

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292829** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.07

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.07

(54) АНТИТЕЛА К CD98 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/006,988; 63/035,961

(32) 2020.04.08; 2020.06.08

(33) US

(86) PCT/IB2021/052892

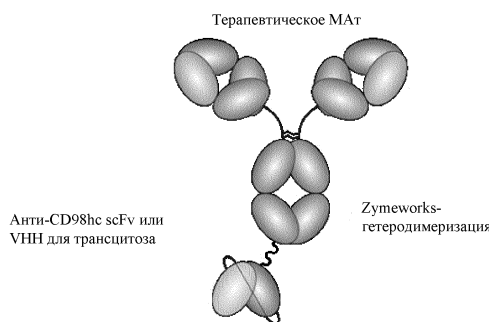
(87) WO 2021/205361 2021.10.14

(71) Заявитель:
АЛИАДА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Эдаветгал Сюзанна, Сингх Санджая,
Доминго Деррик, Уилкинсон Дипти,
Сехудо-Мартин Пилар, Джайпрасарт
Пхарави, Гайст Брайан (US)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении описаны моноклональные антитела к CD98 и их антигенсвязывающие фрагменты, предназначенные для доставки агента в головной мозг субъекта, который нуждается в этом. Описаны также конъюгаты и слитые конструкции, содержащие антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент, сшитое/сшитый с терапевтическим или диагностическим агентом, таким как второе антитело и его антигенсвязывающий фрагмент, предназначенные для лечения или обнаружения неврологического нарушения и/или доставки терапевтического или диагностического агента через гематоэнцефалический барьер. Описаны также нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, конъюгаты и слитые конструкции, и соответствующие рекомбинантные клетки-хозяева.



A1

202292829

202292829

A1

АНТИТЕЛА К CD98 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

5 Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка претендует на приоритет предварительной заявки на патент США № 63/006998, поданной 8 апреля 2020 г., и предварительной заявки на патент США № 63/035961, поданной 8 июня 2020 г., описание которых в полном объеме включено в настоящую заявку путем ссылки.

10 Ссылка на перечень последовательностей, прилагаемый в электронном виде

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, поданный в электронном виде через EFS-Web в форме перечня последовательностей в формате ASCII с названием файла размером 478 кБ «004852.158WO1-Sequence_Listing» и датой создания 31 марта 2021 г. Перечень последовательностей, поданный через EFS-Web, является частью спецификации и включен в настоящее описание в полном объеме в качестве ссылки.

15 Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к шаттлу для гематоэнцефалического барьера, который связывается с человеческим CD98hc, и способам его применения.

20 Предпосылки создания изобретения

Хотя гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) предотвращает попадание вредных субстанций в мозг и необходим для гомеостаза головного мозга, он представляет собой серьезное препятствие для эффективной доставки в головной мозг лекарственных средств. Крупные молекулы, такие как моноклональные антитела и другие биотерапевтические средства, имеют огромный терапевтический/диагностический потенциал для лечения/обнаружения патологии центральной нервной системы (ЦНС). Однако их попаданию в головной мозг препятствует ГЭБ. В проведенных ранее исследованиях проиллюстрировано, что только лишь небольшой процент (примерно 0,1%) IgG, инъецированного в кровотоки, может проникать через ГЭБ в компартмент ЦНС (Felgenhauer, Klin.

Wschr. 52, 1974, ss. 1158-1164). Это может ограничивать любое фармакологическое действие из-за низкой концентрации антитела в ЦНС.

Изучены многочисленные подходы к улучшению доставки в головной мозг терапевтических моноклональных антител (МАт), включая применение опосредуемого рецептором транцитоза (рецептор-опосредованный транцитоз) (RMT). Для осуществления RMT используют повсеместно экспрессируемые рецепторы на просветной стороне ГЭБ для транспортировки через эндотелиальные клетки головного мозга. Предшествующие попытки создания клинически пригодной платформы для доставки терапевтических МАт в головной мозг были сосредоточены на создании антител для повышения эффективности транцитоза, причем успехи были достигнуты благодаря изучению влияния валентности связывания, зависимости от pH и аффинности (см. обзор Goulatis и др., *Curr Opin Struct Biol* 45, 2017, ss. 109-115). Однако переход к приматам кроме человека (NHP) и переход к клиническим испытаниям были ограничены быстрым периферическим клиренсом из-за опосредованной мишенью диспозиции лекарственного средства (TMDD) и безопасностью, связанной с острым истощением ретикулоцитов (Gadkar K. и др., *Eur J Pharm Biopharm.* 101, апрель 2016 г., ss. 53-61).

Субъединица тяжелой цепи CD98 (CD98hc) является членом семейства растворимых носителей, и она гетеродимеризуется с многочисленными членами легкой цепи CD98 с образованием транспортеров аминокислот через ГЭБ (Zuchero Y.J. и др., *Neuron.* 89(1), 2016, ss. 70-82, цитирование Boado R.J. и др., *PNAS*; 96(21), 1999, ss. 12079-12084). Функция внутриклеточного участка CD98hc заключается в опосредовании передачи сигнала интегрина, что имеет значение, как для клеточного роста, так и для онкогенеза (Zuchero Y.J. и др., *Neuron.*; 89(1), 2016, ss. 70-82, цитирование Feral C.C. и др., *J Cell Biol*; 178, 2007, ss. 701-711; Cantor J.M. и Ginsburg M.H., *J Cell Sci*; 125, 2012, ss. 1373-1382). CD98hc характеризуется высоким уровнем экспрессии в микрососудистой сети головного мозга человека, и биспецифические антитела к CD98hc применяли для доставки терапевтического антитела в головной мозг мышей (Zuchero Y.J. и др., *Neuron.*; 89(1), 2016, ss. 70-82). Однако возможность осуществления безопасного таргетинга CD98hc в организме человека еще необходимо исследовать.

Таким образом, существует потребность в моноклональном антителе к CD98 или его антигенсвязывающем фрагменте, которое/который можно применять в качестве шаттла для эффективной доставки лекарственных средств в головной мозг с повышенной безопасностью и ФК.

5 Краткое изложение сущности изобретения

Настоящая заявка относится к оптимизированной платформе для доставки в головной мозг, созданной с учетом не только концентрации доставляемого агента в головном мозге, такого как терапевтическое моноклональное антитело (МАт), но и терапевтически значимых характеристик МАт, включая периферическую
10 фармакокинетику, безопасность и фармакодинамику МАт. В платформе используют CD98-связывающую молекулу, в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который связывается с CD98, предпочтительно с тяжелой цепью человеческого CD98 (huCD98hc), при этом, CD98-связывающая молекула обладает оптимизированной транспортной функцией, определяемой величинами константы
15 скорости ассоциации (k_a) и скорости диссоциации (k_d) как при нейтральном значении pH от 6,8 до 7,8, таком как физиологическое значение pH (например, 7,4), так и при кислом значении pH от 4,5 до 6,5, таком как кислое значение pH, часто присутствующее в эндосомальных компартментах.

При создании изобретения неожиданно было установлено, что оптимальные
20 значения представляют собой не просто самые быстрые величины константы скорости ассоциации k_a и самые медленные величины константы скорости диссоциации k_d , как можно было бы ожидать для типичных взаимодействий антитело-мишень. Это означает, что для этой системы необязательно использовать молекулу, которая «связывается» и вступает в ассоциацию с CD98 с относительно
25 высокой скоростью, а затем диссоциирует от CD98 более медленно, для того, чтобы иметь самую длительную продолжительность жизни комплекса антитело-мишень. Наоборот, согласно одному из вариантов осуществления изобретения оптимизированная транспортная функция связывающих CD98 агентов, указанных в настоящем описании, предпочтительно проявлялась при константах скорости
30 ассоциации k_a , сходных (например, в пределах того же порядка величины) как при физиологических значениях pH (например, 7,4), так и при более низких значениях

pH (например, 6,5 или 6,0), но при более быстрых величинах констант скорости диссоциации k_d при более низком значении pH (например, pH 6,5 или 6,0) по сравнению с величинами констант скорости диссоциации при физиологическом значении pH (например, 7,4).

5 В одном из основных объектов изобретения, указанных в настоящей заявке, описаны антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент для доставки терапевтического или диагностического агента в головной мозг субъекта, который нуждается в этом, где связывание антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента с CD98, предпочтительно с человеческой CD98hc, характеризуется
10 константой диссоциации K_D , составляющей по меньшей мере 1nM, предпочтительно от 1 до 500nM, при нейтральном значении pH и константной скорости диссоциации k_d , составляющей по меньшей мере 10^{-4}с^{-1} , предпочтительно от 10^{-4} до 10^{-1}с^{-1} , при кислом значении pH, предпочтительно при pH 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD98 или его
15 антигенсвязывающий фрагмент, представленное/представленный в заявке, имеет константу скорости диссоциации k_d , составляющую от 2×10^{-2} до $2 \times 10^{-4} \text{с}^{-1}$, предпочтительно $9 \times 10^{-3} \text{с}^{-1}$ при нейтральном значении pH.

В другом варианте осуществления изобретения оптимизированная транспортная функция некоторых связывающих CD98 агентов, указанных в
20 настоящем описании, предпочтительно проявлялась при константе скорости ассоциации k_a , составляющей по меньшей мере $1,05 \times 10^5$ и константе скорости диссоциации k_d , составляющей по меньшей мере $9,0 \times 10^{-3} \text{с}^{-1}$, или более быстрой скорости при физиологическом значении pH (например, 7,4). Вышеуказанные параметры pH, K_D , k_a и k_d соответствуют только оптимизированным условиям
25 транцитоза и никоим образом не ограничивают сделанные при создании изобретения выводы о том, что опосредованный CD98 транспорт определенных молекул, конъюгированных с определенными CD98-связывающими агентами, тем не менее, может происходить за пределами описанных предпочтительных параметров.

Один из основных объектов изобретения, указанных в настоящей заявке,
30 относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, предназначенному для доставки агента в головной мозг субъекта, который нуждается в этом, где

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который связывается с CD98, предпочтительно с тяжелой цепью человеческого CD98 (huCD98hc), содержит

(1) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют следующие последовательности:

- (I) SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 и 12 соответственно;
- (II) SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70, 71 и 72 соответственно;
- (II) SEQ ID NO: 89, 90, 91, 92, 93 и 94 соответственно;
- (IV) SEQ ID NO: 113, 114, 115, 116, 117 и 118 соответственно;
- (V) SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127 и 128 соответственно;
- (VI) SEQ ID NO: 133, 134, 135, 136, 137 и 138 соответственно;
- (VII) SEQ ID NO: 150, 151, 152, 153, 154 и 155 соответственно;
- (VIII) SEQ ID NO: 160, 161, 162, 163, 164 и 165 соответственно;
- (IX) SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно;
- (X) SEQ ID NO: 180, 181, 182, 183, 184 и 185 соответственно;
- (XI) SEQ ID NO: 194, 195, 196, 197, 198 и 199 соответственно; или
- (XII) SEQ ID NO: 204, 205, 206, 207, 208 и 209 соответственно; или

(2) единичный вариабельный домен на тяжелой цепи (VHH), содержащий определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, которые имеют следующие аминокислотные последовательности

- (I) SEQ ID NO: 29, 30 и 31, соответственно;
- (II) SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно; или
- (III) SEQ ID NO: 143, 144 и 145, соответственно.

Конкретные варианты осуществления изобретения, представленные в заявке, относятся к VHH-фрагменту антитела к CD98, содержащему аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере

на 85%, 90%, 95% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 142.

Другие представленные в заявке варианты осуществления изобретения относятся к одноцепочечному переменному фрагменту (scFv) антитела к CD98, содержащему переменную область тяжелой цепи, ковалентно связанную с переменной областью легкой цепи через линкер, предпочтительно линкер, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189. . Более предпочтительно scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 193 или SEQ ID NO: 203.

Другой объект заявки относится к конъюгату, содержащему антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в заявке, сшитое/сшитый с терапевтическим или диагностическим агентом, таким как лекарственное средство от неврологического нарушения или агент для обнаружения неврологического нарушения. Предпочтительно терапевтический или диагностический агент представляет собой второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который связывается с мишенью в головном мозге.

Представленные в настоящей заявке конкретные варианты осуществления изобретения относятся к слитой конструкции, содержащей антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в заявке, ковалентно связанное/связанный со вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающимся с мишенью в головном мозге, например, мишенью в головном мозге, выбранной из группы, которая состоит из бета-секретазы 1 (BACE1), амилоида бета (Abeta), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2), Тау, аполипопротеина E4 (ApoE4), альфа-синуклеина, CD20, гентингина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина,

пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора смерти 6 (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина p75 (p75NTR) и каспазы 6.

В конкретных вариантах осуществления изобретения слитая конструкция, предлагаемая в заявке, содержит второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который связывается с Тау и содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 213-218 соответственно. Предпочтительно второе антитело представляет собой моноклональное антитело, которое содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111.

В одном из вариантов осуществления изобретения слитая конструкция, предлагаемая в заявке, содержит антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно анти-huCD98hc VHH или scFv-фрагмент, предлагаемый в заявке, ковалентно связанный через линкер с карбоксильным концом только одной из двух тяжелых цепей второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое/который связывается с мишенью в головном мозге. Предпочтительно линкер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 191.

В конкретных вариантах осуществления изобретения каждая из двух тяжелых цепей второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит модифицированный домен 3 константной тяжелой цепи (CH3) по сравнению с CH3-доменом дикого типа для облегчения образования гетеродимера между двумя тяжелыми цепями. Можно использовать любую мутацию, которая облегчает образование гетеродимера между двумя тяжелыми цепями.

