно заметное уменьшение концентрации гликогена в правом полушарии головного мозга и сердце. Кроме того, группа мышей, которым вводили Fab GS-GAA в дозировке 5,0 мг/кг, демонстрировали заметное уменьшение концентрации гликогена в правом полушарии головного мозга и сердце по сравнению с группой мышей, которым вводили hGAA в дозировке 20 мг/кг. Эти результаты показывают, что Fab GS-GAA можно использовать в качестве терапевтического средства для болезни Помпе, особенно в качестве терапевтического средства для болезни Помпе, сопровождающейся нарушением функции головного мозга и/или сердца.

Таблица 19-2. Группирование мышей

Группа	Тестируемое вещество	Мышь	Дозировка (мг/кг)
1	–	Нормальная мышь	–
2	–	Мышь GAA-KO/hTfR-KI	–
3	hGAA	Мышь GAA-KO/hTfR-KI	20
4	Fab GS-GAA	Мышь GAA-KO/hTfR-KI	5,0
5			20

Пример 33. Получение белков слияния между разными человеческими лизосомальными ферментами и гуманизированными антителами против hTfR.

Искусственно синтезировали фрагмент ДНК, который имел нуклеотидную последовательность, содержащую ген, кодирующий белки слияния между различными человеческими лизосомальными ферментами и тяжелой цепью гуманизированного антитела против hTfR (примечание: когда белком слияния был scFab-IDUA, экспрессирующим вектором было одноцепочечное гуманизированное антитело против hTfR). Эти белки слияния имеют аминокислотные последовательности, показанные как SEQ ID NONS, показанные в таблицах 20-A - 20-C, и обозначены в столбце "обозначение белка слияния" в табл. 20-A - 20-C. Для получения экспрессирующего вектора синтезированный фрагмент ДНК вставляли в вектор pE-пео между его MluI и NotI. В данном случае в ген, кодирующий слитый белок, на 5'-терминальной стороне гена вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерный пептид, выступающий в качестве сигнала секреции. Обозначения экспрессирующих векторов показаны в табл. 20-A - 20-C. Для получения клеточной линии, экспрессирующей белки слияния между различными лизосомальными ферментами и гуманизированными антителами против hTfR клетки CHO (CHO-K1: купленные у американской коллекции типовых культур) трансформировали с помощью каждого полученного экспрессирующего вектора и pE-hygr (LC3), полученного в примере 11. Супернатант культуры получали путем культивирования экспрессирующей клеточной линии согласно описанному в примере 22 способу.

Белки слияния между лизосомальным ферментом и гуманизированным антителом против hTfR, которые содержались в супернатанте культуры, получали посредством следующего способа 1 очистки белков, имеющих в качестве антитела Fab, и посредством следующего способа 2 очистки белков с антителом, содержащим полноразмерную тяжелую цепь.

Способ 1 очистки: супернатант культуры загружали на колонку CaptureSelect IgG-CH1, представляющую собой колонку аффинности к CH1 (объем колонки: приблизительно 1,0 мл, Thermo Fisher Scientific Inc.), которую уравнивали пятью объемами колонки 20 mM буферного раствора HEPES-NaOH (pH: 7,0), содержащего 100 mM NaCl, для адсорбции белка слияния на колонке аффинности к CH1. Затем колонку промывали путем подачи пяти объемов колонки 20 mM буферного раствора HEPES-NaOH (pH: 7,0), содержащего 100 mM NaCl. Затем слитый белок, адсорбированный на колонке аффинности к CH1, элюировали пятью объемами колонки 100 mM глицинового буферного раствора (pH: 3,0), содержащего 50 mM NaCl. Элюат сразу нейтрализовали путем добавления элюата в контейнер, в который заранее подавали 1 M буферного раствора HEPES-NaOH (pH: 7,5).

Способ 2 очистки: супернатант культуры загружали на колонку MabSelect SuRe LX, представляющую собой колонку аффинности к белку (объем колонки: приблизительно 1,0 мл, GE Healthcare Inc.), которую уравнивали пятью объемами колонки 20 mM буферного раствора HEPES-NaOH (pH: 7,0), содержащего 100 mM NaCl, для адсорбции белка слияния белком А. Затем колонку промывали путем подачи пяти объемов колонки 20 mM буферного раствора HEPES-NaOH (pH: 7,0), содержащего 100 mM NaCl. Затем слитый белок, адсорбированный белком, элюировали пятью объемами колонки 100 mM глицинового буферного раствора (pH: 3,0), содержащего 50 mM NaCl. Элюат сразу нейтрализовали путем добавления элюата в контейнер, в который заранее подавали 1 M буферного раствора HEPES-NaOH (pH: 7,5).

Используя полученные таким образом продукты очистки белков слияния, проводили следующее эксперименты. Кроме того, полученные таким образом белки слияния между лизосомальными ферментами и гуманизированными антителами против hTfR обозначали, как показано в самой правой колонке в табл. 20-A - 20-C.

Таблица 20(А). Список белков слияния между различными человеческими лизосомальными ферментами и гуманизированными антителами против hTfR

Обозначение лизосом	SEQ ID NO	Обозначение белка слияния	Обозначение экспрессирующего вектора	Вектор экспрессии легкой цепи	Обозначение белка слияния лизосомальный фермент-гуманизированное антитело против hTfR
hGAA	89	Fab HC-GS3-GAA	pE-neo (Fab HC-GS3-GAA)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-GAA
hIDUA	90	IgG4 HC-IDUA	pE-neo (IgG4 HC-IDUA)	pE-hygr (LC3)	IgG4 IDUA
	91	IgG4 HC-GS8-IDUA	pE-neo (IgG4 HC-GS8-IDUA)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS8-IDUA
	92	IgG4 HC-GS20-IDUA	pE-neo (IgG4 HC-GS20-IDUA)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS20-IDUA
	93	Fab HC-GS3-IDUA	pE-neo (Fab HC-GS3-IDUA)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-IDUA
	94	Fab HC-GS5-IDUA	pE-neo (Fab HC-GS5-IDUA)	pE-hygr (LC3)	Fab GS5-IDUA
	95	Fab HC-GS10-IDUA	pE-neo (Fab HC-GS10-IDUA)	pE-hygr (LC3)	Fab GS10-IDUA
	96	Fab HC-GS20-IDUA	pE-neo (Fab HC-GS20-IDUA)	pE-hygr (LC3)	Fab GS20-IDUA
	97	Tandem Fab HC-IDUA	pE-neo (Tandem Fab HC-IDUA)	pE-hygr (LC3)	Tandem Fab IDUA
	99	scFab-IDUA	pE-neo (scFab-IDUA)	-	scFab-IDUA
hPPT-1	100	IgG4 HC-PPT1	pE-neo (IgG4 HC-	pE-hygr (LC3)	IgG4 PPT1

			PPT1)		
	101	IgG4 HC-GS5-PPT1	pE-neo (IgG4 HC-GS5-PPT1)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS5-PPT1
	102	IgG4 HC-GS10-PPT1	pE-neo (IgG4 HC-GS10-PPT1)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS10-PPT1
	103	IgG4 HC-GS20-PPT1	pE-neo (IgG4 HC-GS20-PPT1)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS20-PPT1
	104	Fab HC-GS3-PPT1	pE-neo (Fab HC-GS3-PPT1)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-PPT1
	105	Tandem Fab HC-PPT1	pE-neo (Tandem Fab HC-PPT1)	pE-hygr (LC3)	Tandem Fab PPT1
haSM	106	IgG4 HC-ASM	pE-neo (IgG4 HC-ASM)	pE-hygr (LC3)	IgG4 ASM
	107	IgG4 HC-GS5-ASM	pE-neo (IgG4 HC-GS5-ASM)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS5-ASM
	108	IgG4 HC-GS10-ASM	pE-neo (IgG4 HC-GS10-ASM)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS10-ASM
	109	IgG4 HC-GS20-ASM	pE-neo (IgG4 HC-GS20-ASM)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS20-ASM
	110	Fab HC-GS3-ASM	pE-neo (Fab HC-GS3-ASM)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-ASM
	111	Fab HC-GS5-ASM	pE-neo (Fab HC-GS5-ASM)	pE-hygr (LC3)	Fab GS5-ASM
	112	Fab HC-GS10-ASM	pE-neo (Fab HC-GS10-ASM)	pE-hygr (LC3)	Fab GS10-ASM
	113	Fab HC-GS20-ASM	pE-neo (Fab HC-GS20-ASM)	pE-hygr (LC3)	Fab GS20-ASM
	114	Tandem Fab HC-ASM	pE-neo (Tandem Fab HC-ASM)	pE-hygr (LC3)	Tandem Fab ASM
hARSA	115	IgG4 HC-ARSA	pE-neo (IgG4 HC-ARSA)	pE-hygr (LC3)	IgG4 ARSA
	116	IgG4 HC-GS5-ARSA	pE-neo (IgG4 HC-GS5-ARSA)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS5-ARSA
	117	IgG4 HC-GS10-ARSA	pE-neo (IgG4 HC-GS10-ARSA)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS10-ARSA
	118	IgG4 HC-GS20-ARSA	pE-neo (IgG4 HC-GS20-ARSA)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS20-ARSA
	119	Fab HC-GS3-ARSA	pE-neo (Fab HC-GS3-ARSA)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-ARSA
	120	Fab HC-GS5-ARSA	pE-neo (Fab HC-GS5-ARSA)	pE-hygr (LC3)	Fab GS5-ARSA
	121	Fab HC-GS10-ARSA	pE-neo (Fab HC-GS10-ARSA)	pE-hygr (LC3)	Fab GS10-ARSA
	122	Fab HC-GS20-ARSA	pE-neo (Fab HC-GS20-ARSA)	pE-hygr (LC3)	Fab GS20-ARSA
	123	Tandem Fab HC-ARSA	pE-neo (Tandem Fab HC-ARSA)	pE-hygr (LC3)	Tandem Fab ARSA