Предпочтительно модифицированный CH3-домен первой тяжелой цепи содержит аминокислотные модификации в положениях T350, L351, F405 и Y407, а модифицированный CH3-домен второй тяжелой цепи содержит аминокислотные модификации в положениях T350, T366, K392 и T394. Предпочтительно аминокислотная модификация в положении T350 представляет собой T350V, T350I, T350L или T350M; аминокислотная модификация в положении L351 представляет

с собой L351Y; аминокислотная модификация в положении F405 представляет собой F405A, F405V, F405T или F405S; аминокислотная модификация в положении Y407 представляет собой Y407V, Y407A или Y407I; аминокислотная модификация в положении T366 представляет собой T366L, T366I, T366V или T366M, аминокислотная модификация в положении K392 представляет собой K392F, K392L или K392M, и аминокислотная модификация в положении T394 представляет собой T394W. Более предпочтительно модифицированный гетеродимерный СН3-домен первой тяжелой цепи содержит мутации T350V, L351Y, F405A и Y407V, а модифицированный гетеродимерный СН3-домен второй тяжелой цепи содержит мутации T350V, T366L, K392L и T394W. В описании нумерацию аминокислотных остатков в антителе осуществляют в соответствии с EU-индексом, описанным у Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991, если специально не указано иное.

В конкретных вариантах осуществления изобретения область кристаллизующегося фрагмента (Fc-область) второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит замены, которые изменяют (повышают или снижают), предпочтительно элиминируют, эффекторную функцию, такую как антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Предпочтительно Fc-область второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, которые снижают или аннулируют связывание второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с рецепторами Fc-гамма (FcγR) и предотвращают опосредуемую эффекторной функцией токсичность. Например, Fc-область второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может содержать одну или несколько аминокислотных модификаций в положениях L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329, например, в виде одной, двух или трех мутаций L234A, L235A и P331S, где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, предложенному Кэботом.

В конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-область второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит замены, которые изменяют (повышают или снижают), предпочтительно повышают, связывание второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Предпочтительно одна или несколько мутаций повышает связывание при кислом значении pH, более предпочтительно Fc имеет мутации M252Y/S254T/T256E (YTE), где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, предложенному Кэботом.

В конкретных вариантах осуществления изобретения слитая конструкция, предлагаемая в заявке, содержит:

(1) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22, 25, 32, 35, 38, 41, 44, 51, 54, 57, 60, 63, 73, 76, 79, 82, 85, 95, 98, 101, 104, 107, 119, 129, 139, 146, 156, 166, 176, 186, 200, 210 и 219;

(2) две легкие цепи, каждая из которых независимо друг от друга имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 17, 20, 23, 26, 33, 36, 42, 45, 52, 55, 58, 61, 64, 74, 77, 80, 83, 86, 96, 99, 102, 105, 108, 120, 130, 140, 147, 157, 167, 177, 187, 201, 211 и 220 соответственно; и

(3) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 18, 21, 24, 27, 34, 37, 43, 46, 53, 56, 59, 62, 65, 75, 78, 81, 84, 87, 97, 100, 103, 106, 109, 121, 131, 141, 148, 158, 168, 178, 188, 202, 212 и 221 соответственно.

Другой основной объект изобретения, указанный в настоящей заявке, относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат или слитую конструкцию, которые

предложены в заявке. Кроме того, предложен вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, предлагаемую в заявке, клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор, предлагаемые в заявке.

Другой основной объект изобретения, указанный в настоящей заявке, 5 относится к способу получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата или слитой конструкции, которые предложены в заявке. Способ включает культивирование клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, предлагаемую в заявке, в условиях, пригодных для получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата или слитой конструкции, и выделения 10 антитела или антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата или слитой конструкции из клетки или культуры клеток.

Кроме того, предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат или слитую конструкцию, предлагаемые в заявке, и фармацевтически приемлемый носитель.

15 Другой основной объект изобретения, указанный в настоящей заявке, относится к способу лечения или обнаружения неврологического нарушения у субъекта, который нуждается в этом, включающему введение субъекту в эффективном количестве антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата или слитой конструкции, или фармацевтической 20 композиции, которые предложены в заявке. Предпочтительно неврологическое нарушение выбирают из группы, состоящей из нейродегенеративных заболеваний (таких как болезнь с тельцами Леви, синдром постполиомиелита, синдром Шая-Дрегера, оливопонтocerebellарная атрофия, болезнь Паркинсона, множественная системная атрофия, стриатонигральная дегенерация, спиноцереbellарная атаксия, 25 спинальная мышечная атрофия), таупатий (таких как болезнь Альцгеймера и надъядерный паралич), прионовых болезней (таких как губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота, скрепи, синдром Крейтцфельдта-Якоба, куру, болезнь Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, хроническая истощающая болезнь и семейная бессонница со смертельным исходом), бульбарного паралича, заболевания 30 двигательных нейронов и гетеродегенеративных нарушений нервной системы (таких как болезнь Канавана, болезнь Хантингтона, нейрональный цероид-

липофусциноз, болезнь Александера, синдром Туретта, синдром курчавых волос Менкеса, синдром Кокейна, синдром Халервордена-Спатца, болезнь Лафоры, синдром Ретта, гепатолентикулярная дегенерация, синдром Леша-Найхана и синдром Унверрихта-Лундборга), деменций (таких как болезнь Пика и

5 спиноцеребеллярная атаксия) и рака ЦНС и/или головного мозга (такого как метастазы в головной мозг, возникающие в результате рака в других частях тела).

Предпочтительно предлагаемые в заявке антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат, слитую конструкцию или фармацевтическую композицию вводят внутривенно.

10 Описан также способ доставки терапевтического или диагностического агента в головной мозг субъекта, который нуждается в этом, включающий введение субъекту конъюгата, который содержит терапевтический или диагностический агент, сшитый с антителом к CD98 или его антигенсвязывающим фрагментом, предлагаемым в заявке. Предпочтительно терапевтический или диагностический

15 агент представляет собой второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который связывается с мишенью в головном мозге. Более предпочтительно введение терапевтического или диагностического агента, сшитого с антителом к CD98 или его антигенсвязывающим фрагментом, предлагаемым в заявке, в головной мозг субъекта приводит к пониженной опосредуемой Fc эффекторной

20 функции и/или не индуцирует быстрое истощение ретикулоцитов по сравнению с введением терапевтического или диагностического агента, не сшитого с антителом к CD98 или его антигенсвязывающим фрагментом.

Следующий основной объект изобретения относится к способу индукции антителозависимого фагоцитоза (ADP) без стимуляции секреции

25 провоспалительного цитокина у субъекта, который нуждается в этом, включающему введение субъекту комплекса, который содержит терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, сшитое/сшитый, предпочтительно ковалентно конъюгированное/конъюгированный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, согласно варианту осуществления изобретения,

30 где терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не обладает эффекторной функцией, например, терапевтическое антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько аминокислотных модификаций в положениях L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329, таких как одна, две или три мутации L234A, L235A и P331S, где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, предложенному Кэботом.

Предпочтительно терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается специфически с tau-агрегатами.

Другие объекты, особенности и преимущества изобретения будут очевидны из приведенного ниже описания, включая подробное описание изобретения и предпочтительных вариантов его осуществления и прилагаемую формулу изобретения.

Краткое описание чертежей

Представленное выше краткое изложение сущности изобретения, а также представленное ниже подробное описание изобретения, должны стать более понятными после ознакомления с прилагаемыми чертежами. С целью иллюстрации изобретения на чертежах представлены варианты осуществления изобретения, являющиеся в настоящее время предпочтительными. Однако следует понимать, что изобретение не ограничено только вариантами осуществления, проиллюстрированными на чертежах.

Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один чертеж, выполненный в цвете. Копии этого патента или публикации заявки на патент с цветным(и) чертежом(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после оплаты необходимой пошлины.

На чертежах показано:

на фиг. 1 - иллюстрация формата «трехногого» МАт, применяемого для платформы доставки в головной мозг;

на фиг. 2 - гистограмма, демонстрирующая воздействие «трехногих» антител к CD98hc Zymeworks на поглощение ³H-лейцина. Данные представляют собой среднее значение по четырем повторностям $\pm$ SEM. Пунктирными линиями обозначены результаты $\pm$ ($3 \times$ SD) для контроля изотипа «трехногого» Zymeworks 1 (B624);

на фиг. 3 - изображение, иллюстрирующее интернализацию «трехногих» МАт в эндотелиальные клетки головного мозга человека. «Трехногие» МАт окрашены красным цветом, ядра голубым цветом, а актин зеленым цветом. На изображении представлено антитело BVBB449;

на фиг. 4 - график, иллюстрирующий рН-зависимое связывание, которое оценивали путем сравнения скоростей диссоциации при рН 7,4 со скоростью диссоциации при уменьшении значения рН до 6,5 и 6,0. «Трехногие» МАт рассматривали как позитивные, если скорость диссоциации увеличивалась при уменьшении значения рН. Представлены данные для BVBB578;

на фиг. 5 - изображение, иллюстрирующее интернализацию «трехногого» МАт BVBB1067 в эндотелиальные клетки головного мозга человека. «Трехногие» МАт окрашены красным цветом, а актин зеленым цветом;

на фиг. 6 - график, иллюстрирующий концентрацию МАт в головном мозге после *i.v.* Все содержащие шаттл для головного мозга МАт обладали повышенной экспозиций по сравнению с МАт без шаттла для головного мозга. Индивидуальные точки соответствуют каждому животному ($n=3$);

на фиг. 7 - график, иллюстрирующий опосредуемое МАт поглощение микроглиальными фагосомами. Все содержащие шаттл для головного мозга МАт стимулировали более эффективное поглощение фагосомами по сравнению с МАт без шаттла для головного мозга, PT1B844.

Подробное описание изобретения

В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в описании заявки процитированы или описаны различные публикации, статьи и патенты; каждая из этих ссылок в полном объеме включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий или т.п., которые включены в настоящее описание, предназначено для понимания контекста настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все эти вопросы являются частью предшествующего уровня техники касательно любых раскрытых или заявленных изобретений.

Если не указано иное, то все технические и научные понятия, применяемые в описании, имеют то значение, которое является хорошо известным обычному

специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В противном случае некоторые понятия, применяемые в описании, имеют значения, указанные в спецификации. Все патенты, опубликованные заявки на патент и публикации, процитированные в описании, включены в него путем ссылки, так, если бы они
5 были полностью изложены в описании. Следует отметить, что в контексте настоящего описания и в прилагаемой формуле изобретения применение понятий в единственном числе подразумевает их применение во множественном числе, если из контекста четко не следует иное.

Если не указано иное, то любое численное значение, такое как концентрация
10 или диапазон концентраций, указанное в настоящем описании, следует понимать как понятие, модифицированное во всех случаях включением понятия «примерно». Таким образом, численное значение обычно включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, доза 10 мг включает дозу от 9 мг до 11 мг. В контексте настоящего описания применение численного диапазона четко включает все
15 возможные поддиапазоны, все отдельные численные значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и доли значений, если из контекста четко не следует иное.

В контексте настоящего описания объединяющее понятие «и/или», включенное между несколькими перечисляемыми элементами, понимается как
20 охватывающее как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, когда два элемента соединены с помощью «и/или», то первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности применения первого и второго элементов вместе.

25 Подразумевается, что любой из этих вариантов подпадает под значение и, следовательно, удовлетворяет требованию понятия «и/или», используемого в контексте настоящего описания. Возможность одновременного применения более чем одного из вариантов также понимается как подпадающая под указанное значение и, следовательно, как удовлетворяющая требованию понятия «и/или».

30 В настоящей спецификации и в прилагаемой формуле изобретения, если из контекста не требуется иное, следует понимать, что понятие «содержат» и его

вариации, такие как «содержит» и «содержащий», подразумевает включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. При применении в контексте настоящего описания понятие «содержащий» можно заменять понятием «входящий» или «включающий» или иногда при применении в контексте настоящего описания заменять понятием «имеющий».

Применение в контексте настоящего описания понятия «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в пункте формулы изобретения. Применение в контексте настоящего описания понятия «практически состоящий из» не исключает материалы или стадии, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики, указанные в формуле изобретения. Любое из вышеупомянутых понятий «содержащий», «входящий», «включающий» и «имеющий», где бы оно ни использовалось в контексте объекта или варианта осуществления изобретения, можно заменять понятием «состоящий из» или «практически состоящий из», для того, чтобы варьировать области применения настоящего описания.

Понятие «антитело» в контексте настоящего описания применяют в наиболее широком смысле, и оно включает, в частности, полноразмерные моноклональные антитела, поликлональные антитела и, если не указано иное или это не противоречит контексту, их антигенсвязывающие фрагменты, варианты антител и мультиспецифические молекулы, если они проявляют требуемую биологическую активность. Как правило, полноразмерное антитело представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные друг с другом дисульфидными связями, или его антигенсвязывающий участок. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначена в описании как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначена в описании как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. VH- и VL-области можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, которые

обозначают как определяющие комплементарность участки (CDR), перемежающиеся с более консервативными участками, которые обозначают как каркасные участки (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, которые располагаются от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Общие принципы строения молекулы антитела и различные методики, пригодные для получения антител, описаны, например, у Harlow и Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей полноразмерные антитела можно относить к различными классам. Известно пять основных классов полноразмерных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно подразделять на «подклассы» (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам, обозначают как альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

«Антитело» может представлять собой также антитело, имеющее единичный вариабельный домен на тяжелой цепи (VHH), которое обозначают также содержащее только тяжелую цепь как антитело (HcAb), лишенное легких цепей, оно может продуцироваться в естественных условиях верблюдовыми или акулами. Антигенсвязывающий участок HcAb состоит из VHH-фрагмента.

Понятие «рекомбинантное антитело» в контексте настоящего описания относится к антителу (например, химерному, гуманизированному или человеческому антителу или его антигенсвязывающему фрагменту), которое экспрессируется рекомбинантной клеткой-хозяином, содержащей нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело. Примеры «клеток-хозяев» для производства рекомбинантных антител включают: (1) клетки млекопитающих, например, яичника китайского хомячка (CHO), COS, клетки миеломы (включая YO- и NS0-клетки), клетки почки детеныша хомяка (BHK), Hela и Vero; (2) клетки насекомых,

например, sf9, sf21 и Tn5; (3) клетки растений, например, растений, принадлежащих к роду *Nicotiana* (например, *Nicotiana tabacum*); (4) клетки дрожжей, например, принадлежащих к роду *Saccharomyces* (например, *Saccharomyces cerevisiae*) или роду *Aspergillus* (например, *Aspergillus niger*); (5) клетки бактерий, например, клетки *Escherichia coli* или клетки *Bacillus subtilis* и т.д.).

«Антигенсвязывающий фрагмент» антитела представляет собой молекулу, которая содержит участок полноразмерного антитела, способность которого связываться с антигеном поддается обнаружению, которая, как правило, содержит один или несколько участков по меньшей мере VH-области. Антигенсвязывающие фрагменты включают многовалентные молекулы, содержащие один, два, три или большее количество антигенсвязывающих участков антитела, и одноцепочечные конструкции, в которых VL- и VH-области или их отобранные участки соединены с помощью синтетических линкеров или с помощью методов рекомбинации с образованием функциональной антигенсвязывающей молекулы.

Антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой также однодоменное антитело (sdAb), которое обозначают также как нанотело, которое представляет собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного вариабельного домена антитела (VHH). Хотя некоторые антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получать с помощью фактической фрагментации более крупной молекулы антитела (например, ферментативного расщепления), большую часть, как правило, получают с помощью технологий рекомбинации. Антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать в виде полноразмерных антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают такие фрагменты, как Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, F(ab)₃, Fv (как правило, VL- и VH-домены одного плеча антитела), одноцепочечный Fv (scFv, см., например, Bird и др., Science 242, 1988, сс. 423-426; и Huston и др., PNAS 85, 1988, сс. 5879-5883), dsFv, Fd (как правило, VH и CH1-домен) и dAb (как правило, VH-домен); домены VH, VL, VHH и V-NAR; одновалентные молекулы, содержащие одну VH- и одну VL-цепь; минитела, димерные антитела (диабоди), трехмерные антитела (триабоди), четырехмерные антитела (тетрабоди) и каппа-тела (см., например, Ill и др., Protein Eng; 10, 1997, сс. 949-957); верблюжий IgG; IgNAR; а также один или несколько

выделенных CDR или функциональный паратоп, при этом выделенные CDR или антигенсвязывающие остатки или полипептиды можно объединять или связывать друг с другом таким образом, чтобы образовывался функциональный фрагмент антитела. Различные типы фрагментов антител описаны или данные о них обобщены, например, у Holliger и Hudson, Nat Biotechnol 23, 2005, сс. 1126-1136; WO 2005/040219 и в опубликованных заявках на патент США 20050238646 и 20020161201. Фрагменты антител можно получать с помощью общепринятых технологий рекомбинации или инжиниринга белков и фрагменты можно подвергать скринингу в отношении способности связываться с антигеном или другой функции таким же образом, что и интактные антитела.

Разработаны различные технологии получения фрагментов антител. Традиционно эти фрагменты получают путем протеолитического расщепления полноразмерных антител (см., например, Morimoto и др., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24, 1992, сс. 107-117; и Brennan и др., Science, 229, 1985, с. 81). Однако в настоящее время указанные фрагменты можно получать непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Альтернативно этому, Fab'-SH-фрагменты можно выделять непосредственно из *E. coli* и химически сшивать с образованием F(ab')₂-фрагментов (Carter и др., Bio/Technology, 10, 1992, сс. 163-167). Согласно другому подходу F(ab')₂-фрагменты можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. В других вариантах осуществления изобретения выбранное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) (см., WO 1993/16185; патент США № 5571894 и патент США № 5587458). Фрагмент антитела может представлять собой также «линейное антитело», например, описанное в патенте США № 5641870. Указанные линейные фрагменты антитела могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

Понятие «производное антитела» в контексте настоящего описания относится к молекуле, содержащей полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором одна или несколько аминокислот химически модифицированы или заменены. Химические модификации, которые можно применять в производных антител, включают, например, алкилирование, ПЭГилирование,

ацилирование, образование сложного эфира или образование амида или т.п., например, для соединения антитела со второй молекулой. Примеры модификаций включают ПЭГилирование (например, ПЭГилирование цистеина), биотинилирование, радиоактивное мечение и конъюгацию со вторым агентом (таким, как цитотоксический агент).

Антитела, представленные в описании, включают «варианты аминокислотных последовательностей» с измененной способностью связываться с антигеном или биологической активностью. Примеры антител с такими аминокислотными изменениями включают антитела с повышенной аффинностью к антигену (например, антитела «с созревшей аффинностью») и антитела с измененной Fc-областью, если она присутствует, например, с измененной (повышенной или пониженной) антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC) и/или комплементзависимой цитотоксичностью (CDC). (см., например, WO 00/42072 на имя Presta L. и WO 99/51642 на имя Iduosogie и др.); и/или удлинённым или укороченным временем полужизни в сыворотке (см., например, WO 00/42072 на имя Presta L.).

«Мультиспецифическая молекула» содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который находится в ассоциации или связано/связан по меньшей мере с одной другой функциональной молекулой (например, другим пептидом или белком, таким как другое антитело или лиганд для рецептора), образуя тем самым молекулу, которая связывается по меньшей мере с двумя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Примеры мультиспецифических молекул включают биспецифические антитела и антитела, связывающиеся с растворимыми фрагментами рецепторов или лигандов.

Подразумевается, что понятие «человеческое антитело» в контексте настоящего описания включает антитела, имеющие переменные области, в которых и каркасные участки, и CDR-участки имеют происхождение из последовательностей иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии (т.е. идентичны или практически идентичны им). Кроме того, если антитело содержит константную область, то константная область также «имеет происхождение» из последовательностей иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии.

Человеческие антитела, предлагаемые в изобретении, могут включать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии (например, мутации, интродуцируемые с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*). Однако не предусматривается, что понятие «человеческое антитело» в контексте настоящего описания включает антитела, в которых CDR-последовательности, имеющие происхождение из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мыши, трансплантированы в человеческие каркасные последовательности.

«Гуманизированное» антитело представляет собой человеческое/нечеловеческое химерное антитело, которое содержит минимальную последовательность, имеющую происхождение из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела представляют собой главным образом человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из гипервариабельного участка реципиента заменены остатками из обладающего требуемыми специфичностью, аффинностью и потенциалом гипервариабельного участка вида кроме человека (антитело-донор), такого как мыши, крысы, кролики или приматы кроме человека. В некоторых случаях остатки FR человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими остатками из антитела вида кроме человека. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые отсутствуют в антителе-реципиенте или в антителе-доноре. Указанные модификации осуществляют для дальнейшего улучшения характеристик антитела. В целом, гуманизированное антитело может содержать практически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или практически все гипервариабельные петли соответствуют петлям нечеловеческого иммуноглобулина, а все или практически все остатки FR представляют собой остатки последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, константной области человеческого иммуноглобулина. Дополнительные сведения см., например, у Jones и др., Nature 321, 1986, cc. 522-525; Riechmann и др., Nature 332, 1988, cc.

323-329; и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 1992, сс. 593-596, в WO 92/02190, заявке на патент США 20060073137, и в патентах США №№ 6750325, 6632927, 6639055, 6548640, 6407213, 6180370, 6054297, 5929212, 5895205, 5886152, 5877293, 5869619, 5821337, 5821123, 5770196, 5777085, 5766886, 5714350, 5693762, 5693761, 5530101, 5585089 и 5225539.

Понятие «гипервариабельный участок» в контексте настоящего описания относится к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание антигена. Гипервариабельный участок, как правило, содержит аминокислотные остатки из «определяющего комплементарность участка» или «CDR» (остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи (Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991) и/или остатки из «гипервариабельной петли» (остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи (Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917). Как правило, нумерацию аминокислотных остатков в этом участке осуществляют с помощью метода, описанного у Kabat и др., выше. Фразы, такие как «положение по Кэботу», «нумерация остатков вариабельного домена согласно Кэботу» и «согласно Кэботу», в настоящем описании относятся к указанной системе нумерации для вариабельных доменов тяжелых цепей или вариабельных доменов легких цепей. С использованием системы нумерации Кэбота фактическая линейная аминокислотная последовательность пептида может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению или инсерции в FR или CDR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать одну аминокислотную вставку (остаток 52a согласно Кэботу) после остатка 52 CDR H2 и встроенные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. согласно Кэботу) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерацию остатков по Кэботу можно определять для данного антитела путем выравнивания в областях гомологии последовательности антитела со «стандартной» пронумерованной по Кэботу последовательностью.

Остатки «каркасного участка» или «FR» представляют собой остатки VH или VL, отличные от остатков CDR, указанных в настоящем описании.

«Эпитоп» или «сайт связывания» представляет собой зону или область на антигене, с которой антигенсвязывающий пептид (такой как антитело) специфически связывается. Белковый эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании (которые обозначают также как иммунодоминантный компонент эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются специфически связывающим антиген пептидом (иными словами, аминокислотный остаток находится в пределах «исключающей доступ растворителя поверхности и/или «футпринта (следа)» специфически связывающего антиген пептида).

«Паратоп» представляет собой зону или область антигенсвязывающего участка антитела, который специфически связывается с антигеном. Если специально не указано иное или из контекста четко не следует иное, то паратоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании эпитопа, некоторые из которых, как правило, находятся в CDR, и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются специфически связанным антигеном (иными словами, аминокислотный остаток находится в пределах «исключающей доступ растворителя поверхности и/или «футпринта») специфически связанного антигена).

«Антитело, которое связывается с тем же эпитопом», что и референс-антитело, означает антитело, которое блокирует связывание референс-антитела с его антигеном при оценке с помощью анализа в условиях конкуренции на 50% или более, и, наоборот, референс-антитело блокирует связывание антитела с его антигеном при оценке с помощью анализа в условиях конкуренции на 50% или более.

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое отделено от компонента его естественного окружения. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело очищают до достижения степени чистоты, превышающей

95% или 99% по данным, полученным, например, с помощью электрофоретических методов (например, ДСН-ПАА, изоэлектрическое фокусирование (IEF), капиллярный электрофорез) или хроматографических методов (например, ионообменная хроматография или ЖХВР с обращенной фазой). Обзор методов оценки чистоты антител см., например, у Flatman и др., J. Chromatogr. B 848, 2007, сс. 79-87).

Понятие «введение» в контексте способов, предлагаемых в изобретении, означает метод терапевтического или профилактического предупреждения, лечения или улучшения состояния синдрома, нарушения или заболевания, указанного в настоящем описании, с использованием конъюгата, предлагаемого в изобретении, или включающей его формы, композиции или лекарственного средства. Указанные методы включают введение в эффективном количестве указанного антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата, или включающих его формы, композиции или лекарственного средства в различные моменты времени в процессе курса терапии или одновременно в комбинированной форме. Предлагаемые в изобретении способы следует рассматривать как охватывающие все известные терапевтические схемы лечения.

Способность антитела-мишени «блокировать» связывание молекулы-мишени с естественным лигандом для мишени означает, что антитело при оценке с помощью анализа, в котором применяют растворимые или связанные с клеточной поверхностью молекулы мишени и лиганда, может заметно снижать связывание молекулы-мишени с лигандом в зависимости от дозы, в случае, когда связывание молекулы-мишени с лигандом поддается обнаружению в отсутствии антитела.

«Гематоэнцефалический барьер» или «ГЭБ» означает физиологический барьер между периферическим кровообращением и головным и спинным мозгом, который образован плотными соединениями внутри эндотелиальных плазматических мембран капилляров головного мозга, создавая плотный барьер, который ограничивает транспорт молекул в головной мозг. ГЭБ может ограничивать транспорт в головной мозг даже очень небольших молекул, таких как мочевины (60 Да). Примеры ГЭБ включают ГЭБ в головном мозге, гематоспинальный барьер внутри спинного мозга и гематоретинальный барьер внутри сетчатки, все из

которых представляют собой смежные капиллярные барьеры внутри ЦНС. ГЭБ может включать также барьер кровь-ликвор (сосудистое сплетение), где барьер состоит из эпендимальных клеток, а не из эндотелиальных клеток капилляров.

«Рецептор гематоэнцефалического барьера» (сокращенно обозначен в описании как «R/ГЭБ») представляет собой внеклеточный связанный с мембраной рецепторный белок, экспрессируемый на эндотелиальных клетках головного мозга, который обладает способностью транспортировать молекулы через ГЭБ или который можно применять для транспорта экзогенно вводимых молекул. Примеры R/ГЭБ включают (но не ограничиваясь только ими) комплекс большого транспортера нейтральных аминокислот (LAT), включающий компонент CD98, рецептор трансферрина (TfR), рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-R), рецепторы липопротеинов низкой плотности, включая (но не ограничиваясь только ими) белок 1, подобный рецептору липопротеинов низкой плотности (LRP1), белок 8, подобный рецептору липопротеинов низкой плотности (LRP8), и гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста, подобный фактору роста (HB-EGF). Примером R/ГЭБ в настоящем описании является CD98hc.

«Центральная нервная система» или «ЦНС» относится к комплексу нервных тканей, которые контролируют функции организма, и включает головной и спинной мозг.

Понятие «конъюгат» в контексте настоящего описания относится к белку, ковалентно связанному с одной или несколькими гетерологичной(ыми) молекулой(ами), включая (но не ограничиваясь только ими) терапевтический пептид или белок, антитело, метку или лекарственное средство против неврологического нарушения.

В контексте настоящего описания понятие «сшитые» относится к соединению и связыванию вместе двух или большего количества субстанций. Касательно химических или биологических соединений, понятие «сшитые» может относиться к ковалентной связи между двумя или большим количеством химических или биологических соединений. В качестве примера, не ограничивающего объем изобретения, антитело, предлагаемое в изобретении, можно сшивать с представляющим интерес пептидом с образованием сшитого с пептидом антитела.