Таблица 20(В). Список белков слияния между различными человеческими лизосомальными ферментами и гуманизированными антителами против hTfR

Обозначение лизосом	SEQ ID NO	Обозначение белка слияния	Обозначение экспрессирующего вектора	Вектор экспрессии легкой цепи	Обозначение белка слияния лизосомальный фермент-гуманизированное антитело против hTfR
hSGSH	124	IgG4 HC-SGSH	pE-neo (IgG4 HC-SGSH)	pE-hygr (LC3)	IgG4 SGSH
	125	IgG4 HC-GS5-SGSH	pE-neo (IgG4 HC-GS5-SGSH)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS5-SGSH
	126	IgG4 HC-GS10-SGSH	pE-neo (IgG4 HC-GS10-SGSH)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS10-SGSH
	127	IgG4 HC-GS20-SGSH	pE-neo (IgG4 HC-GS20-SGSH)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS20-SGSH
	128	Fab HC-GS3-SGSH	pE-neo (Fab HC-GS3-SGSH)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-SGSH
	129	Tandem Fab HC-SGSH	pE-neo (Tandem Fab HC-SGSH)	pE-hygr (LC3)	Tandem Fab SGSH
hGBA	130	IgG4 HC-GBA	pE-neo (IgG4 HC-GBA)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GBA
	131	IgG4 HC-GS5-GBA	pE-neo (IgG4 HC-GS5-GBA)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS5-GBA
	132	IgG4 HC-GS10-GBA	pE-neo (IgG4 HC-GS10-GBA)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS10-GBA
	133	IgG4 HC-GS20-GBA	pE-neo (IgG4 HC-GS20-GBA)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS20-GBA
	134	Fab HC-GS3-GBA	pE-neo (Fab HC-GS3-GBA)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-GBA
	135	Tandem Fab HC-GBA	pE-neo (Tandem Fab HC-GBA)	pE-hygr (LC3)	Tandem Fab GBA

hTPP-1	136	IgG4 HC-TPP1	pE-neo (IgG4 HC-TPP1)	pE-hygr (LC3)	IgG4 TPP1
	137	IgG4 HC-GS5-TPP1	pE-neo (IgG4 HC-GS5-TPP1)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS5-TPP1
	138	IgG4 HC-GS10-TPP1	pE-neo (IgG4 HC-GS10-TPP1)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS10-TPP1
	139	IgG4 HC-GS20-TPP1	pE-neo (IgG4 HC-GS20-TPP1)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS20-TPP1
	140	Fab HC-GS3-TPP1	pE-neo (Fab HC-GS3-TPP1)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-TPP1
	141	Tandem Fab HC-TPP1	pE-neo (Tandem Fab HC-TPP1)	pE-hygr (LC3)	Tandem Fab TPP1
hNAGLU	142	IgG4 HC-NAGLU	pE-neo (IgG4 HC-NAGLU)	pE-hygr (LC3)	IgG4 NAGLU
	143	IgG4 HC-GS5-NAGLU	pE-neo (IgG4 HC-GS5-NAGLU)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS5-NAGLU
	144	IgG4 HC-GS10-NAGLU	pE-neo (IgG4 HC-GS10-NAGLU)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS10-NAGLU
	145	IgG4 HC-GS20-NAGLU	pE-neo (IgG4 HC-GS20-NAGLU)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS20-NAGLU
	146	Fab HC-GS3-NAGLU	pE-neo (Fab HC-GS3-NAGLU)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-NAGLU
	147	Fab HC-GS5-NAGLU	pE-neo (Fab HC-GS5-NAGLU)	pE-hygr (LC3)	Fab GS5-NAGLU
	148	Fab HC-GS10-NAGLU	pE-neo (Fab HC-GS10-NAGLU)	pE-hygr (LC3)	Fab GS10-NAGLU
	149	Fab HC-GS20-NAGLU	pE-neo (Fab HC-GS20-NAGLU)	pE-hygr (LC3)	Fab GS20-NAGLU
hGUSB	150	IgG4 HC-GUSB	pE-neo (IgG4 HC-GUSB)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GUSB
	151	IgG4 HC-GS5-GUSB	pE-neo (IgG4 HC-GS5-GUSB)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS5-GUSB
	152	IgG4 HC-GS10-GUSB	pE-neo (IgG4 HC-GS10-GUSB)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS10-GUSB
	153	IgG4 HC-GS20-GUSB	pE-neo (IgG4 HC-GS20-GUSB)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS20-GUSB
	154	Fab HC-GS3-GUSB	pE-neo (Fab HC-GS3-GUSB)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-GUSB
	155	Fab HC-GS5-GUSB	pE-neo (Fab HC-GS5-GUSB)	pE-hygr (LC3)	Fab GS5-GUSB
	156	Fab HC-GS10-GUSB	pE-neo (Fab HC-GS10-GUSB)	pE-hygr (LC3)	Fab GS10-GUSB
		GUSB	GS10-GUSB)		
	157	Fab HC-GS20-GUSB	pE-neo (Fab HC-GS20-GUSB)	pE-hygr (LC3)	Fab GS20-GUSB

Таблица 20(С). Список белков слияния между различными человеческими лизосомальными ферментами и гуманизированными антителами против hTfR

Обозначение лизосом	SEQ ID NO	Обозначение белка слияния	Обозначение экспрессирующего вектора	Вектор экспрессии легкой цепи	Обозначение белка слияния лизосомальный фермент-гуманизированное антитело против hTfR
hGALC	158	IgG4 HC-GALC	pE-neo (IgG4 HC-GALC)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GALC
	159	IgG4 HC-GS5-GALC	pE-neo (IgG4 HC-GS5-GALC)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS5-GALC
	160	IgG4 HC-GS10-GALC	pE-neo (IgG4 HC-GS10-GALC)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS10-GALC
	161	IgG4 HC-GS20-GALC	pE-neo (IgG4 HC-GS20-GALC)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS20-GALC
	162	Fab HC-GS3-GALC	pE-neo (Fab HC-GS3-GALC)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-GALC
	163	Fab HC-GS5-GALC	pE-neo (Fab HC-GS5-GALC)	pE-hygr (LC3)	Fab GS5-GALC
	164	Fab HC-GS10-GALC	pE-neo (Fab HC-GS10-GALC)	pE-hygr (LC3)	Fab GS10-GALC
	165	Fab HC-GS20-GALC	pE-neo (Fab HC-GS20-GALC)	pE-hygr (LC3)	Fab GS20-GALC
hAC	166	IgG4 HC-AC	pE-neo (IgG4 HC-AC)	pE-hygr (LC3)	IgG4 AC
	167	IgG4 HC-GS5-AC	pE-neo (IgG4 HC-GS5-AC)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS5-AC
	168	IgG4 HC-GS10-AC	pE-neo (IgG4 HC-GS10-AC)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS10-AC
	169	IgG4 HC-GS20-AC	pE-neo (IgG4 HC-GS20-AC)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS20-AC
	170	Fab HC-GS3-AC	pE-neo (Fab HC-GS3-AC)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-AC
	171	Fab HC-GS5-AC	pE-neo (Fab HC-GS5-AC)	pE-hygr (LC3)	Fab GS5-AC

	172	Fab HC-GS10-AC	pE-neo (Fab HC-GS10-AC)	pE-hygr (LC3)	Fab GS10-AC
	173	Fab HC-GS20-AC	pE-neo (Fab HC-GS20-AC)	pE-hygr (LC3)	Fab GS20-AC
hFUCA1	174	IgG4 HC-FUCA1	pE-neo (IgG4 HC-FUCA1)	pE-hygr (LC3)	IgG4 FUCA1
	175	IgG4 HC-GS5-FUCA1	pE-neo (IgG4 HC-GS5-FUCA1)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS5-FUCA1
	176	IgG4 HC-GS10-FUCA1	pE-neo (IgG4 HC-GS10-FUCA1)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS10-FUCA1
	177	IgG4 HC-GS20-FUCA1	pE-neo (IgG4 HC-GS20-FUCA1)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS20-FUCA1
	178	Fab HC-GS3-FUCA1	pE-neo (Fab HC-GS3-FUCA1)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-FUCA1
	179	Fab HC-GS5-FUCA1	pE-neo (Fab HC-GS5-FUCA1)	pE-hygr (LC3)	Fab GS5-FUCA1
	180	Fab HC-GS10-FUCA1	pE-neo (Fab HC-GS10-FUCA1)	pE-hygr (LC3)	Fab GS10-FUCA1
	181	Fab HC-GS20-FUCA1	pE-neo (Fab HC-GS20-FUCA1)	pE-hygr (LC3)	Fab GS20-FUCA1
hLAMAN	182	IgG4 HC-LAMAN	pE-neo (IgG4 HC-LAMAN)	pE-hygr (LC3)	IgG4 LAMAN
	183	IgG4 HC-GS5-LAMAN	pE-neo (IgG4 HC-GS5-LAMAN)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS5-LAMAN
	184	IgG4 HC-GS10-LAMAN	pE-neo (IgG4 HC-GS10-LAMAN)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS10-LAMAN
	185	IgG4 HC-GS20-LAMAN	pE-neo (IgG4 HC-GS20-LAMAN)	pE-hygr (LC3)	IgG4 GS20-LAMAN
	186	Fab HC-GS3-LAMAN	pE-neo (Fab HC-GS3-LAMAN)	pE-hygr (LC3)	Fab GS3-LAMAN
	187	Fab HC-GS5-LAMAN	pE-neo (Fab HC-GS5-LAMAN)	pE-hygr (LC3)	Fab GS5-LAMAN
	188	Fab HC-GS10-LAMAN	pE-neo (Fab HC-GS10-LAMAN)	pE-hygr (LC3)	Fab GS10-LAMAN
	189	Fab HC-GS20-LAMAN	pE-neo (Fab HC-GS20-LAMAN)	pE-hygr (LC3)	Fab GS20-LAMAN

Пример 34. Измерение аффинности белков слияния между различными человеческими лизосомальными ферментами и гуманизированными антителами против hTfR к TfR человека и TfR обезьяны и ферментативной активности белков слияния.

Аффинность к TfR человека и TfR обезьяны измеряли посредством описанного в примере 7 способа. Активность человеческого лизосомального фермента измеряли посредством способа описанного ниже. Однако ферментативную активность hAC и hLAMAN не измеряли.

Измерение активности hIDUA.

Очищенный слитый белок антитела против TfR hIDUA разводили до нужной концентрации с помощью 50 мМ цитратного буферного раствора (pH: 3,5), содержащего 0,1% BSA, и в каждую лунку добавляли 20 мкл полученного в результате разведения планшета FluoroNunc F96 (Nunc Inc.). В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон (4MU) (Sigma Inc.). Далее в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил α -L-идуронид (glycosynth Inc.) разводили до 1 мМ описанным выше буферным раствором, и в каждую лунку добавляли 60 мкл полученного в результате разведения. Смесь встряхивали пластинчатым миксером, а затем проводили реакцию при 37°C в течение 1 часа. После реакции для остановки реакции в каждую лунку добавляли 200 мкл 0,05 М буферного раствора глицин/NaOH (pH: 10,6), и проводили измерение при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны детектирования 460 нм по-

средством планшет-ридера. Определяли ферментативную активность в показателях специфической активности на массу единицы белка (мг), причем одну единицу определяют как 4 MU мкмоль/минуту при 37°C. Для следующих белков слияния также определяли специфическую активность.

Измерение активности hPPT-1.

β -глюкозидазу (Oriental Yeast Co., Ltd.) разводили до 0,25 мг/мл с помощью 0,4 М Na_2HPO_4 /0,2 М цитратного буферного раствора (pH: 4,0), содержащего 0,2% BSA и 0,00625% Triton X-100, и в каждую лунку планшета FluoroNunc F96 (Nunc Inc.) добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. Далее очищенный слитый белок антитела против TfR hPPT-1 разводили до нужной концентрации описанным выше буферным раствором, и в каждую лунку добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон (4MU) (Sigma Inc.). Далее в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил 6-тио-пальмитат- β -D-глюкопиранозид (Santa Cruz Biotechnology Inc.) разводили до 0,25 мМ описанным выше буферным раствором, и в каждую лунку добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. Смесь встряхивали пластинчатым миксером, а затем проводили реакцию при 37°C в течение 1 часа. После реакции в каждую лунку для остановки реакции добавляли 150 мкл 0,05 М буферного раствора глицин/NaOH (pH: 10,6), и проводили измерение при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны детектирования 460 нм посредством планшет-ридера. Определяли ферментативную активность, причем одну единицу определяют как 4 MU мкмоль/минуту при 37°C. Измерение активности haSM:

Очищенный слитый белок антитела против TfR haSM разводили до нужной концентрации 250 мМ ацетатного буферного раствора (pH: 5,0), содержащего 0,1 мМ ацетата цинка, 0,25 мг/мл BSA и 0,15% Tween 20, и в каждую лунку планшета FluoroNunc F96 (Nunc Inc.) добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон (4MU) (Sigma Inc.). Далее в качестве субстрата б-гексадеканоиламино-4-метилумбеллиферил фосфорилхолин (Carbosynth Inc.) разводили до 1 мМ описанным выше буферным раствором, и в каждую лунку добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. Смесь встряхивали пластинчатым миксером, а затем проводили реакцию при 37°C в течение 1 часа. После реакции для остановки реакции в каждую лунку добавляли 200 мкл 0,05 М буферного раствора глицин/NaOH (pH: 10,6), и проводили измерение при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны детектирования 460 нм посредством планшет-ридера. Определяли ферментативную активность в показателях специфической активности на массу единицы белка (мг), причем одну единицу определяют как 4 MU мкмоль/минуту при 37°C.

Измерение активности hARSA.

Очищенный слитый белок антитела против TfR hARSA разводили до нужной концентрации 50 мМ ацетатного буферного раствора (pH: 5,0), содержащего 0,5% BSA и 1,0% Triton-X 100, и в каждую лунку планшета FluoroNunc F96 (Nunc Inc.) добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон (4MU) (Sigma Inc.). Далее в качестве субстрата соль 4-метилумбеллиферил сульфата калия (Sigma Inc.) разводили до 5 мМ описанным выше буферным раствором, и в каждую лунку добавляли 100 мкл полученного в результате разведения. Смесь встряхивали пластинчатым миксером, а затем проводили реакцию при 37°C в течение 1 часа. После реакции в каждую лунку для остановки реакции добавляли 150 мкл 0,05 М буферного раствора глицин/NaOH (pH: 10,6), и проводили измерение при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны детектирования 460 нм посредством планшет-ридера. Определяли ферментативную активность, причем одну единицу определяют как 4 MU мкмоль/минуту при 37°C.

Измерение активности hSGSH.

Очищенный слитый белок антитела против TfR hSGSH разводили до нужной концентрации 50 мМ ацетатного буферного раствора (pH: 5,0), содержащего 0,2% BSA, и в каждую лунку планшета FluoroNunc F96 (Nunc Inc.) добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон (4MU) (Sigma Inc.). Далее в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил 2-деокси-2-сульфамино- α -D-глюкопиранозид (Carbosynth Inc.) разводили до 5 мМ описанным выше буферным раствором, и в каждую лунку добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. Смесь встряхивали пластинчатым миксером, а затем проводили реакцию при 37°C в течение 2 часов. После реакции 0,5 мг/мл α -глюкозидазы (Oriental Yeast Co., Ltd.) разводили описанным выше буферным раствором, в каждую лунку добавляли 20 мкл полученного в результате разведения, и реакцию смеси проводили при 37°C в течение 17 часов. После реакции в каждую лунку для остановки реакции добавляли 150 мкл 0,05 М буферного раствора глицин/NaOH (pH: 10,6), и проводили измерение при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны детектирования 460 нм посредством планшет-ридера. Определяли ферментативную активность, причем одну единицу определяют как 4 MU мкмоль/минуту при 37°C.

Измерение активности hGBA:

Очищенный слитый белок антитела против TfR hGBA разводили до нужной концентрации 100 мМ фосфатного буферного раствора (pH: 6,0), содержащего 0,1% BSA, 0,15% Triton-X 100 и 0,125% таурохолат натрия, и в каждую лунку планшета FluoroNunc F96 (Nunc Inc.) добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон (4MU) (Sigma Inc.).

Далее в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил p-D-глюкопиранозид (Sigma Inc.) разводили до 3,5 мМ описанным выше буферным раствором, и в каждую лунку добавляли 70 мкл полученного в результате разведения. Смесь встряхивали пластинчатым миксером, а затем проводили реакцию при 37°C в течение 1 часа. После реакции в каждую лунку для остановки реакции добавляли 150 мкл 0,05 М буферного раствора глицин/NaOH (pH: 10,6), и проводили измерение при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны детектирования 460 нм посредством планшет-ридера. Определяли ферментативную активность, причем одну единицу определяют как 4 MU мкмоль/минуту при 37°C.

Измерение активности hTRP-1.

Очищенный слитый белок антитела против TfR hTRP-1 разводили до нужной концентрации 50 мМ буферного раствора формиата натрия (pH: 3,5), содержащего 150 мМ NaCl и 0,1% Triton-X 100, и полученное в результате разведение предварительно инкубировали при 37°C в течение 1 часа, в качестве стандарта использовали 7-амино-4-метикумарин (AMC) (Sigma Inc.), и обрабатывали аналогичным образом. Спустя 1 час в каждую лунку планшета FluoroNunc F96 (Nunc Inc.) добавляли 20 мкл разведения. Далее в качестве субстрата Ala-Ala-Phe-7-амидо-4-метикумарин (Sigma Inc.) разводили до 25 мМ с помощью 100 мМ ацетатного буферного раствора (pH: 4,0), содержащего 150 мМ NaCl и 0,1% Triton-X 100, и в каждую лунку добавляли 40 мкл полученного в результате разведения. Смесь встряхивали пластинчатым миксером, а затем проводили реакцию при 37°C в течение 1 часа. После реакции для остановки реакции в каждую лунку добавляли 150 мкл 100 мМ монохлорацетата/130 мМ NaOH/100 мМ ацетатного буферного раствора (pH: 4,3), и проводили измерение при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны детектирования 460 нм посредством планшет-ридера. Определяли ферментативную активность, причем одну единицу определяют как AMC мкмоль/минуту при 37°C.