Сшитое с пептидом антитело можно получать посредством специфических химических реакций, предназначенных для получения конъюгата антитела с пептидом. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, можно ковалентно сшивать с пептидом, предлагаемым в изобретении, через линкер. Линкер можно, например, сначала ковалентно связывать с антителом или пептидом, затем ковалентно связывать с пептидом или антителом.

Понятие «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» агента, например, фармацевтической композиции, относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата.

Понятие «линкер» в контексте настоящего описания относится к химическому линкеру или одноцепочечному пептидному линкеру, который ковалентно связывает две различные субстанции. Линкер можно применять для соединения любых двух антител или их фрагментов, шаттла для гематоэнцефалического барьера, слитого белка и конъюгата, предлагаемых в настоящем изобретении. Линкер может соединять, например, VH и VL в scFv или моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с терапевтической молекулой, такой как второе антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения, если одновалентная связывающая субстанция содержит scFv, направленный против CD98, предпочтительно человеческого CD98hc, а терапевтическая молекула содержит антитело, направленное против мишени в ЦНС, такой как Тау, то линкер может соединять scFv с антителом, направленным против Тау. Можно применять одноцепочечные пептидные линкеры, состоящие из 1-25 аминокислот, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот, соединенных пептидными связями. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислоты выбирают из 20 встречающихся в естественных условиях аминокислот. В конкретных других вариантах осуществления изобретения одну или несколько аминокислот выбирают из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. Можно применять также химические линкеры, такие как углеводородный линкер,

полиэтиленгликолевый (ПЭГ) линкер, полипропиленгликолевый (PPG) линкер, полисахаридный линкер, полиэфирный линкер, гибридный линкер, состоящий из ПЭГ и встроенного гетероцикла, и углеводородную цепь.

В контексте настоящего описания понятие «неврологическое нарушение» относится к заболеванию или нарушению, которое поражает ЦНС и/или которое имеет этиологию, связанную с ЦНС. Примеры заболеваний или нарушений ЦНС включают (но не ограничиваясь только ими) невропатию, амилоидоз, рак, глазное заболевание или нарушение, вирусную или микробную инфекцию, воспаление, ишемию, нейродегенеративное заболевание, судороги, поведенческие расстройства и лизосомную болезнь накопления. Для целей настоящей заявки следует понимать, что ЦНС включает глаз, который в норме изолирован от остальной части тела гематоэнцефалическим барьером. Конкретные примеры неврологических нарушений включают (но не ограничиваясь только ими) нейродегенеративные заболевания (включая, но не ограничиваясь только ими, болезнь с тельцами Леви, синдром постполиомиелита, синдром Шай-Дрегера, оливопонтocerebellарную атрофию, болезнь Паркинсона, множественную системную атрофию, стриатонигральную дегенерацию, спиноцереbellарную атаксию, спинальную мышечную атрофию), тауопатии (включая, но не ограничиваясь только ими, болезнь Альцгеймера и супрануклеарный паралич), прионные заболевания (включая, но не ограничиваясь только ими, губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота, скрепи, синдром Крейтцфельда-Якоба, куру, болезнь Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, хроническую истощающую болезнь и фатальную семейную бессонницу), бульбарный паралич, заболевания двигательных нейронов и гетеродегенеративные нарушения нервной системы (включая, но не ограничиваясь только ими, болезнь Канавана, болезнь Хантингтона, нейрональный цероид-липофусциноз, болезнь Александра, синдром Туретта, синдром курчавых волос Менкеса, синдром Кокейна, синдром Халервордена-Спатца, болезнь Лафоры, синдром Ретта, гепатолентикулярную дегенерацию, синдром Леша-Найхана и синдром Унверрихта-Лундборга), деменции (включая, но не ограничиваясь только ими, болезнь Пика и спиноцереbellарную атаксию) и рак(например, ЦНС и/или

головного мозга, включая метастазы в головной мозг, возникающие в результате рака в других частях организма).

«Лекарственное средство против неврологического нарушения» представляет собой лекарственное средство или терапевтический агент, которое/который можно
 5 применять для лечения или облегчения воздействий одного или нескольких неврологического(их) нарушения(й). Лекарственное средство против неврологического нарушения включает (но не ограничиваясь только ими) низкомолекулярные соединения, антитела, пептиды, белки, встречающиеся в естественных условиях лиганды для одной или нескольких мишени(ей) в ЦНС,
 10 модифицированные версии встречающихся в естественных условиях лигандов для одной или нескольких мишени(ей) в ЦНС, аптамеры, ингибирующие нуклеиновые кислоты (т.е. малые ингибирующие РНК (siРНК) и короткие РНК-шпильки (shРНК)), рибозимы или активные фрагменты любой из вышеуказанных субстанций. Примеры лекарственных средств против неврологических нарушений,
 15 предлагаемых в изобретении, указаны в настоящем описании и включают (но не ограничиваясь только ими): антитела, аптамеры, белки, ингибирующие нуклеиновые кислоты и малые молекулы, и активные фрагменты любой из вышеуказанных субстанций, которые либо сами по себе, либо специфически распознают и/или воздействуют на (т.е. ингибируют, активируют или
 20 обнаруживают) антиген или молекулу-мишень в ЦНС, такую как (но не ограничиваясь только ими) белок-предшественник амилоида или его участки, амилоид-бета, бета-секретаза, гамма-секретаза, тау, альфа-синуклеин, паркин, гентингтин, DR6, пресенилин, ApoE, маркеры глиомы или других раков ЦНС и нейротрофины. Примеры лекарственных средств против неврологических
 25 нарушений и соответствующие нарушения, для лечения которых их можно применять, включают (но не ограничиваясь только ими): нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) при хроническом повреждении головного мозга (нейрогенез), фактор роста фибробластов 2 (FGF-2), антитело к рецептору антиэпидермального фактора роста (антитело к EGFR) при раке головного мозга,
 30 нейротрофический фактор болезни Паркинсона, полученный из глиальной клеточной линии (GDNF), нейротрофический фактор головного мозга фактор

(BDNF) при боковом амиотрофическом склерозе, депрессии, нарушении накопления лизосомного фермента в головном мозге, цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) при боковом амиотрофическом склерозе, нейрегулин-1 при шизофрении, антитело против HER2 (например, трастузумаб) при метастазах в головной мозг HER2-позитивного рака.

Понятие «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективную биологическую активность действующего вещества, входящего в нее, и которая не содержит дополнительных компонентов, обладающих нежелательной токсичностью для субъекта, которому требуется вводить композицию.

В контексте настоящего описания понятие «фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель» означает любую субстанцию, пригодную для введения индивидууму. Например, фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой стерильный водный раствор, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор (ЗФР) или воду для инъекций.

В контексте настоящего описания понятие «фармацевтически приемлемые соли» означает физиологически и фармацевтически приемлемые соли соединений, таких как олигомерные соединения или олигонуклеотиды, т.е. соли, которые сохраняют требуемую биологическую активность родительского соединения и не оказывают нежелательного токсикологического воздействия.

Фармацевтически приемлемые кислые и/или анионные соли, предназначенные для применения согласно изобретению, включают (но не ограничиваясь только ими) ацетат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, битартрат, бромид, эдетат кальция, камсилат, карбонат, хлорид, цитрат, дигидрохлорид, эдетат, эдизилат, эстолат, эзилат, фумарат, глицептат, глюконат, глутамат, гликоллиларсанилат, гексилрезорцинат, гидрабамин, гидробромид, гидрохлорид, гидроксиафтоат, йодид, изетионат, лактат, лактобионат, малат, малеат, манделат, мезилат, метилбромид, метилнитрат, метилсульфат, мукат, напсилат, нитрат, памоат, пантотенат, фосфат/дифосфат, полигалактуронат, салицилат, стеарат, субацетат, сукцинат, сульфат, таннат, тартрат, теоклат, тозилат и триэтиодид. Органические или неорганические кислоты включают также (но не ограничиваясь только ими)

гидрийодную, перхлорную, серную, фосфорную, пропионовую, гликолевую, метансульфоновую, гидроксипансульфоновую, щавелевую, 2-нафталинсульфоновую, толуолсульфоновую, циклогексансульфаминовую, сахариновую или трифторуксусную кислоту. Фармацевтически приемлемые основные/катионные соли включают (но не ограничиваясь только ими) соли алюминия, 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диола (также известный как трис(гидроксиметил)аминометан, трометан или «ТРИС»), аммиака, бензатина, *трет*-бутиламина, кальция, хлоропрокаина, холина, циклогексиламина, диэтаноламина, этилендиамина, лития, L-лизина, магния, меглюмина, N-метил-D-глюкамина, пиперидина, калия, прокаина, хинина, натрия, триэтаноламина или цинка.

«Полипептид» или «белок» означает молекулу, которая содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, соединенных с помощью пептидной связи с образованием полипептида. Небольшие полипептиды, состоящие из менее чем 50 аминокислот, можно обозначать как «пептиды».

Фразы «идентичность последовательности» или «процент (%) идентичности последовательности» или «% идентичности» или «% идентичности с» при их применении относительно аминокислотной последовательности описывают количество совпадений («хитов») идентичных аминокислот двух или большего количества выровненных аминокислотных последовательностей по сравнению с количеством аминокислотных остатков, составляющих общую длину аминокислотных последовательностей. В других понятиях с использованием сравнительного анализа первичной структуры двух или большего количества последовательностей можно определять процент одинаковых аминокислотных остатков (например, идентичность, составляющая 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100%, по всей длине аминокислотных последовательностей), путем сравнения и выравнивая последовательностей для максимального соответствия, осуществляя измерение с использованием алгоритма для сравнения последовательностей, известного в данной области, или путем ручного выравнивания и визуального осмотра. Таким образом, последовательности, которые сравнивают для определения идентичности последовательности, могут отличаться

заменой(ами), добавлением(ями) или делецией(ями) аминокислот. Приемлемые программы для выравнивания белковых последовательностей известны специалистам в данной области. Процент идентичности белковых последовательностей можно определять, например, с помощью программ, таких как CLUSTALW, Clustal Omega, FASTA или BLAST, например, используя алгоритм NCBI BLAST (Altschul S.F. и др., Nucleic Acids Res. 25, 1997, сс. 3389-3402).

Понятия «специфическое связывание» или «специфично связывается», или «связывается» относится к связыванию антитела с антигеном или эпитопом в антигене с более высокой аффинностью по сравнению с другими антигенами. Как правило, связывание антитела с антигеном или эпитопом в антигене характеризуется константой диссоциации (K_D), составляющей примерно $1 \times 10^{-8} \text{ М}$ или менее, например, примерно $1 \times 10^{-9} \text{ М}$ или менее, примерно $1 \times 10^{-10} \text{ М}$ или менее, примерно $1 \times 10^{-11} \text{ М}$ или менее или примерно $1 \times 10^{-12} \text{ М}$ или менее, как правило, величина K_D по меньшей мере в сто раз меньше, чем K_D , характеризующая связывание с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеин). K_D представляет собой константу равновесия скорости диссоциации, т.е. $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$, между антителом и его антигеном. K_D и аффинность находятся в обратной зависимости. «Константа скорости ассоциации» («on-rate») (k_{on}) представляет собой константу, которую применяют для определения того, насколько быстро антитело связывается с его мишенью. «Константа скорости диссоциации» («off-rate») (k_{off}) представляет собой константу, которую применяют для определения того, насколько быстро происходит диссоциация антитела от его мишени. Константу диссоциации K_D можно измерять с помощью стандартных процедур. Например, K_D антитела можно определять на основе поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore®, или с использованием технологии биослойной интерферометрии, например, с использованием системы Octet RED96. Чем ниже величина K_D антитела, тем выше аффинность, с которой антитело связывается с антигеном-мишенью. Антитела, которые специфически связываются с антигеном или эпитопом в антигене, тем не менее могут обладать перекрестной реактивностью к другим родственным антигенам, например, к такому же антигену из других видов (гомологи), таких как

человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (циномолгус, cyno), *Pan troglodytes* (шимпанзе, chimp) или *Callithrix jacchus* (игрунка обыкновенная, игрунка). В то время как моноспецифическое антитело специфически связывается с одним антигеном или одним эпитопом, биспецифическое антитело специфически связывается с двумя различными антигенами или двумя различными эпитопами.

Понятие «субъект (индивидуум)» в контексте настоящего описания относится к млекопитающему. Млекопитающие включают (но не ограничиваясь только ими) одомашненных животных (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматов (например, людей и приматов кроме человека, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мыши и крысы). В конкретных вариантах осуществления изобретения индивидуум или субъект представляет собой человека. Если субъект представляет собой человека, то его можно обозначать также как «пациент».

Понятие «практически идентичные» в контексте двух аминокислотных последовательностей означает, что последовательности после оптимального выравнивания, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, с использованием задаваемых по умолчанию весов брешей, характеризуются по меньшей мере примерно 50%-ной идентичностью последовательностей. Как правило, практически идентичные последовательности должны обладать по меньшей мере примерно 60%-ной, по меньшей мере примерно 70%-ной, по меньшей мере примерно 80%-ной, по меньшей мере примерно 90%-ной, по меньшей мере примерно 95%-ной, по меньшей мере примерно 98%-ной или по меньшей мере примерно 99%-ной идентичности последовательностей.

Понятие «CD98» или «CD98hc» в контексте настоящего описания относится к интегральному мембранному белку, состоящему из кластера дифференцировки 98 тяжелой цепи (CD98hc), который связывается с любой из множества легких цепей с помощью дисульфидной связи. При ассоциации с LAT1 или LAT2 гетеродимерные транспортные комплексы ведут себя как облигатные обменники аминокислот. CD98hc имеет молекулярную массу примерно 80 кДа. Предпочтительно CD98hc представляет собой человеческий CD98hc (huCD98hc). huCD98hc кодируется геном SLC3A2.

Понятие «антиген-мишень» или «мишень в головном мозге» в контексте настоящего описания относится к антигену и/или молекуле, который/которая экспрессируется в ЦНС, включая головной мозг, который/которую может таргетировать антитело, или малую молекулу. Примеры таких антигенов и/или молекул включают (но не ограничиваясь только ими): бета-секретазу 1 (BACE1), амилоид бета (Abeta), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2), Тау, аполипопротеин E4 (ApoE4), альфа-синуклеин, CD20, гентингтин, прионный белок (PrP), киназу 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркин, пресенилин 1, пресенилина 2, гамма-секретазу, рецептор смерти 6 (DR6), белок-предшественник амилоида (APP), рецептор нейротрофина р75 (р75NTR) и каспазу 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-мишень представляет собой BACE1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-мишень представляет собой Тау.

В контексте настоящего описания понятие «лечение» (и его грамматические вариации, такие как «лечить» и «процесс лечения») относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного хода лечения индивидуума, и его можно осуществлять либо для профилактики, либо в процессе течения клинической патологии. Желаемые эффекты лечения включают (но не ограничиваясь только ими) предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение болезненного состояния, а также ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, применяют для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

Антитела или иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgG является наиболее стабильным из пяти типов иммуноглобулинов, его время полужизни в сыворотке человека составляет примерно 23 дня. IgA и IgG дополнительно разделяют на

подклассы, такие как изотипы IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Каждый из четырех подклассов IgG обладает различными биологическими функциями, известными как эффекторные функции. Указанные эффекторные функции, как правило, опосредуются в результате взаимодействия с Fc-рецептором (FcγR) и/или связывания C1q и фиксации комплемента. Связывание с FcγR может приводить к антителозависимому клеточно-обусловленному цитолизу или антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности (ADCC), в то время как связывание с факторами комплемента могут приводить к комплемент-обусловленному лизису клеток или комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Антитело к CD98, предлагаемое в изобретении, или терапевтическое или диагностическое антитело, подлежащее конъюгации или слиянию с антителом к CD98, может не обладать эффекторной функцией или может обладать минимальной эффекторной функцией, но сохранять свою способность связываться с FcRn, связывание с которым может представлять собой основное средство, с помощью которого антитела обладают удлиненным временем полужизни *in vivo*.

Связывание FcγR или комплемента (например, C1q) с антителом вызывается определенными белок-белковыми взаимодействиями в так называемом сайте связывания Fc-участка. Указанный сайт связывания Fc-участка известен в данной области. Указанный сайт связывания Fc-участка включает, например, отличается аминокислотами L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к CD98, предлагаемое в изобретении, или терапевтическое или диагностическое антитело, подлежащее конъюгации или слиянию с антителом к CD98, содержит одну или несколько замен в одном или в нескольких сайтах связывания Fc-участка для элиминации эффекторной функции. Например, антитело к CD98, предлагаемое в изобретении, или терапевтическое или диагностическое антитело, подлежащее конъюгации или слиянию с антителом к CD98, может содержать Fc-область, которая содержит одну или несколько из следующих замен: замену глутамата на пролин на остатке 233, фенилаланина на аланин или валин на остатке 234 и лейцина на аланин или глутамат на остатке 235 (EU-нумерация, Kabat E. A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд. U.S. Department

of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991). Предпочтительно антитело, представляющее интерес, содержит одну, две или три мутации L234A, L235A и P331S (EU-нумерация по Кэботу).

Антитела подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, как правило, обладают способностью активировать комплемент, включая связывание C1q и C3, в то время как IgG4 не активирует систему комплемента и не связывается с C1q и/или C3. Fc-область человеческого IgG4 обладает пониженной способностью связываться с FcγR и факторами комплемента по сравнению с другими подтипами IgG. Предпочтительно антитело к CD98, предлагаемое в изобретении, или терапевтическое или диагностическое антитело, подлежащее конъюгации или слиянию с антителом к CD98, содержит Fc-область, полученную из Fc-области человеческого IgG4. Более предпочтительно Fc-область содержит Fc-область человеческого IgG4, которая имеет замены, способствующие элиминации эффекторной функции. Например, удаление сайта N-связанного гликозилирования в Fc-области IgG4 путем замены Asn на Ala на остатке 297 (EU-нумерация) представляет собой другой путь, гарантирующий элиминацию сохранившейся эффекторной функции.

Антитела к CD98 и их антигенсвязывающие фрагменты

Один из основных объектов заявки относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое/который связывается с CD98 приматов, например, CD98 человека или CD98 обезьян, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент оптимизируют для доставки агента в головной мозг субъекта, который нуждается в этом. При создании настоящего изобретения неожиданно установлена более тонкая по сравнению с описанной ранее взаимосвязь между аффинностью и эффективностью трансцитоза, с влиянием как скорости ассоциации, так и скорости диссоциации на концентрацию в головном мозге. В частности, нейтральная скорость диссоциации, которая не является ни слишком быстрой, ни слишком медленной, требуется для оптимальной ФК и ФД в головном мозге агента (такого как МАт) для эффективной доставки с помощью антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента.

Предпочтительно антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в заявке, обладает рН-чувствительностью, например,

имеет различные аффинности связывания с CD98 при различных pH. Например, антитело к CD98, предлагаемое в заявке, может связываться с находящимся на клеточной поверхности CD98 при нейтральном значении pH, таком как физиологическое значение pH (например, pH 7,4), с высокой аффинностью, но после интернализации в компартмент эндосомы диссоциироваться от CD98 при кислом значении pH, таком как относительно более низкое значение pH (pH 5,0-6,0). Аффинность количественно оценивают как силу связывания между двумя фрагментами, например, антитела и антигена. Аффинность можно характеризовать несколькими путями. Один из путей основан на использовании понятия константы диссоциации (K_D) взаимодействия. K_D можно измерять с помощью общепринятых методов, включая равновесный диализ, или путем непосредственного измерения скоростей диссоциации и ассоциации антигена и антитела, коэффициентов скоростей k_{off} (k_d или k_{dis}) и k_{on} (или k_a) соответственно (см., например, Nature, 361, 1993, сс. 186-87). Соотношение k_{off}/k_{on} аннулирует все параметры, не связанные с аффинностью, и равно константе диссоциации K_D (см., общие сведения у Davies и др., Annual Rev Biochem, 59, 1990, сс. 439-473). Таким образом, более низкая величина K_D соответствует более высокой аффинности. Для другого определения аффинности применяют величину K_a , обратную K_D или представляющую собой k_{on}/k_{off} . Таким образом, более высокая величина K_a соответствует более высокой аффинности. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предназначенное/предназначенный для применения в композиции или способе согласно настоящей заявке, может представлять собой антитело или его фрагмент, связывание которого с CD98 характеризуется величиной K_D , составляющей 1 наномоль (нМ, 10^{-9} М) или более при нейтральном значении pH (например, pH 6,8-7,8), таком как физиологическое значение pH (например, pH 7,4), и его диссоциация от CD98 характеризуется $k_{dis} 10^{-4} \text{с}^{-1}$ или более при кислом значении pH (например, pH 4,5-6,0), таком как pH 5,0).

Таким образом, основной объект заявки относится к антителу к CD98 или его антигенсвязывающему фрагменту, предназначенному для доставки агента в головной мозг субъекта, который нуждается в этом, где связывание антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента с CD98, предпочтительно CD98hc,

более предпочтительно человеческим CD98hc, характеризуется константой диссоциации K_D , составляющей по меньшей мере 1нМ, предпочтительно от 1 до 500нМ, при нейтральном значении pH и константой скорости диссоциации k_d , составляющей по меньшей мере 10^{-4}с^{-1} , предпочтительно от 10^{-4} до 10^{-1}с^{-1} , при

5 кислом значении pH, предпочтительно при pH 5.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в заявке, имеют константу скорости диссоциации k_d , составляющую от 2×10^{-2} до $2 \times 10^{-4} \text{с}^{-1}$, например, 2×10^{-2} , 1×10^{-2} , 9×10^{-3} , 8×10^{-3} , 7×10^{-3} , 6×10^{-3} , 5×10^{-3} , 4×10^{-3} , $3 \times$

10 10^{-3} , 2×10^{-3} , 1×10^{-3} , 9×10^{-4} , 8×10^{-4} , 7×10^{-4} , 6×10^{-4} , 5×10^{-4} , 4×10^{-4} , 3×10^{-4} , $2 \times 10^{-4} \text{с}^{-1}$, или любую величину, находящуюся между указанными величинами, при нейтральном значении pH.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который связывается с человеческим

15 CD98, представляет собой антитело в виде единичного переменного домена на тяжелой цепи (VHH), которое содержит определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие следующие аминокислотные последовательности:

(I) SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно;

20 (II) SEQ ID NO: 48, 49 и 50 соответственно; или

(III) SEQ ID NO: 143, 144 и 145 соответственно.

Предпочтительно оно представляет собой VHH-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или

25 100%, идентична последовательности SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 142.

В других вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который связывается с человеческим CD98, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит

30 определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменную область легкой цепи, которая содержит определяющие

комплементарность участки легкой цепи (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют следующие аминокислотные последовательности:

- (I) SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 и 12 соответственно;
- 5 (II) SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70, 71 и 72 соответственно;
- (II) SEQ ID NO: 89, 90, 91, 92, 93 и 94 соответственно;
- (IV) SEQ ID NO: 113, 114, 115, 116, 117 и 118 соответственно;
- (V) SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127 и 128 соответственно;
- (VI) SEQ ID NO: 133, 134, 135, 136, 137 и 138 соответственно;
- 10 (VII) SEQ ID NO: 150, 151, 152, 153, 154 и 155 соответственно;
- (VIII) SEQ ID NO: 160, 161, 162, 163, 164 и 165 соответственно;
- (IX) SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно;
- (X) SEQ ID NO: 180, 181, 182, 183, 184 и 185 соответственно;
- (XI) SEQ ID NO: 194, 195, 196, 197, 198 и 199 соответственно; или
- 15 (XII) SEQ ID NO: 204, 205, 206, 207, 208 и 209 соответственно.

В других вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в заявке, конкурирует с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в качестве примера в настоящем описании. Сайт связывания антитела или антигена можно

20 определять известными методами, такими как ELISA, Вестерн-блоттинг и др. В конкретных вариантах осуществления изобретения указанное конкурирующие антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается представленное/представленный в качестве примера антитело или его

25 антигенсвязывающий фрагмент. Подробное описание приведенных в качестве примера методов картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлено в «Epitope Mapping Protocols» в: Methods in Molecular Biology, т. 66, под ред. Morris G. E., изд-во Humana Press, Totowa, N.J., 1996). Понятие «антитело, которое связывается с тем же эпитопом», что и референс-антитело, относится к

30 антителу, которое блокирует связывание референс-антитела с его антигеном при оценке с помощью анализа в условиях конкуренции на 50% или более, и наоборот,

референс-антитело блокирует связывание антитела с его антигеном при оценке с помощью анализа в условиях конкуренции на 50% или более.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который содержит вариабельную область тяжелой цепи (H_V), ковалентно связанную с вариабельной областью легкой цепи (L_V) через гибкий линкер. scFv может сохранять специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и интродукцию линкера. В scFv расположение доменов может быть либо H_V -линкер- L_V , либо L_V -линкер- H_V . Линкер можно создавать *de novo* или получать из известной белковой структуры с образованием линкера, имеющего длину и конформацию, приемлемые для соединения вариабельных доменов scFv без серьезных стерических помех. Линкер может иметь от 10 до примерно 25 аминокислот в длину. Предпочтительно линкер представляет собой пептидный линкер длиной примерно 3,5 нм (35 Å), расположенный между карбоксильным концом вариабельного домена и аминоконцом другого домена, не оказывая воздействия на способность доменов к укладке и образованию интактного антигенсвязывающего центра (Huston и др., *Methods in Enzymology*, т. 203, 1991, сс. 46–88, публикация в полном объеме включена в настоящее описание в качестве ссылки). Линкер предпочтительно содержит гидрофильную последовательность во избежание интеркаляции пептида внутри или между вариабельными доменами в процессе укладки белка (Argos, *Journal of Molecular Biology*, т. 211, № 4, 1990, сс. 943–958). Например, линкер может содержать остатки Gly и Ser и/или они могут перемежаться с заряженными остатками, такими как Glu, Thr и Lys, для повышения растворимости. В одном из вариантов осуществления изобретения линкер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189 (GTEGKSSGSGSESKST). В настоящем описании можно применять также другие приемлемые линкеры.

В некоторых вариантах осуществления изобретения scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 132, SEQ ID

NO: 149, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 193 или SEQ ID NO: 203.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который связывается с CD98, предпочтительно CD98hc, более предпочтительно человеческим CD98hc, не содержит свободный цистеин.

Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент (такой как VHH- или scFv-фрагмент) можно получать с помощью приемлемых известных в данной области методов, представленных в настоящем описании. Например, VHH- или scFv-фрагмент можно получать методом рекомбинации путем выращивания рекомбинантной клетки-хозяина (такой как клетка бактерий, дрожжей или млекопитающих) в условиях, приемлемых для получения фрагмента антитела и выделения фрагмента из клеточной культуры.

Конструкция шаттла для головного мозга

Создавали оптимизированную платформу для доставки в головной мозг посредством RMT с использованием CD98 путем повышения собственно эффективности транскитоza, расширения периферической фармакокинетики и разработки приемлемого профиля безопасности с сохранением эффективности терапевтического МАт. Изучали взаимодействие между аффинностью участвующего в транскитоze рецептора и концентрацией в головном мозге обезьян циномолгус. В процессе изучения кинетики связывания продемонстрировано, что для оптимальных ФК- и ФД- характеристик МАт требуется нейтральная скорость диссоциации, которая не является ни слишком быстрой, ни слишком медленной.

Установлено также, что при применении сконструированной константной области антитела с повышенной способностью связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) обнаружен пониженный периферический клиренс и повышенная концентрация в головном мозге.