Измерение активности hGAA.

Очищенный слитый белок антитела против TfR hGAA разводили до нужной концентрации PBS (-) (pH: 7,2), содержащего 0,5% BSA, и в каждую лунку планшета FluoroNunc F96 (Nunc Inc.) добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон (4MU) (Sigma Inc.). Далее в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил a-D-глюкопиранозид (Sigma Inc.) разводили до 2,2 мМ с помощью 200 мМ ацетатного буферного раствора (pH: 4,3), и в каждую лунку добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. Смесь встряхивали пластинчатым миксером, а затем проводили реакцию при 37°C в течение 1 часа. После реакции для остановки реакции в каждую лунку добавляли 200 мкл 0,05 М буферного раствора глицин/NaOH (pH: 10,6), и проводили измерение при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны детектирования 460 нм посредством планшет-ридера. Определяли ферментативную активность, причем одну единицу определяют как 4 MU мкмоль/минуту при 37°C. Измерение активности hNAGLU:

Очищенный слитый белок антитела против TfR hNAGLU разводили до нужной концентрации 50 мМ ацетатного буферного раствора (pH: 4,3), содержащего 0,1% BSA, и в каждую лунку планшета FluoroNunc F96 (Nunc Inc.) добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон (4MU) (Sigma Inc.). Далее в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил N-ацетил-α-D-глюкозаминид (Calbiochem) разводили до 1 мМ описанным выше буферным раствором, и в каждую лунку добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. Смесь встряхивали пластинчатым миксером, а затем проводили реакцию при 37°C в течение 1 часа. После реакции в каждую лунку для остановки реакции добавляли 150 мкл 0,05 М буферного раствора глицин/NaOH (pH: 10,6), и проводили измерение при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны детектирования 460 нм посредством планшет-ридера. Определяли ферментативную активность, причем одну единицу определяют как 4 MU мкмоль/минуту при 37°C.

Измерение активности hGUSB.

Очищенный слитый белок антитела против TfR hGUSB разводили до нужной концентрации 25 мМ ацетатного буферного раствора (pH: 4,5), содержащего 50 мМ NaCl, и в каждую лунку планшета FluoroNunc F96 (Nunc Inc.) добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон (4MU) (Sigma Inc.). Далее в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил β-D-глюкуронид гидрат (Sigma Inc.) разводили до 2 мМ описанным выше буферным раствором, и в каждую лунку добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. Смесь встряхивали пластинчатым миксером, а затем проводили реакцию при 37°C в течение 1 часа. После реакции в каждую лунку для остановки реакции добавляли 150 мкл 0,05 М буферного раствора глицин/NaOH (pH: 10,6), и проводили измерение при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны детектирования 460 нм посредством планшет-ридера. Определяли ферментативную активность, причем одну единицу определяют как 4 MU мкмоль/минуту при 37°C.

Измерение активности hGALC.

Очищенный слитый белок антитела против TfR GALC разводили до нужной концентрации 50 мМ ацетатного буферного раствора (pH: 4,5), содержащего 125 мМ NaCl и 0,5% Triton X-100, и в каждую лунку планшета FluoroNunc F96 (Nunc Inc.) добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон (4MU) (Sigma Inc.). Далее в качестве субстрата

4-метилумбеллиферил-β-D-галактопиранозид (Sigma Inc.) разводили до 1 мМ описанным выше буферным раствором, и в каждую лунку добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. Смесь встряхивали пластинчатым миксером, а затем проводили реакцию при 37°C в течение 1 часа. После реакции в каждую лунку для остановки реакции добавляли 150 мкл 0,05 М буферного раствора глицин/NaOH (pH: 10,6), и проводили измерение при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны детектирования 460 нм посредством планшет-ридера. Определяли ферментативную активность, причем одну единицу определяют как 4 MU мкмоль/минуту при 37°C.

Измерение активности hFUCA1.

Очищенный слитый белок антитела против TfR FUCA1 разводили до нужной концентрации 100 мМ цитратного буферного раствора (pH: 5,5), содержащего 0,2% BSAI, и в каждую лунку планшета FluoroNunc F96 (Nunc Inc.) добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон (4MU) (Sigma Inc.). Далее в качестве субстрата 4-MU-α-L-фукопиранозид (Sigma Inc.) разводили до 2 мМ описанным выше буферным раствором, и в каждую лунку добавляли 20 мкл полученного в результате разведения. Смесь встряхивали пластинчатым миксером, а затем проводили реакцию при 37°C в течение 1 часа. После реакции в каждую лунку для остановки реакции добавляли 150 мкл 0,05 М буферного раствора глицин/NaOH (pH: 10,6), и проводили измерение при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны детектирования 460 нм посредством планшет-ридера. Определяли ферментативную активность, причем одну единицу определяют как 4 MU мкмоль/минуту при 37°C.

Табл. 21 показывает измерения аффинности белков слияния между различными человеческими лизосомальными ферментами и гуманизированными антителами против hTfR к TfR человека и TfR обезьяны, и ферментативной активности белков слияния. Аффинность и ферментативную активность измеряли только для некоторых белков слияния между лизосомальными ферментами и гуманизированным антителом против hTfR, которые получали в примере 33. Конкретно, аффинность к TfR человека и TfR обезьяны измеряли для 24 типов белков слияния, а ферментативную активность измеряли для 20 типов белков слияния.

Каждый из белков слияния, ферментативную активность которых измеряли, обладал ферментативной активностью в качестве лизосомального фермента. Кроме того, каждый из белков слияния, аффинность которых к TfR человека измеряли, обладал высокой аффинностью к TfR человека, даже те, которые обладали самой низкой аффинностью, показывали значение K_D $2,09 \times 10^{-10}$, а 19 типов белков слияния показывали значение K_D ниже, чем $1,00 \times 10^{-12}$. Кроме того, каждый из белков слияния, аффинность которых к TfR обезьяны измеряли, обладал высокой аффинностью к TfR обезьяны, даже те, которые обладали самой низкой аффинностью, показывали значение K_D $3,05 \times 10^{-8}$, а 12 типов белков слияния показывали значение K_D ниже, чем $1,00 \times 10^{-12}$.

Используемым в данном случае антителом против hTfR является антитело, тяжелая цепь которого представляет собой тяжелую цепь (IgG), имеющую в качестве варибельной области аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, или тяжелую цепь Fab, и легкая цепь которого имеет в качестве варибельной области аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. Эти результаты показывают, что за счет приведения лизосомального фермента в форму белка слияния между лизосомальным ферментом и антителом, содержащим эти аминокислотные последовательности в качестве варибельных областей, можно обеспечить прохождение лизосомального фермента через BBB посредством TfR человека и проявить его ферментативную активность в головном мозге.

Таблица 21. Аффинность белков слияния между различными человеческими лизосомальными ферментами и гуманизированными антителами против hTfR к TfR человека и TfR обезьяны и ферментативная активность белков слияния

Обозначение белка слияния лизосомальный фермент-гуманизированное антитело против hTfR	Специфическая ферментативная активность (Единица/мг)	Аффинность к TfR человека и TfR обезьяны			
		Тип	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
Fab-GS3-GAA	4,81	TfR человека	$5,95 \times 10^5$	$3,39 \times 10^{-4}$	$2,09 \times 10^{-10}$
		TfR обезьяны	$4,73 \times 10^5$	$1,45 \times 10^{-2}$	$3,05 \times 10^{-5}$
IgG4-IDUA	1,55	TfR человека	$9,80 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$5,61 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
IgG4-GS20-IDUA	1,37	TfR человека	$9,24 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$