Интродуцировали дополнительные мутации в Fc для элиминации связывания с рецепторами Fc-гамма (FcγR) и во избежание токсичности, опосредованной эффекторными функциями. В сочетании с высокой аффинностью Тау-связывающего МАт эти мутации предупреждали токсичность, опосредованную

эффекторными функциями, на периферии, поддерживая при этом антителозависимый фагоцитоз (ADP) посредством нового не связанного с FcγR механизма поглощения микроглией и расщепления мишени. Указанный механизм зависит от интернализации через рецептор CD98 и является более эффективным в отношении усиления расщепления мишени, чем традиционный FcγR-опосредуемый ADP, без стимуляции секреции провоспалительных цитокинов. Согласно известному авторам изобретения уровню техники, настоящая заявка является первым сообщением о не опосредованном FcγR ADP, представляющим собой новый эффективный невоспалительный механизм фагоцитоза, который можно использовать для различных терапевтических применений.

Таким образом, согласно одному основному объекту изобретения заявка относится к таргетированной антителом системе доставки в головной мозг, которая содержит антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в заявке. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент можно применять для доставки терапевтического или диагностического агента в клетку (например, раковую клетку) или систему ГЭБ. Агенты, которые можно доставлять, включают любое лекарственное средство против неврологического нарушения или агент, который можно применять для выявления или анализа лекарственного средства против неврологического нарушения. Например, такой агент может представлять собой нейротрофические факторы, включая (но не ограничиваясь только ими) фактор роста нерва (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF) и инсулиноподобный фактор роста (IGF); нейропептиды, включая (но не ограничиваясь только ими), вещество Р, нейропептид Y, вазоактивный кишечный пептид (VIP), гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), допамин, холецистокинин (ССК), эндорфины, энкефалины и тиреотропин-рилизинг-гормон (TRH); цитокины; анксиолитические агенты; противосудорожные средства; полинуклеотиды и трансгены, включая, например, малые интерферирующие РНК и/или антисмысловые олигонуклеотиды; или антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с мишенью в головном мозге. Антитело к CD98

или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в заявке, может представлять собой эффективное средство для улучшения доставки представляющего интерес агента из крови в головной мозг и функционирования в нем.

5 В частности, представляющий интерес агент можно доставлять в объединенной форме или связанным с антителом к CD98 или его антигенсвязывающим фрагментом, предлагаемым в заявке, парентерально, например, внутривенно. Например, агент можно нековалентно связывать с антителом к CD98 или его антигенсвязывающим фрагментом. Агент можно также
10 нековалентно связывать с антителом к CD98 или его антигенсвязывающим фрагментом с образованием конъюгата. В конкретных вариантах осуществления изобретения конъюгация происходит путем слияния белков (т.е. путем генетического слияния двух генов, кодирующих антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент и лекарственное средство против неврологического
15 нарушения, и их экспрессии в виде одного белка). Известные методы, которые можно применять для соединения агента с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, рассмотрены в настоящем описании (см., например, Wu и др., *Nat Biotechnol.*, 23(9), 2005, сс. 1137-1146; Trail и др., *Cancer Immunol Immunother.*, 52(5), 2003, сс. 328-337; Saito и др., *Adv Drug Deliv Rev.*, 55(2), 2003, сс. 199-215; Jones и др., *Pharmaceutical Research*, 24(9), 2007, сс. 1759-1771).

В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтический или диагностический агент, подлежащий доставке в головной мозг, и антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент можно ковалентно связывать друг с другом (или конъюгировать) через непептидный линкер или пептидный линкер. Примеры
25 непептидных линкеров включают (но не ограничиваясь только ими) полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированный полиол, простой поливиниловый спирт, полисахариды, декстран, поливиниловый эфир, биоразлагаемый полимер, полимеризованный липид, хитины и гиалуроновую кислоту или их производные
30 или их комбинации. Пептидный линкер может представлять собой пептидную цепь, состоящую из 1-50 аминокислот, сцепленных пептидными связями, или их

производное, N-конец и С-конец которого может быть ковалентно связан с антителом к CD98 или его антигенсвязывающим фрагментом.

В конкретных вариантах осуществления изобретения конъюгат, предлагаемый заявке, представляет собой мультиспецифическое антитело, которое содержит

5 первую антигенсвязывающую область, которая связывается с CD98, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывается с антигеном в головном мозге, таким как бета-секретаза 1 (BACE1), tau и другими антигенами в головном мозге, указанными в настоящем описании. Технологии создания мультиспецифических антител включают (но не ограничиваясь только ими) рекомбинантную

10 коэкспрессию двух пар тяжелых цепей-легких цепей иммуноглобулина, имеющих различные специфичности (см., Milstein и Cuello, Nature 305, 1983, с. 537), WO 93/08829 и Traunecker и др., EMBO J. 10, 1991, с. 3655), и создание конструкции «выступ-во-впадину» (knob-in-hole) (см., например, патент США № 5731168). Мультиспецифические антитела можно получать путем создания регулируемых

15 электростатическими силами воздействий (WO 2009/089004A1); перекрестного сшивания двух или большего количества антител или фрагментов (см., например, патент США № 4676980 и Brennan и др., Science, 229, 1985, с. 81); использования лейциновых молний (см., например, Kostelny и др., J. Immunol., 148(5), 1992, сс. 1547-1553); использования технологии «diabody» (димерные антитела) (см.,

20 например, Hollinger и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1993, сс. 6444-6448); использования димеров одноцепочечных Fv (sFv) (см. например, Gruber и др., J. Immunol, 152, 1994, с. 5368); и получения триспецифических антител, согласно методу, описанному у Tutt и др., J. Immunol. 147, 1991, с. 60. Мультиспецифическое антитело, предлагаемое в заявке, содержит также антитела, имеющие три или

25 большее количество функциональных антигенсвязывающих центров, включая «антитела-осьминоги» или «иммуноглобулины с двумя переменными доменами» (DVD) (см., например, US 2006/0025576A1 и Wu и др., Nature Biotechnology, 25(11), 2007, сс. 1290-1297). Мультиспецифическое антитело, предлагаемое в заявке, включает также «Fab двойного действия» или «DAF», содержащий

30 антигенсвязывающую область, которая связывается с CD98, а также с антигеном в головном мозге (например, BACE1 или Tau) (см., например, US 2008/0069820). В

одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой фрагмент из числа различных фрагментов, указанных в описании.

В одном из вариантов осуществления изобретения мультиспецифическое антитело, предлагаемое в заявке, представляет собой слитую конструкцию, содержащую антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в заявке, перекрестно связанное/связанный (или слитое/слитый) со вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Предпочтительно второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с мишенью в головном мозге, такой как BACE, tau или другие антигены в головном мозге, например, указанные в настоящем описании. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент можно сливать с карбоксильным и/или аминоконцом легкой и/или тяжелой цепи второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента непосредственно или через линкер.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент сливают с карбоксильным концом легкой цепи второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента непосредственно или через линкер.

В другом варианте осуществления изобретения антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент сливают с аминоконцом легкой цепи второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента непосредственно или через линкер.

В другом варианте осуществления изобретения антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент сливают с карбоксильным концом тяжелой цепи второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента непосредственно или через линкер.

В другом варианте осуществления изобретения антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент сливают с аминоконцом тяжелой цепи второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента непосредственно или через линкер.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения слитая конструкция, предлагаемая в заявке, содержит антитело к CD98 или его

антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно анти-huCD98hc VHH- или scFv-фрагмент, предлагаемый в заявке, ковалентно связанный через линкер с карбоксильным концом только одной из двух тяжелых цепей второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое/который связывается с мишенью в головном мозге. Предпочтительно линкер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 312 или SEQ ID NO: 313.

Для облегчения образования гетеродимера между двумя тяжелыми цепями, например, одна из которых слита с антителом к CD98 или его антигенсвязывающим фрагментом, а другая не слита с ними, или одна содержит Fc для анти-CD98-плеча и одна для плеча антитела, связывающегося с мишенью в головном мозге, мутации, способствующие гетеродимеризации, интродуцируют в Fc двух тяжелых цепей. Примеры указанных мутаций Fc включают (но не ограничиваясь только ими) мутации, разработанные фирмой Zymework (см., например, US 10457742), и мутации «knob in hole» (см., например, Ridgway и др., Protein Eng., 9(7), 1996, сс. 617-621). Согласно изобретению можно применять также другие способствующие гетеродимеризации мутации. В некоторых вариантах осуществления изобретения применяют модифицированный СН3, указанный в настоящем описании, для облегчения образования гетеродимера между двумя тяжелыми цепями. Помимо способствующих гетеродимеризации мутаций можно интродуцировать также другие мутации. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-область слитой конструкции или биспецифического антитела содержит дополнительно одну или несколько мутаций, которые изменяют (повышают или снижают), предпочтительно элиминируют, ADCC/CDC (такие как AAS-мутации, указанные в настоящем описании), и/или одну или несколько мутаций, которые изменяют (повышают или снижают), предпочтительно повышают, связывание слитой конструкции или биспецифического антитела с FcRn (такие как YTE-мутации, указанные в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько остатков цистеина в слитой конструкции или биспецифическом антителе заменяют другими аминокислотами, такими как серин.

В конкретных вариантах осуществления изобретения слитая конструкция, предлагаемая в заявке, содержит:

(1) первую тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, аминокислотной последовательности, выбранной из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22, 25, 32, 35, 38, 41, 44, 51, 54, 57, 60, 63, 73, 76, 79, 82, 85, 95, 98, 101, 104, 107, 119, 129, 139, 146, 156, 166, 176, 186, 200, 210 и 219;

(2) две легкие цепи, каждая из которых независимо друг от друга имеет аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, аминокислотной последовательности, выбранной из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 14, 17, 20, 23, 26, 33, 36, 42, 45, 52, 55, 58, 61, 64, 74, 77, 80, 83, 86, 96, 99, 102, 105, 108, 120, 130, 140, 147, 157, 167, 177, 187, 201, 211 и 220 соответственно; и

(3) вторую тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, аминокислотной последовательности, выбранной из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 15, 18, 21, 24, 27, 34, 37, 43, 46, 53, 56, 59, 62, 65, 75, 78, 81, 84, 87, 97, 100, 103, 106, 109, 121, 131, 141, 148, 158, 168, 178, 188, 202, 212 и 221 соответственно.

Конъюгат, такой как мультиспецифическое антитело или слитая конструкция, предлагаемое/предлагаемая в заявке, можно получать с помощью любой из многочисленных технологий, известных в данной области, которые указаны в настоящем описании. Например, их можно экспрессировать из рекомбинантных клеток-хозяев путем трансфекции клеток-хозяев экспрессионным(ыми) вектором(ами), кодирующим(и) тяжелые и легкие цепи слитой конструкции или мультиспецифического антитела, с использованием стандартных методов. Клетки-хозяева могут представлять собой прокариотические или эукариотические клетки-хозяева.

При применении приведенной в качестве примера системы один или несколько рекомбинантных экспрессионных векторов, кодирующих гетеродимерные две тяжелые цепи и легкие цепи слитой конструкции, предлагаемой в заявке, интродуцируют в клетки-хозяева путем трансфекции или

электропорации. Отобранные трансформированные клетки-хозяева культивируют для обеспечения экспрессии тяжелых и легких цепей в условиях, приемлемых для производства слитой конструкции, и слитую конструкцию выделяют из культуральной среды. Для получения рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и выделения белковой конструкции из культуральной среды применяют стандартные методы молекулярной биологии.

В заявке предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента индивидуально или в виде части слитой конструкции или мультиспецифического антитела, которые представлены в любом из вариантов осуществления изобретения в настоящем описании или в любом из пунктов формулы изобретения. Выделенная нуклеиновая кислота может являться частью вектора, предпочтительно экспрессионного вектора.

Другой объект настоящей заявки относится к клетке-хозяину, трансформированной вектором, указанным в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку, например, *E. coli*. В другом варианте осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, например, клетку протиста, клетку животного, клетку растения или клетку гриба. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, включая (но не ограничиваясь только ими) клетки CHO, COS, NS0, SP2, PER.C6, или грибную клетку, такую как *Saccharomyces cerevisiae*, или клетку насекомого, такую как Sf9.

Фармацевтическая композиция и соответствующие способы

Изобретение относится также к фармацевтическим композициям, способам получения и способам их применения.

Другой основной объект изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат, предлагаемые в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат

(такой как мультиспецифическое антитело или слитая конструкция), предлагаемые в изобретении, можно применять также для приготовления лекарственного препарата для указанных в настоящем описании терапевтических применений.

Фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой любой приемлемый эксципиент, разбавитель, наполнитель, соль, буфер, стабилизатор, солюбилизатор, масло, липид, содержащий липид пузырьек, микросферу, капсулированную с липосому субстанцию или другой материал, применение которого в фармацевтических препаратах хорошо известно в данной области.

Должно быть очевидно, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя должны зависеть от пути введения при конкретном применении.

Таким образом, один из вариантов осуществления изобретения, предлагаемых в заявке, относится к способу транспортировки терапевтического или диагностического агента через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), включая такое воздействие антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента, сшитого с терапевтическим или диагностическим агентом, на гематоэнцефалический барьер, в результате которого антитело или его антигенсвязывающий фрагмент транспортирует сшитый с ним агент через гематоэнцефалический барьер. В одном из вариантов осуществления изобретения агент представляет собой лекарственное средство против неврологического нарушения. В другом варианте осуществления изобретения агент представляет собой визуализирующий агент или агент для обнаружения неврологического нарушения. Предпочтительно антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат не влияет на транспорт аминокислот. Антитело специфически связывается с CD98 таким образом, чтобы не влиять на транспорт аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения ГЭБ представляет собой ГЭБ млекопитающего, предпочтительно примата, такого как человек, более предпочтительно человек, имеющий неврологическое нарушение. В одном из вариантов осуществления изобретения неврологическое нарушение выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (AD), инсульта, деменции, мышечной дистрофии (MD), рассеянного склероза (MS), бокового амиотрофического склероза (ALS), муковисцидоза,

синдрома Ангельмана, синдрома Лиддла, болезни Паркинсона, болезни Пика, болезни Педжета, рака и черепно-мозговой травмы.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат, предлагаемые в заявке, применяют для обнаружения неврологического нарушения до начала проявления его симптомов и/или для оценки серьезности или продолжительности заболевания или нарушения. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат позволяет осуществлять обнаружение и/или визуализацию неврологического нарушения, включая визуализацию с помощью рентгенографии, томографии или магнитно-резонансной томографии (МРТ).

В другом варианте осуществления изобретения антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат применяют для лечения неврологического нарушения (например, болезни Альцгеймера), включающего введение субъекту, который нуждается в таком лечении, в эффективном количестве антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает введение субъекту в эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента.

В другом варианте осуществления изобретения заявка относится к применению антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата, предлагаемого в заявке, для приготовления или получения лекарственного препарата. В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственный препарат предназначен для лечения неврологического заболевания или нарушения. В следующем варианте осуществления изобретения лекарственный препарат предназначен для применения в способе лечения неврологического заболевания или нарушения, включающем введение индивидууму, который имеет неврологическое заболевание или нарушение, лекарственного препарата в эффективном количестве.

Другой основной объект заявки относится к способу индукции антителозависимого фагоцитоза (ADP) без стимуляции секреции провоспалительного цитокина у субъекта, который нуждается в этом,

включающему введение субъекту комплекса, содержащего терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, сшитое/сшитый, предпочтительно ковалентно конъюгированное/конъюгированный, с антигенсвязывающим фрагментом антитела к CD98, указанным в варианте осуществления изобретения в заявке, в котором терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не обладает эффекторной функцией. Например, терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать одну или несколько аминокислотных модификаций, которые снижают или элиминируют эффекторную функцию, такую как ADCC или CDC, таких как мутации, снижающие или устраняющие связывание с рецептором Fc-гамма. Указанные мутации могут находиться в положениях L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329, например, представлять собой одну, две или три мутации L234A, L235A и P331S, где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, предложенному Кэботом. В одном из вариантов осуществления изобретения терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с tau-агрегатами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает дополнительно введение субъекту в эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента. В конкретных вариантах осуществления изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой терапевтический агент, обладающий эффективностью при лечении такого же или другого неврологического нарушения, что и антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат, применяемые для лечения. Примеры дополнительных терапевтических агентов включают (но не ограничиваясь только ими): различные описанные выше неврологические лекарственные средства, ингибиторы холинэстеразы (такие как донепезил, галантамин, ровастигмин и такрин), антагонисты NMDA-рецепторов (такие как мемантин), ингибиторы агрегации бета-амилоидных пептидов, антиоксиданты, модуляторы γ -секретазы, имитатор факторов роста нервов (NGF) или генная терапия на основе NGF, агонисты PPAR γ , ингибиторы HMS-CoA редуктазы (статины), ампакины, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты рецепторов ГАМК, ингибиторы

киназы гликогенсинтазы, иммуноглобулин для внутривенного введения, агонисты мускариновых рецепторов, модуляторы никотиновых рецепторов, активная или пассивная иммунизация бета-амилоидным пептидом, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты серотониновых рецепторов и антитела к бета-амилоидному пептиду. В

5 конкретных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент выбирают с учетом его способности смягчать одно или несколько побочных действий неврологического лекарственного средства. Дополнительный терапевтический агент можно вводить в этих же или отдельных формах и вводить вместе или отдельно от антитела к CD98 или его
10 антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата. Антитело к CD98 или антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат, предлагаемые в заявке, можно вводить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента и/или адъюванта. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат, предлагаемые в заявке, можно применять также в комбинации с
15 другими интервенционными терапиями, такими как (но не ограничиваясь только ими) лучевая терапия, поведенческая терапия или другие терапии, известные в данной области и пригодные для лечения или предупреждения неврологического нарушения.

Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат,
20 предлагаемые в заявке (и любой дополнительный терапевтический агент) можно вводить любыми приемлемыми путями, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение, и, при необходимости применять для местного лечения, вводить в область повреждения. Парентеральные инфузии включают
внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или
25 подкожное введение, в том числе, в зависимости от того, является ли введение кратковременным или хроническим. В настоящем описании предусматриваются различные схемы дозирования, включая (но не ограничиваясь только ими) однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

30 Для предупреждения или лечения заболевания приемлемая доза антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата, предлагаемых в

заявке (при применении индивидуально или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами), должна зависеть от различных факторов, таких как тип заболевания, подлежащего лечению, тип антитела или конъюгата, серьезность и течение заболевания, применяют ли

5 антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат для превентивных или терапевтических целей, предшествующая терапия, история болезни пациента и реакция на антитело, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, вес тела, состояние здоровья) и предписание лечащего врача. Лечебные дозы оптимально титруют для оптимизации безопасности и эффективности.

10 Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат можно вводить пациенту однократно или с использованием серии обработок.

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения понятие «терапевтически эффективное количество» относится к применяемому в терапии количеству, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех,

15 четырех или большего количества из следующих воздействий: (I) уменьшение или улучшение тяжести заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, ассоциированного с ним; (II) сокращение продолжительности заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, ассоциированного с ним; (III) предупреждение прогрессирования заболевания,

20 нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, ассоциированного с ним; (IV) регресс заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, ассоциированного с ним; (V) предупреждение развития или возникновения заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, ассоциированного с ним; (VI) предупреждение рецидива заболевания,

25 нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, ассоциированного с ним; (VII) уменьшение случаев госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (VIII) уменьшение продолжительности нахождения в стационаре субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению,

30 или ассоциированный с ним симптом; (IX) увеличение продолжительности существования субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние,

подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (X) ингибирование или снижение заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, ассоциированного с ним, у субъекта; и/или (XI) повышение или улучшение профилактического(их) или терапевтического(их) эффекта(ов) другой

5 терапии.

Другим объектом заявки является изделие (такое как набор), содержащее материалы, требующиеся для лечения, профилактики и/или диагностики описанных выше нарушений. Изделие содержит контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковку на контейнере или присоединенную к нему. Приемлемые контейнеры

10 включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты для внутривенного введения раствора и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией эффективна для лечения, профилактики и/или диагностики состояния, и может иметь стерильный

15 порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат, предлагаемые в заявке. На этикетке или листовке-вкладыше в упаковку

20 содержится информация о том, что композицию следует применять для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может включать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат, предлагаемые в заявке; и (б) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит

25 дополнительный цитотоксический или другой терапевтический агент. Согласно этому варианту осуществления изобретения изделие может включать также листовку-вкладыш в упаковку с информацией о том, что композиции можно применять для лечения конкретного состояния. Необязательно изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий

30 фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор

Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Варианты осуществления изобретения

5 В изобретении предложены также следующие, не ограничивающие его объем, варианты осуществления изобретения.

1. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент, предназначенное/предназначенный для доставки агента в головной мозг субъекта, который нуждается в этом, где антитело к CD98 или его антигенсвязывающий
10 фрагмент связывается с CD98, предпочтительно с тяжелой цепью человеческого CD98 (huCD98hc), с константной диссоциации KD, составляющей по меньшей мере 1нМ при нейтральном значении pH, и константой скорости диссоциации kd, составляющей по меньшей мере 10^{-4}с^{-1} при кислом значении pH, предпочтительно pH 5.

15 1а. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 1, имеющее/имеющий константу диссоциации KD, составляющую от 1нМ до 500нМ, например, 1нМ, 10нМ, 50нМ, 100нМ, 200нМ, 300нМ, 400нМ, 500нМ или любую величину, находящуюся между указанными величинами, при нейтральном значении pH.

20 1б. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 1 или 1а, имеющее/имеющий константу скорости диссоциации kd, составляющую от 10^{-4}с^{-1} до 10^{-1}с^{-1} , например, 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1}с^{-1} или любую величину, находящуюся между указанными величинами, при кислом значении pH.

25 2. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-1б, имеющее/имеющий константу скорости диссоциации kd, составляющую от 2×10^{-2} до $2 \times 10^{-4}\text{с}^{-1}$, предпочтительно $8,0 \times 10^{-3}\text{с}^{-1}$, при нейтральном значении pH.

30 2а. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 2, имеющее/имеющий константу скорости диссоциации kd, составляющую от 2×10^{-2} до $2 \times 10^{-4}\text{с}^{-1}$, например, 2×10^{-2} , 1×10^{-2} , 9×10^{-3} , $8 \times$

10^{-3} , 7×10^{-3} , 6×10^{-3} , 5×10^{-3} , 4×10^{-3} , 3×10^{-3} , 2×10^{-3} , 1×10^{-3} , 9×10^{-4} , 8×10^{-4} , 7×10^{-4} , 6×10^{-4} , 5×10^{-4} , 4×10^{-4} , 3×10^{-4} , $2 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, или любую величину между указанными величинами, при нейтральном значении pH.

3. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-2а, содержащее/содержащий:

(1) переменную область тяжелой цепи, которая содержит определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменную область легкой цепи, которая содержит определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют следующие аминокислотные последовательности:

- (I) SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 и 12 соответственно;
- (II) SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70, 71 и 72 соответственно;
- (II) SEQ ID NO: 89, 90, 91, 92, 93 и 94 соответственно;
- (IV) SEQ ID NO: 113, 114, 115, 116, 117 и 118 соответственно;
- (V) SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127 и 128 соответственно;
- (VI) SEQ ID NO: 133, 134, 135, 136, 137 и 138 соответственно;
- (VII) SEQ ID NO: 150, 151, 152, 153, 154 и 155 соответственно;
- (VIII) SEQ ID NO: 160, 161, 162, 163, 164 и 165 соответственно;
- (IX) SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно;
- (X) SEQ ID NO: 180, 181, 182, 183, 184 и 185 соответственно;
- (XI) SEQ ID NO: 194, 195, 196, 197, 198 и 199 соответственно; или
- (XII) SEQ ID NO: 204, 205, 206, 207, 208 и 209 соответственно, или

(2) единственный переменный домен на тяжелой цепи (VHH), который содержит определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие следующие аминокислотные последовательности:

- (I) SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно;
- (II) SEQ ID NO: 48, 49 и 50 соответственно; или
- (III) SEQ ID NO: 143, 144 и 145 соответственно.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 3, представляющее/представляющий VHH-фрагмент, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%

5 последовательности SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 142.

4а. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 3, в котором VHH-фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 142.

10 5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 3, представляющее/представляющий собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), ковалентно связанную с вариабельной областью легкой цепи (VL) через линкер, такой как пептидный линкер, имеющий в длину от примерно 10 до примерно 25 аминокислот.

15 5а. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 5, в котором в VH scFv связана с аминоконцом VL через линкер.

20 5б. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 5, в котором в VH scFv связана с карбоксильным концом VL через линкер.

25 5в. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 5а или 5б, в котором линкер содержит один или несколько остатков Gly и Ser, которые перемежаются с остатками Glu, Thr и Lys, предпочтительно линкер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189.

30 5г. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 5в, в котором scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 279, 280, 281, 282, 283 и 284 соответственно или SEQ ID NO: 292, 293, 294, 295, 296 и 297 соответственно.

5д. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 5в или 5г, в котором scFv содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 193 или SEQ ID NO: 203.

5е. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 5д, в котором scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 193 или SEQ ID NO: 203.

5ж. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 5д, в котором scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278, 291, 162 или 218.

5з. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который связывается с тем же эпитопом, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5ж.

5и. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который конкурирует с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5ж за связывание с CD98.

5к. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 3-5и, связывание которого с человеческим CD98 характеризуется константой диссоциации KD, составляющей от 1 до 500нМ, например, 1нМ, 10нМ, 50нМ, 100нМ, 200нМ, 300нМ, 400нМ, 500нМ, или любой величиной между указанными величинами, при pH 7,4.

5л. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5к, связывание которого с человеческим CD98 характеризуется константой реакции диссоциации kd, составляющей от 10^{-4} до 10^{-1}с^{-1} , например, 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1}с^{-1} , или любой величиной между указанными величинами, при pH 5.

6. Комплекс, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л, сшитый с терапевтическим или диагностическим агентом.

5 6а. Комплекс по варианту осуществления изобретения 6, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент сшито/сшит с терапевтическим или диагностическим агентом нековалентно.

6б. Комплекс по варианту осуществления изобретения 6, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно сшито/сшит с терапевтическим или диагностическим агентом с образованием конъюгата.

10 6в. Комплекс по варианту осуществления изобретения 6, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связано/связан с терапевтическим или диагностическим агентом через линкер.

6г. Комплекс по варианту осуществления изобретения 6в, в котором линкер представляет собой непептидный линкер, такой как полиэтиленгликоль, 15 полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированный полиол, поливиниловый спирт, полисахариды, декстран, простой поливиниловый эфир, биоразлагаемый полимер, полимеризованный липид, хитины и гиалуроновая кислота или их производные или их комбинации.

20 6д. Комплекс по варианту осуществления изобретения 6в, в котором линкер представляет собой пептидный линкер, такой как пептидная цепь, состоящая из 1-50 аминокислот, сцепленных пептидными связями, или ее производное.

25 6е. Комплекс по одному из вариантов осуществления изобретения 6-6д, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент сшито/сшит с диагностическим агентом, предназначенным для обнаружения неврологического нарушения, предпочтительно с диагностическим агентом для позитронно-эмиссионной томографии (PET), или агентом для индивидуального дозиметрического контроля (IDK).

30 6ж. Комплекс по одному из вариантов осуществления изобретения 6-6д, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент сшито/сшит с терапевтическим агентом, предпочтительно лекарственным средством против неврологического нарушения.