		TfR обезьяны	$4,81 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
Fab-GS3-IDUA	1,7	TfR человека	$2,93 \times 10^5$	$5,28 \times 10^{-5}$	$1,08 \times 10^{-11}$
		TfR обезьяны	$2,21 \times 10^5$	$2,92 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-2}$
IgG4-PPT1	9,4	TfR человека	$7,37 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$3,07 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
Fab-GS3-PPT1	9,1	TfR человека	$4,17 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$9,53 \times 10^4$	$9,13 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-2}$
Fab-GS3-ASM	0,105	TfR человека	$5,26 \times 10^5$	$3,63 \times 10^{-5}$	$6,89 \times 10^{-11}$
		TfR обезьяны	$2,74 \times 10^5$	$5,49 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-2}$
IgG4-GS10-ARSA	0,72	TfR человека	$4,60 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$1,69 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
Fab-GS3-ARSA	0,55	TfR человека	$6,70 \times 10^5$	$4,02 \times 10^{-5}$	$6,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$2,58 \times 10^5$	$2,81 \times 10^{-4}$	$1,09 \times 10^{-2}$
Fab-GS3-SGSH	0,068	TfR человека	$7,21 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$3,88 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
IgG4-GS10-GBA	7,0	TfR человека	$9,57 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$4,49 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
Fab-GS3-GBA	9,2	TfR человека	$6,23 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$2,99 \times 10^5$	$1,42 \times 10^{-5}$	$4,75 \times 10^{-2}$
IgG4-TPP1	0,26	TfR человека	$7,58 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$3,41 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
IgG4-GS20-TPP1	0,21	TfR человека	$6,82 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$3,02 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
Fab-GS3-NAGLU	Не измеряли	TfR человека	$2,91 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$1,54 \times 10^5$	$4,02 \times 10^{-4}$	$2,62 \times 10^{-2}$
Fab-GS3-GUSB	8,49	TfR человека	$4,49 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$2,50 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
IgG4-GS10-GALC	0,35	TfR человека	$3,14 \times 10^4$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$2,80 \times 10^4$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
Fab-GS3-GALC	1,1	TfR человека	$2,24 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$1,11 \times 10^5$	$1,54 \times 10^{-4}$	$1,40 \times 10^{-2}$
IgG4-GS10-AC	Не измеряли	TfR человека	$5,76 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$3,01 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
Fab-GS3-AC	Не измеряли	TfR человека	$5,01 \times 10^5$	$1,05 \times 10^{-4}$	$2,09 \times 10^{-10}$
		TfR обезьяны	$2,77 \times 10^5$	$3,27 \times 10^{-5}$	$1,18 \times 10^{-5}$
IgG4-GS10-FUCA1	24,2	TfR человека	$4,66 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$2,46 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
Fab-GS3-FUCA1	27,6	TfR человека	$2,82 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$1,51 \times 10^5$	$4,88 \times 10^{-5}$	$3,23 \times 10^{-10}$
Fab-GS3-LAMAN	Не измеряли	TfR человека	$7,29 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$
		TfR обезьяны	$3,57 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^{-7}$	$<1,00 \times 10^{-12}$

Промышленная применимость

Антитела против hTfR согласно настоящему изобретению при слиянии с интересующими физиологически активными белками, низкомолекулярными соединениями и тому подобное могут обеспечивать возможность их прохождения через гематоэнцефалический барьер и, следовательно, являются очень полезными при предоставлении средства доставки в головной мозг физиологически активных белков, низкомолекулярных соединений и тому подобное, действие которых необходимо в центральной нервной системе.

Список ссылочных обозначений

- 1 Кровеносный сосуд.
- 2 Паренхима головного мозга.
- 3 Нервоподобные клетки.
- 4 Клетки Пуркинье.

Произвольный текст списка последовательностей

[illegible]

довательность 6 в качестве вариабельной области, синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 31: аминокислотная последовательность 1 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3

SEQ ID NO: 32: аминокислотная последовательность 2 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3

SEQ ID NO: 33: аминокислотная последовательность 3 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3

SEQ ID NO: 34: аминокислотная последовательность 4 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3

SEQ ID NO: 35: аминокислотная последовательность 5 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3

SEQ ID NO: 36: аминокислотная последовательность 6 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3

SEQ ID NO: 37: аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3, содержащей аминокислотную последовательность 2 в качестве вариабельной области

SEQ ID NO: 38: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3, содержащей аминокислотную последовательность 2 в качестве вариабельной области, синтетическая последовательность SEQ ID NO: 39: аминокислотная последовательность тяжелой цепи (IgG4) гуманизированного антитела против hTfR № 3, содержащей аминокислотную последовательность 2 в качестве вариабельной области

SEQ ID NO: 40: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность тяжелой цепи (IgG4) гуманизированного антитела против hTfR № 3, содержащей аминокислотную последовательность 2 в качестве вариабельной области, синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 41: праймер hTfR5', синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 42: праймер hTfR3', синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 43: праймер Hyg-Sfi5', синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 44: праймер Hyg-BstX3', синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 45: нуклеотидная последовательность ДНК, в которой ген устойчивости к неомицину, фланкированный последовательностями 1oxP, поместили на 3' стороне кДНК, кодирующей химерный hTfR, синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 46: последовательность 5'-плеча направленного вектора, синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 47: последовательность 3'-плеча направленного вектора, синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 48: аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи мышинового антитела против hTfR № 3

SEQ ID NO: 49: аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышинового антитела против hTfR № 3

SEQ ID NO: 51: аминокислотная последовательность белка слияния тяжелой цепи антитела против hTfR № 3 (гуманизированное 2) и hI2S, синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 52: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность белка слияния тяжелой цепи антитела против hTfR № 3 (гуманизированное 2) и hI2S, синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 53: аминокислотная последовательность белка слияния тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hI2S

SEQ ID NO: 54: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность белка слияния тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hI2S, синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 57: аминокислотная последовательность белка слияния тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hGAA

SEQ ID NO: 58: аминокислотная последовательность белка слияния тяжелой цепи (IgG4) гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hGAA

SEQ ID NO: 59: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность белка слияния тяжелой цепи (IgG4) гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hGAA, синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 60: аминокислотная последовательность одноцепочечного гуманизированного антитела против hTfR № 3N

SEQ ID NO: 61: аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab гуманизированного антитела против hTfR № 3N

SEQ ID NO: 62: аминокислотная последовательность 1 CDR1 в тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3N

SEQ ID NO: 63: аминокислотная последовательность 2 CDR1 в тяжелой цепи гуманизированного

антитела против hTfR № 3N

SEQ ID NO: 64: аминокислотная последовательность каркасной области 3 в тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3N

SEQ ID NO: 65: аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3N

SEQ ID NO: 66: аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3N

SEQ ID NO: 67: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3N, синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 68: аминокислотная последовательность тяжелой цепи (IgG4) гуманизированного антитела против hTfR № 3N

SEQ ID NO: 69: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность тяжелой цепи (IgG4) гуманизированного антитела против hTfR № 3N, синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 70: один пример аминокислотной последовательности Fc-области IgG человека

SEQ ID NO: 71: аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab с добавленной Fc-областью IgG человека гуманизированного антитела против hTfR 3N

SEQ ID NO: 72: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность тяжелой цепи Fab с добавленной Fc-областью IgG человека гуманизированного антитела против hTfR 3N, синтетическая последовательность

SEQ ID NO: 73: аминокислотная последовательность каркасной области 3 в тяжелой цепи гуманизированного антитела против hTfR № 3

SEQ ID NO: 74: аминокислотная последовательность связывающего альбумин домена

SEQ ID NO: 75: аминокислотная последовательность 1 человеческой IDUA

SEQ ID NO: 76: аминокислотная последовательность 2 человеческой IDUA

SEQ ID NO: 77: аминокислотная последовательность человеческой PPT-1

SEQ ID NO: 78: аминокислотная последовательность человеческой ASM

SEQ ID NO: 79: аминокислотная последовательность человеческой ARSA

SEQ ID NO: 80: аминокислотная последовательность человеческой SGSH

SEQ ID NO: 81: аминокислотная последовательность человеческой GBA

SEQ ID NO: 82: аминокислотная последовательность человеческой TPP-1

SEQ ID NO: 83: аминокислотная последовательность человеческой NAGLU

SEQ ID NO: 84: аминокислотная последовательность человеческой GUSB

SEQ ID NO: 85: аминокислотная последовательность человеческой GALC

SEQ ID NO: 86: аминокислотная последовательность человеческой AC

SEQ ID NO: 87: аминокислотная последовательность человеческой FUCA1

SEQ ID NO: 88: аминокислотная последовательность человеческой LAMAN

SEQ ID NO: 89: аминокислотная последовательность белка слияния между тяжелой цепью Fab гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hGAA, Fab HC-GS3-GAA

SEQ ID NO: 90: аминокислотная последовательность белка слияния между тяжелой цепью (IgG4) гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hIDUA, IgG4 HC-IDUA

SEQ ID NO: 91: аминокислотная последовательность белка слияния между тяжелой цепью (IgG4) гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hIDUA, IgG4 HC-GS8-IDUA

SEQ ID NO: 92: аминокислотная последовательность белка слияния между тяжелой цепью (IgG4) гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hIDUA, IgG4 HC-GS20-IDUA

SEQ ID NO: 93: аминокислотная последовательность белка слияния между тяжелой цепью Fab гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hIDUA, Fab HC-GS3-IDUA

SEQ ID NO: 94: аминокислотная последовательность белка слияния между тяжелой цепью Fab гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hIDUA, Fab HC-GS5-IDUA

SEQ ID NO: 95: аминокислотная последовательность белка слияния между тяжелой цепью Fab гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hIDUA, Fab HC-GS10-IDUA

SEQ ID NO: 96: аминокислотная последовательность белка слияния между тяжелой цепью Fab гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hIDUA, Fab HC-GS20-IDUA

SEQ ID NO: 97: аминокислотная последовательность белка слияния между тяжелой цепью Fab гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hIDUA, Tandem Fab HC-IDUA

SEQ ID NO: 98: аминокислотная последовательность одноцепочечного гуманизированного антитела против hTfR № 3N(2)

SEQ ID NO: 99: аминокислотная последовательность белка слияния между одноцепочечным гуманизированным антителом против hTfR № 3N и IDUA, scFab-IDUA

SEQ ID NO: 100: аминокислотная последовательность белка слияния между тяжелой цепью (IgG4) гуманизированного антитела против hTfR № 3N и hPPT-1, IgG4 HC-PPT1

SEQ ID NO: 101: аминокислотная последовательность белка слияния между тяжелой цепью (IgG4)

- (a) CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7,
- (b) CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность Lys-Val-Ser, и
- (c) CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.
2. Антитело по п.1, где каркасная область 3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.
3. Антитело по п.2, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.
4. Антитело по п.1 или 2, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 или SEQ ID NO: 68.
5. Антитело по любому из пп.1-4, где вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22.
6. Антитело по любому из пп.1-4, где легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 29.
7. Антитело по любому из пп.1-6, где антитело обладает аффинностью как к внеклеточной области рецептора трансферрина человека, так и к внеклеточной области рецептора трансферрина обезьяны.
8. Антитело по п.7, где константа диссоциации его комплекса с внеклеточной областью рецептора трансферрина человека составляет не более чем 1×10^{-10} М и константа диссоциации его комплекса с внеклеточной областью рецептора трансферрина обезьяны составляет не более чем 1×10^{-9} М.
9. Антитело по любому из пп.1-8, где антитело представляет собой Fab, F(ab')₂ или F(ab').
10. Антитело против рецептора трансферрина человека по любому из пп.1-8, где антитело представляет собой одноцепочечное антитело, выбранное из группы, состоящей из scFab, scF(ab'), scF(ab')₂ и scFv.
11. Антитело по п.10, где легкая цепь и тяжелая цепь антитела связаны посредством линкерной последовательности.
12. Антитело по п.11, где тяжелая цепь связана посредством линкерной последовательности с легкой цепью на С-конце легкой цепи.
13. Антитело по п.10, где легкая цепь связана посредством линкерной последовательности с тяжелой цепью на С-конце тяжелой цепи.
14. Антитело по любому из пп.11-13, где линкерная последовательность состоит из 2-50 аминокислотных остатков.
15. Антитело по п.14, где линкерная последовательность выбрана из группы, состоящей из аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly, аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, аминокислотной последовательности, состоящей из трех последовательно связанных аминокислотных последовательностей, каждая представляет собой SEQ ID NO: 3, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 2-10 повторов любой из вышеуказанных последовательностей, которые последовательно связаны.
16. Слитый белок, содержащий антитело против рецептора трансферрина человека и другой белок (A),
 где антитело против рецептора трансферрина человека представляет собой антитело по любому из пп.1-15,
 где другой белок (A) представляет собой белок, который способен проявлять свою физиологическую активность в организме, и
 где белок (A) связан с легкой цепью антитела на С-конце или N-конце легкой цепи.
17. Слитый белок по п.16, где белок (A) связан непосредственно или через линкер с легкой цепью на С-конце или N-конце легкой цепи.
18. Слитый белок по п.16 или 17, где белок (A) связан через линкер с легкой цепью на С-конце или N-конце легкой цепи.
19. Слитый белок по п.18, где линкером является пептид, состоящий из 1-50 аминокислотных остатков.
20. Слитый белок по п.19, где линкером является пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 и аминокислотных последовательностей, состоящих из 2-10 повторов любой из вышеуказанных последовательностей, которые последовательно связаны.
21. Слитый белок антитела против рецептора трансферрина человека и другого белка (A),
 где антителом против рецептора трансферрина человека является антитело по любому из пп.1-15,
 где другой белок (A) представляет собой белок, который способен проявлять свою физиологическую

скую активность в организме, и

где белок (А) связан с тяжелой цепью антитела на С-конце или N-конце тяжелой цепи.

22. Слитый белок по п.21, где белок (А) связан непосредственно или через линкер с тяжелой цепью на С-конце или N-конце тяжелой цепи.

23. Слитый белок по п.21 или 22, где белок (А) связан через линкер с тяжелой цепью на С-конце или N-конце тяжелой цепи.

24. Слитый белок по п.23, где линкерной последовательностью является пептид, состоящий из 1-50 аминокислотных остатков.

25. Слитый белок по п.24, где линкером является пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из одного глицина, одного серина, аминокислотной последовательности Gly-Ser, аминокислотной последовательности Gly-Gly-Ser, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей, состоящих из 2-10 повторов любой из вышеуказанных последовательностей, которые последовательно связаны.

26. Слитый белок по любому из пп.16-25, где белком (А) является белок, происходящий от человека.

27. Слитый белок по любому из пп.16-26, где белок (А) выбран из группы, состоящей из фактора роста нервов (NGF), лизосомальных ферментов, цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), нейротрофического фактора глиальной клеточной линии (GDNF), нейротрофина-3, нейротрофина-4/5, нейротрофина-6, нейрегулина-1, эритропоэтина, дарбэпоэтина, активина, основного фактора роста фибробластов (bFGF), фактора роста фибробластов 2 (FGF2), эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), интерферона α , интерферона β , интерферона γ , интерлейкина 6, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), цитокина, рецептора фактора некроза опухоли α (рецептора TNF- α), лиганда PD-1, PD-L1, PD-L2, фермента, обладающего разрушающей β -амилоид активностью, антитела против β -амилоида, антитела против BACE, антитела против EGFR, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против PD-L2, антитела против HER2, антитела против TNF- α антитела и антитела против CTLA-4.

28. Слитый белок по п.16, где белком (А) является лизосомальный фермент, где лизосомальный фермент выбран из группы, состоящей из α -L-идуронидазы, идуронат-2-сульфатазы, кислой α -глюкозидазы человека, глюкоцереброзидазы, β -галактозидазы, белка-активатора GM2, β -гексозаминидазы А, β -гексозаминидазы В, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы, α -маннозидазы, β -маннозидазы, галактозилкерамидазы, сапозина С, арилсульфатазы А, α -L-фукозидазы, аспартилглюкозаминидазы, α -N-ацетилгалактозаминидазы, кислой сфингомиелиназы, α -галактозидазы А, β -глюкуронидазы, гепаран-N-сульфатазы, α -N-ацетилглюкозаминидазы, ацетил-КоА: α - α -глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат-сульфатазы, кислой керамидазы, амило-1,6-глюкозидазы, сиалидазы, пальмитоил-белок тиоэстеразы 1, трипептидил-пептидазы 1, гиалуронидазы 1, CLN1 и CLN2.

29. Слитый белок по любому из пп.16-26, где белком (А) является идуронат-2-сульфатаза человека, кислая α -глюкозидаза человека или α -L-идуронидаза человека.

30. Слитый белок по п.26, где белком (А) является кислая α -глюкозидаза человека, где

(1) легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и

(2) тяжелая цепь антитела связана на своем С-конце посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с кислой α -глюкозидазой человека, образуя, таким образом, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 58.

31. Слитый белок по п.26, где белком (А) является кислая α -глюкозидаза человека, где:

(1) легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и

(2) тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 или SEQ ID NO: 68, и тяжелая цепь связана на своем С-конце посредством аминокислотной последовательности Gly-Ser с кислой α -глюкозидазой человека с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 55 или 56.

32. Слитый белок по п.26, где белком (А) является кислая α -глюкозидаза человека, где антителом является Fab и где:

(1) легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и

(2) тяжелая цепь антитела связана на своем С-конце посредством аминокислотной последовательности, состоящей из трех последовательно связанных аминокислотных последовательностей, каждая из которых представляет собой SEQ ID NO: 3, с кислой α -глюкозидазой человека, образуя, таким образом, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89.

33. Слитый белок по п.26, где белком (А) является кислая α -глюкозидаза человека, где антителом является Fab и где:

(1) легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и

(2) тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и тяжелая цепь связана на своем С-конце посредством аминокислотной последовательности, состоящей из трех

последовательно связанных аминокислотных последовательностей, каждая из которых представляет собой SEQ ID NO: 3, с кислой α -глюкозидазой человека с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 55 или 56.

34. Слитый белок по п.26, где белком (А) является α -L-идуронидаза человека, где антителом является Fab и где:

(1) легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и

(2) тяжелая цепь антитела связана на своем С-конце посредством аминокислотной последовательности, состоящей из трех последовательно связанных аминокислотных последовательностей, каждая из которых представляет собой SEQ ID NO: 3, с α -L-идуронидазой человека, образуя, таким образом, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

35. Слитый белок по п.26, где белком (А) является α -L-идуронидаза человека, где антителом является Fab и где:

(1) легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и

(2) тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и тяжелая цепь связана на своем С-конце посредством аминокислотной последовательности, состоящей из трех последовательно связанных аминокислотных последовательностей, каждая из которых представляет собой SEQ ID NO: 3, с α -L-идуронидазой человека с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75 или 76.

36. Слитый белок по п.16, где между белком (А) и антителом введена Fc-область IgG человека.

37. Слитый белок по п.36, где Fc-область IgG человека связана напрямую или посредством линкерной последовательности с белком (А) на его С-конце, и тяжелая цепь или легкая цепь антитела связаны напрямую или посредством линкерной последовательности с Fc-областью IgG человека на его С-конце.

38. Слитый белок по п.36 или 37, где Fc-область IgG человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

39. Слитый белок по п.38, где Fc-область IgG человека связана посредством линкерной последовательности с тяжелой цепью Fab, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61, и содержит образованную таким образом аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

40. Фрагмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность антитела против рецептора трансферрина человека по любому из пп.1-15.

41. Фрагмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность слитого белка по любому из пп.16-39.

42. Вектор экспрессии, содержащий фрагмент ДНК по п.40 или 41.

43. Клетка млекопитающего, трансформированная вектором экспрессии по п.42.

44. Фармацевтический комплекс, содержащий антитело против рецептора трансферрина человека по любому из пп.1-15 и низкомолекулярное фармакологически активное соединение, где легкая цепь и/или тяжелая цепь антитела против рецептора трансферрина человека ковалентно связаны с фармакологически активным низкомолекулярным соединением, которому необходимо обеспечить возможность прохождения через гематоэнцефалический барьер и проявления его функции в головном мозге.

45. Комплекс по п.44, где фармакологически активным соединением является любое соединение, выбранное из группы, состоящей из противоракового средства, терапевтического средства для болезни Альцгеймера, терапевтического средства, используемого для лечения болезни Паркинсона, терапевтического средства, используемого для лечения болезни Гентингтона, терапевтического средства, используемого для лечения шизофрении, антидепрессанта, терапевтического средства, используемого для лечения рассеянного склероза, терапевтического средства, используемого для лечения бокового амиотрофического склероза, терапевтического средства, используемого для лечения опухолей центральной нервной системы, включая опухоль головного мозга, терапевтического средства, используемого для лечения лизосомальной болезни накопления, сопровождающейся энцефалопатией, терапевтического средства, используемого для лечения гликогеноза, терапевтического средства, используемого для лечения мышечной дистрофии, терапевтического средства, используемого для лечения церебральной ишемии, терапевтического средства, используемого для лечения прионных заболеваний, терапевтического средства, используемого для лечения травматических расстройств центральной нервной системы, терапевтического средства, используемого для лечения вирусных и бактериальных заболеваний центральной нервной системы, фармацевтического средства, используемого для восстановления после хирургической операции на головном мозге, фармацевтического средства, используемого для восстановления после хирургической операции на спинном мозге, siRNA, антисмысловой ДНК и пептида.

46. Применение антитела против рецептора трансферрина человека по любому из пп.1-15 для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения заболевания центральной нервной системы путем связывания с ним молекулы физиологически активного белка или фармакологически активного низкомолекулярного соединения, используемого для лечения этих расстройств.

47. Способ лечения расстройства центральной нервной системы, включающий парентеральное введение пациенту с расстройством терапевтически эффективного количества физиологически активного

белка или фармакологически активного низкомолекулярного соединения, используемого для лечения этого расстройства, в виде конъюгата с молекулой антитела против рецептора трансферрина человека по любому из пп.1-15.

48. Применение слитого белка по любому из пп.28-33 в качестве фармацевтического средства для обеспечения прохождения человеческой кислой α -глюкозидазы через гематоэнцефалический барьер путем связывания с рецептором трансферрина человека и проявления его функции разрушения гликогена в головном мозге.

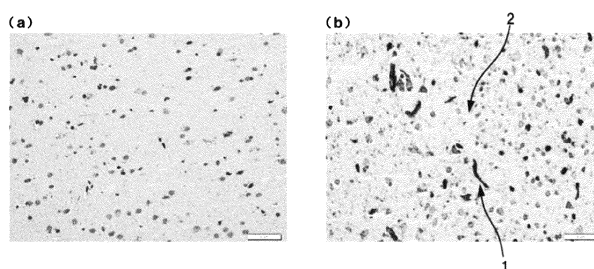
49. Применение слитого белка по любому из пп.28-33 для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения болезненного состояния центральной нервной системы, сопровождающего болезнь Помпе.

50. Способ лечения заболевания центральной нервной системы, сопровождающего болезнь Помпе, включающий парентеральное введение пациенту с заболеванием терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из пп.28-33.

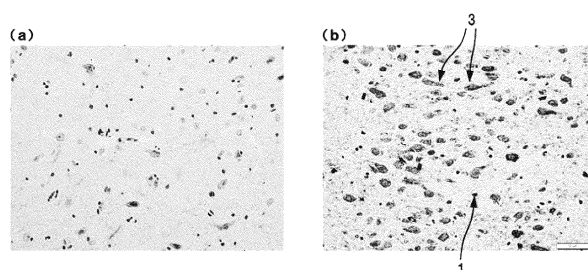
51. Применение слитого белка по любому из пп.28, 29, 34 и 35 в качестве фармацевтического средства для обеспечения прохождения кислой α -L-идуронидазы человека через гематоэнцефалический барьер путем связывания с рецептором трансферрина человека и проявления его функции в головном мозге путем гидролиза связи идуроновой кислоты, присутствующей в молекуле дерматансульфата или гепарансульфата в головном мозге.

52. Применение слитого белка по любому из пп.28, 29, 34 и 35 для получения фармацевтического средства для парентерального введения для лечения болезненного состояния центральной нервной системы, сопровождающего синдром Гурлера или синдром Гурлера-Шейе.

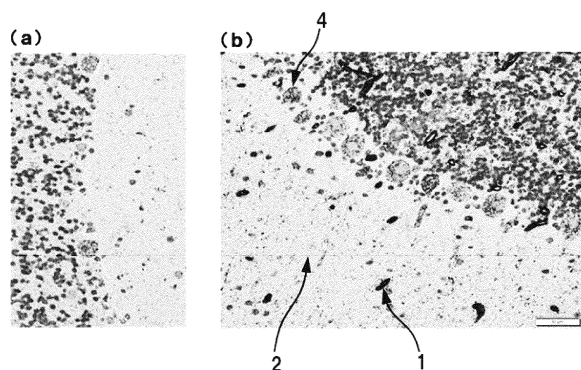
53. Способ лечения заболевания центральной нервной системы, сопровождающего синдром Гурлера или синдром Гурлера-Шейе, где способ включает парентеральное введение пациенту с заболеванием терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из пп.28, 29, 34 и 35.



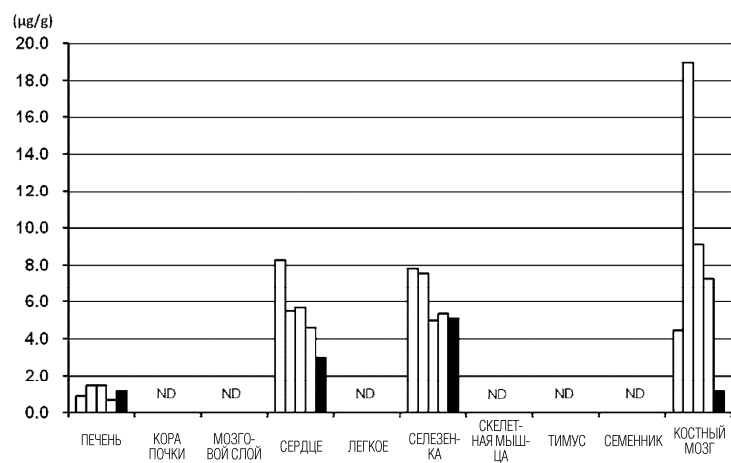
Фиг. 1



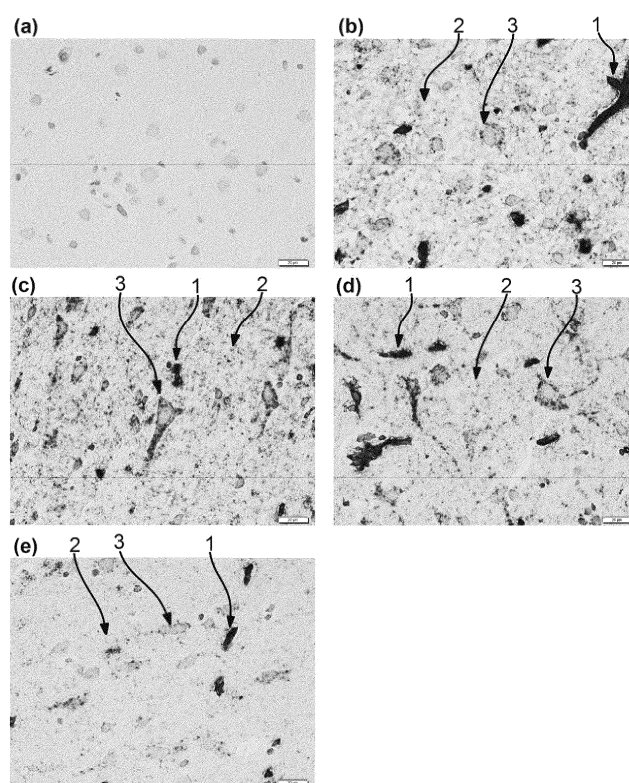
Фиг. 2



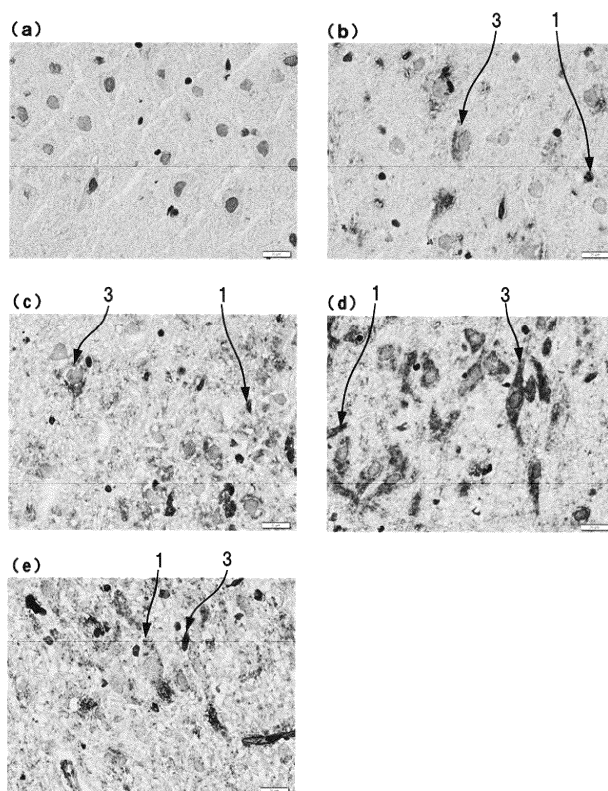
Фиг. 3



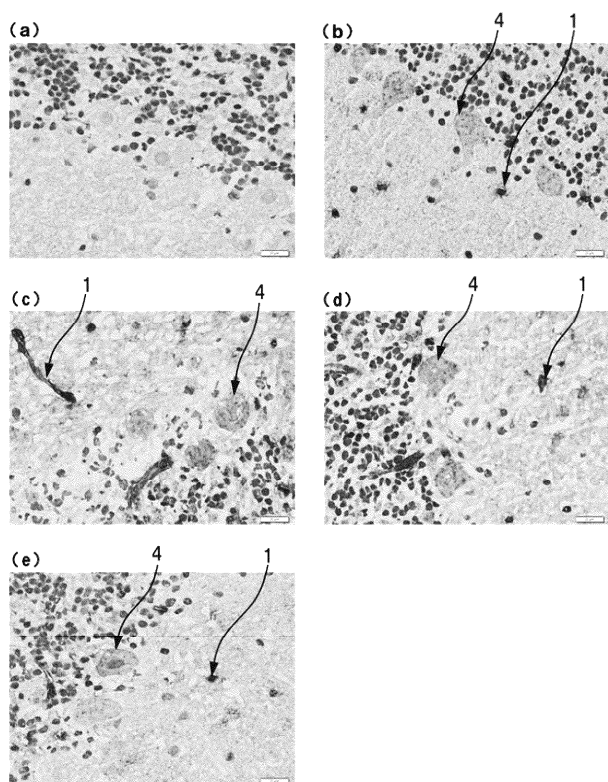
Фиг. 4



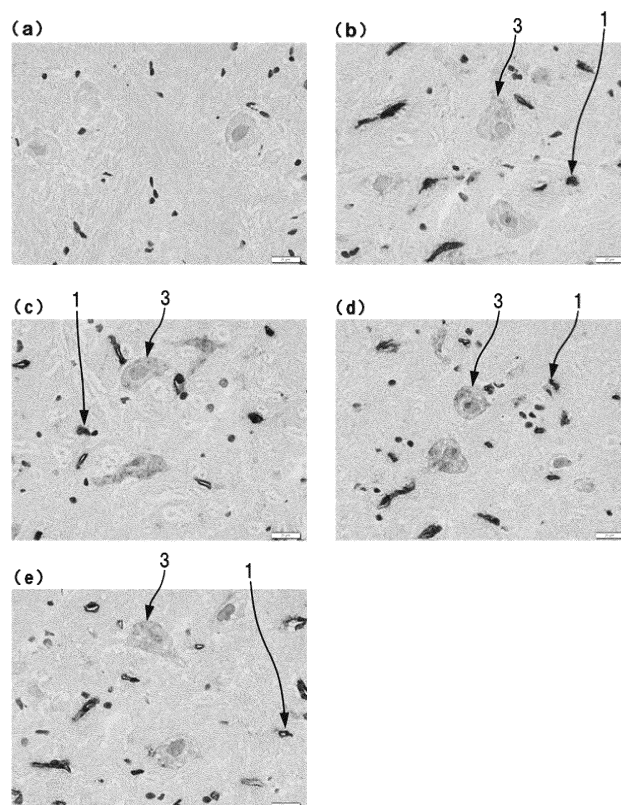
Фиг. 5



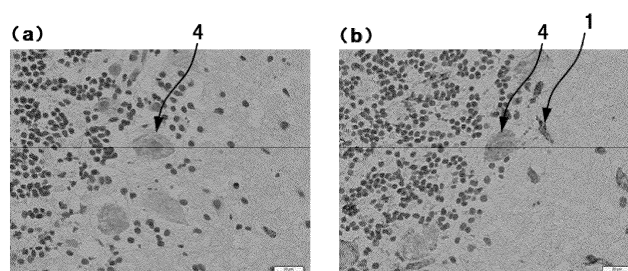
Фиг. 6



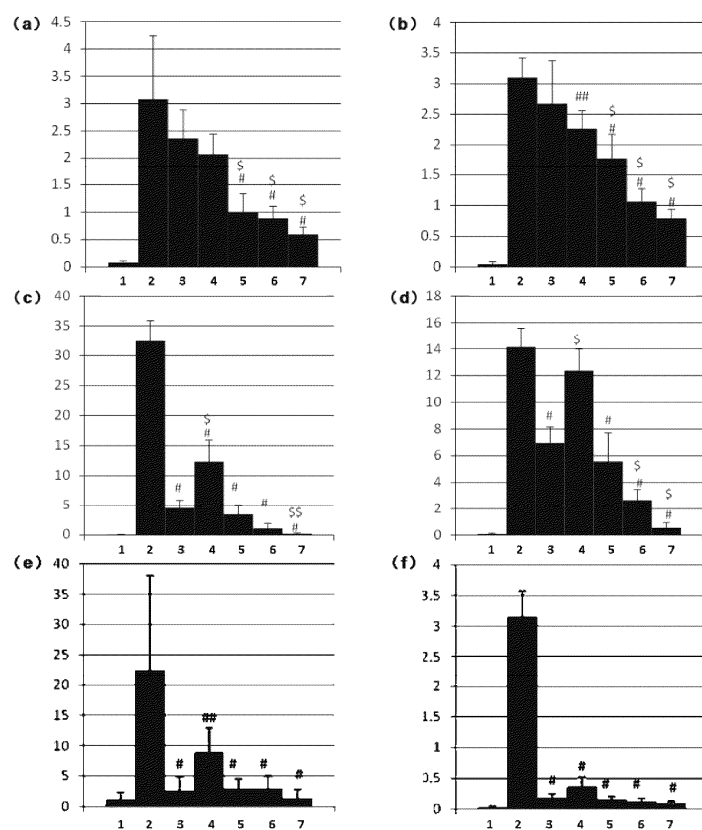
Фиг. 7



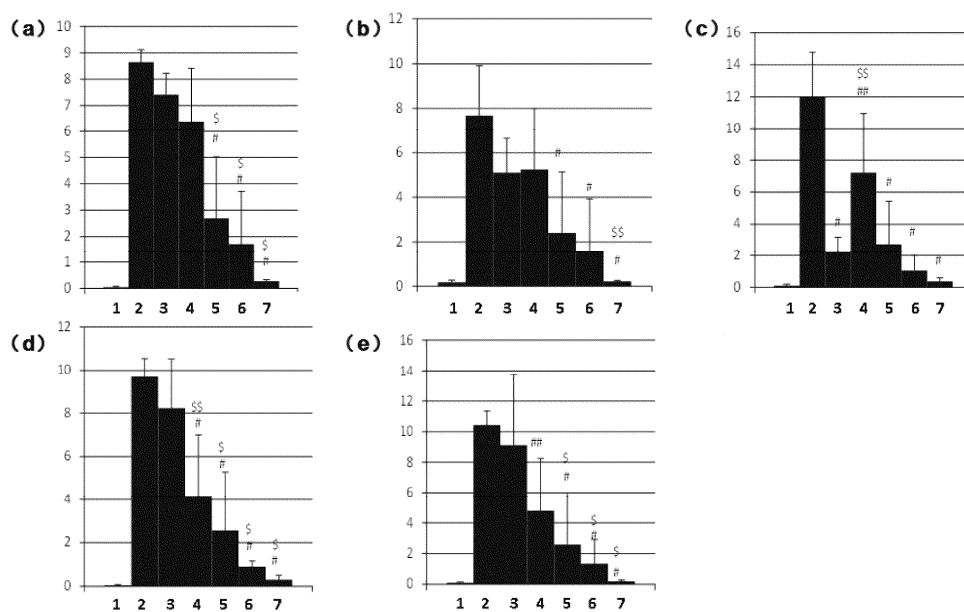
Фиг. 8



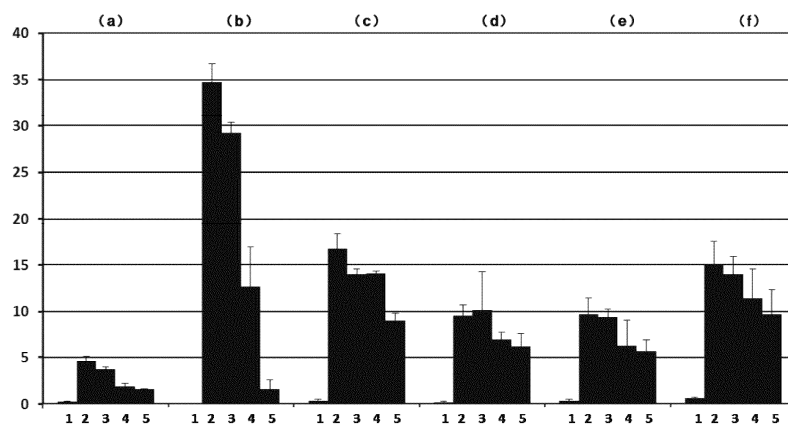
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2