бз. Комплекс по варианту осуществления изобретения бж, в котором лекарственное средство против неврологического нарушения выбрано из группы, состоящей из низкомолекулярных соединений, антител, пептидов, белков, встречающихся в естественных условиях лигандов для одной или нескольких мишени(ей) в ЦНС, модифицированных версий встречающихся в естественных условиях лигандов для одной или нескольких мишени(ей) в ЦНС, аптамеров, ингибирующих нуклеиновых кислот (т.е. малых ингибирующих РНК (siРНК) и коротких РНК-шпилек (shРНК)), рибозимов и активных фрагментов любой из вышеуказанных субстанций.

би. Комплекс по варианту осуществления изобретения бж, в котором лекарственное средство против неврологического нарушения выбрано из группы, состоящей из антител, аптамеров, белков, пептидов, ингибирующих нуклеиновых кислот и малых молекул, и активных фрагментов любой из вышеуказанных субстанций, которые либо сами по себе, либо специфически распознают и/или воздействуют на (т.е. ингибируют, активируют или обнаруживают) антиген или молекулу-мишень в ЦНС, такую как (но не ограничиваясь только ими) белок-предшественник амилоида или его участки, амилоид-бета, бета-секретаза, гамма-секретаза, тау, альфа-синуклеин, паркин, гентингтин, DR6, пресенилин, ApoE, маркеры глиомы или других раков ЦНС и нейротрофины. Примеры лекарственных средств против неврологических нарушений и соответствующие нарушения, для лечения которых их можно применять, включают (но не ограничиваясь только ими): нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) при хроническом повреждении головного мозга (нейрогенез), фактор роста фибробластов 2 (FGF-2), антитело к рецептору антиэпидермального фактора роста (антитело к EGFR) при раке головного мозга, нейротрофический фактор болезни Паркинсона, полученный из глиальной клеточной линии (GDNF), нейротрофический фактор головного мозга фактор (BDNF) при боковом амиотрофическом склерозе, депрессии, нарушении накопления лизосомного фермента в головном мозге, цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) при боковом амиотрофическом склерозе, нейрегулин-1 при шизофрении, антитело против HER2 (например, трастузумаб) при метастазах в головной мозг HER2-позитивного рака.

7. Комплекс по варианту осуществления изобретения 6, представляющий собой мультиспецифическое антитело, которое содержит первый антигенсвязывающий участок, который связывается с CD98 и второй антигенсвязывающий участок, который связывается с антигеном в головном мозге (или мишенью в головном мозге), в котором первый антигенсвязывающий участок содержит антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л.

7а. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 7, в котором мишень в головном мозге выбрана из группы, состоящей из бета-секретазы 1 (BACE1), амилоида бета (Abeta), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2), Тау, аполипопротеина E4 (ApoE4), альфа-синуклеина, CD20, гентингтина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора смерти 6 (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина p75 (p75NTR) и каспазы 6.

7б. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 7а, в котором второй антигенсвязывающий участок связывается с BACE1 или Тау.

7в. Мультиспецифическое антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 7-7б, в котором первый антигенсвязывающий участок ковалентно связан с первой Fc, а второй антигенсвязывающий участок ковалентно связан со второй Fc.

7г. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 7в, в котором первая Fc отличается от второй Fc одним или несколькими аминокислотными остатками, предназначенными для облегчения образования гетеродимера между первой Fc и второй Fc.

8. Мультиспецифическое антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 7-7б, представляющее собой слитую конструкцию, которая содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л, ковалентно связанное/связанный со вторым

антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое/который связывается с антигеном в головном мозге (или мишенью в головном мозге).

8а. Слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 8, в которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л ковалентно связано/связан, предпочтительно через линкер, с аминоконцом тяжелой цепи второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

8б. Слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 8, в которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л ковалентно связано/связан, предпочтительно через линкер, с аминоконцом легкой цепи второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

8в. Слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 8, в которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л ковалентно связано/связан, предпочтительно через линкер, с карбоксильным концом легкой цепи второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

8г. Слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 8, в которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л ковалентно связано/связан, предпочтительно через линкер, с карбоксильным концом тяжелой цепи второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

9. Слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 8г, в которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л ковалентно связано/связан через линкер с карбоксильным концом только одной из двух тяжелых цепей второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

9а. Слитая конструкция по одному из вариантов осуществления изобретения 8а-9, в которой линкер представляет собой пептидный линкер, содержащий один или несколько Gly и Ser, предпочтительно линкер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 191.

9б. Слитая конструкция по одному из вариантов осуществления изобретения 8-9а, в которой второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первую Fc в его первой тяжелой цепи и вторую Fc в его второй тяжелой цепи, и первая Fc отличается от второй Fc одним или несколькими аминокислотными остатками, предназначенными для облегчения образования гетеродимера между первой Fc и второй Fc.

9в. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 7г или слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 9б, в котором/которой первая Fc содержит одну или несколько мутаций, приводящих к образованию «выступа», а вторая Fc содержит одну или несколько мутаций, приводящих к образованию «впадины», или наоборот (описание мутаций «knob-in-hole» см., например, в патенте США № 5731168, у Ridgway и др., Protein Eng., 9(7), 1996, сс. 617-621, которые в полном объеме включены в настоящее описание в качестве ссылки), предпочтительно мутация, приводящая к образованию «выступа», представляет собой T366W, а мутация, приводящая к образованию «впадины», представляет T366S, L368A или Y407V.

9г. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 7г или слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 9б, в котором/которой каждая из первой Fc и второй Fc содержит модифицированный гетеродимерный СН3-домен по сравнению с полипептидом СН3-домена дикого типа, предпочтительно модифицированный гетеродимерный СН3-домен, который содержит одну или несколько мутаций, описанных в US 10457742.

9д. Мультиспецифическое антитело или слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 9г, в котором/которой модифицированный гетеродимерный СН3-домен первой Fc содержит аминокислотные модификации в положениях T350, L351, F405 и Y407, а модифицированный гетеродимерный СН3-домен второй Fc содержит аминокислотные модификации в положениях T350, T366, K392 и T394.

9е. Мультиспецифическое антитело или слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 9д, в котором/которой аминокислотная модификация в положении T350 представляет собой T350V, T350I, T350L или T350M;

аминокислотная модификация в положении L351 представляет собой L351Y;
 аминокислотная модификация в положении F405 представляет собой F405A, F405V,
 F405T или F405S; аминокислотная модификация в положении Y407 представляет
 собой Y407V, Y407A или Y407I; аминокислотная модификация в положении T366
 5 представляет собой T366L, T366I, T366V или T366M, аминокислотная модификация
 в положении K392 представляет собой K392F, K392L или K392M и аминокислотная
 модификация в положении T394 представляет собой T394W.

9ж. Мультиспецифическое антитело или слитая конструкция по варианту
 осуществления изобретения 9д, в котором/которой модифицированный
 10 гетеродимерный СН3-домен первой Fc содержит мутации T350V, L351Y, F405A и
 Y407V, а модифицированный гетеродимерный СН3-домен второй Fc содержит
 мутации T350V, T366L, K392L и T394W, или наоборот.

10. Мультиспецифическое антитело или слитая конструкция по одному из
 вариантов осуществления изобретения 7-9ж, в котором/которой Fc-область
 15 мультиспецифического антитела или слитой конструкции дополнительно содержит
 замены, которые изменяют (повышают или уменьшают), предпочтительно
 повышают, связывание второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с
 неонатальным Fc-рецептором (FcRn).

10а. Мультиспецифическое антитело или слитая конструкция по варианту
 20 осуществления изобретения 10, в котором/которой второе антитело или его
 антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько мутаций в Fc-
 домене, которая(ые) усиливает(ют) слияние с неонатальным Fc-рецептором (FcRn).

10б. Мультиспецифическое антитело или слитая конструкция по варианту
 осуществления изобретения 10 или 10а, в котором/которой одна или несколько
 25 мутаций усиливает связывание при кислом значении pH.

10в. Мультиспецифическое антитело или слитая конструкция по варианту
 осуществления изобретения 10б, в котором/которой Fc второго антитела имеет
 мутации M252Y/S254T/T256E (YTE), где нумерация аминокислотных остатков
 соответствует EU-индексу, предложенному Кэботом.

30 11. Мультиспецифическое антитело или слитая конструкция по одному из
 вариантов осуществления изобретения 7-10в, где Fc-область мультиспецифического

антитела или слитой конструкции дополнительно содержит замены, которые изменяют (повышают или уменьшают), предпочтительно снижают или элиминируют эффекторную функцию.

11а. Мультиспецифическое антитело или слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 11, в котором/которой второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько мутаций в Fc-домене, которая(ые) снижает(ют) или элиминирует(ют) эффекторную функцию, такую как антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимая цитотоксичность (CDC).

11б. Мультиспецифическое антитело или слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 11а, в котором/которой Fc второго антитела имеет одну или несколько аминокислотную(ых) модификацию(ий) в положениях L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329, где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, предложенному Кэботом.

11в. Мультиспецифическое антитело или слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 11б, в котором/которой Fc второго антитела имеет одну, две или три мутации L234A, L235A и P331S (AAS-мутации).

12. Мультиспецифическое антитело или слитая конструкция по одному из вариантов осуществления изобретения 7-11в, в котором/которой первый антигенсвязывающий участок или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не содержат цистеин.

13. Мультиспецифическое антитело или слитая конструкция по одному из вариантов осуществления изобретения 7-12, в котором/которой второй антигенсвязывающий участок или второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с Тау, предпочтительно содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, которые имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 213-218 соответственно, предпочтительно второе антитело представляет собой моноклональное антитело, которое содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111.

14. Слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 9, содержащая:

(1) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22, 25, 32, 35, 38, 41, 44, 51, 54, 57, 60, 63, 73, 76, 79, 82, 85, 95, 98, 101, 104, 107, 119, 129, 139, 146, 156, 166, 176, 186, 200, 210 и 219;

(2) две легкие цепи, каждая из которых независимо друг от друга имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 14, 17, 20, 23, 26, 33, 36, 42, 45, 52, 55, 58, 61, 64, 74, 77, 80, 83, 86, 96, 99, 102, 105, 108, 120, 130, 140, 147, 157, 167, 177, 187, 201, 211 и 220 соответственно; и

(3) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 15, 18, 21, 24, 27, 34, 37, 43, 46, 53, 56, 59, 62, 65, 75, 78, 81, 84, 87, 97, 100, 103, 106, 109, 121, 131, 141, 148, 158, 168, 178, 188, 202, 212 и 221 соответственно.

14а. Слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 14, в которой две легкие цепи имеют идентичную аминокислотную последовательность.

14б. Слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 14, в которой две легкие цепи имеют различные аминокислотные последовательности.

14в. Слитая конструкция по варианту осуществления изобретения 14, в которой:

(1) первая тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22, 25, 32, 35, 38, 41, 44, 51, 54, 57, 60, 63, 73, 76, 79, 82, 85, 95, 98, 101, 104, 107, 119, 129, 139, 146, 156, 166, 176, 186, 200, 210 и 219;

(2) каждая из двух легких цепей имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 14, 17, 20, 23, 26, 33, 36, 42, 45, 52, 55, 58, 61, 64, 74, 77, 80, 83, 86, 96, 99, 102, 105, 108, 120, 130, 140, 147, 157, 167, 177, 187, 201, 211 и 220 соответственно; и

5 (3) вторая тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 15, 18, 21, 24, 27, 34, 37, 43, 46, 53, 56, 59, 62, 65, 75, 78, 81, 84, 87, 97, 100, 103, 106, 109, 121, 131, 141, 148, 158, 168, 178, 188, 202, 212 и 221 соответственно.

10 15. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л или слитую конструкцию по одному из вариантов осуществления изобретения 7-14в.

16. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления изобретения 15.

15 17. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по варианту осуществления изобретения 15 или вектор по варианту осуществления изобретения 16.

20 18. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л или слитой конструкции по одному из вариантов осуществления изобретения 7-14в, включающий культивирование клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитую конструкцию, в условиях, пригодных для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитой конструкции, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата или слитой конструкции из клетки или клеточной культуры.

25 19. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л, комплекс по одному из вариантов осуществления изобретения 6-30 би или мультиспецифическое антитело или слитую конструкцию по одному из

вариантов осуществления изобретения 7-14в и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Способ лечения или обнаружения неврологического нарушения у субъекта, который нуждается в этом, включающий введение субъекту в эффективном количестве антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л, комплекса по одному из вариантов осуществления изобретения 6-6и или мультиспецифического антитела или слитой конструкции по одному из вариантов осуществления изобретения 7-14в, или фармацевтической композиции по варианту осуществления изобретения 19.

21. Способ увеличения доставки терапевтического или диагностического агента в головной мозг субъекта, который нуждается в этом, включающий введение субъекту конъюгата, который содержит терапевтический или диагностический агент, сшитый с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л.

22. Способ транспортировки терапевтического или диагностического агента через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), включающий воздействие антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5л, сшитого с терапевтическим или диагностическим агентом на гематоэнцефалический барьер, таким образом, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который транспортирует сшитый с ним агент, пересекали гематоэнцефалический барьер.

23. Способ доставки терапевтического или диагностического агента через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) субъекту, который нуждается в этом, включающий введение субъекту комплекса, содержащего терапевтический или диагностический агент, сшитый, предпочтительно ковалентно конъюгированный, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5.

24. Способ индукции антителозависимого фагоцитоза (ADP) без стимуляции секреции провоспалительного цитокина у субъекта, который нуждается в этом, включающий введение субъекту комплекса, содержащего терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, сшитое/сшитый, предпочтительно

ковалентно конъюгированное/конъюгированный, с антигенсвязывающим фрагментом по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5, в котором терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько мутаций в Fc-домене, которая(ые) снижает(ют) или элиминирует(ют) эффекторную функцию, такую как антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимая цитотоксичность (CDC).

24а. Способ по варианту осуществления изобретения 24, в котором терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько аминокислотных модификаций в положениях L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329, где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, предложенному Кэботом.

24б. Способ по варианту осуществления изобретения 24а, в котором терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две или три мутации L234A, L235A и P331S.

25. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 20-24б, в котором субъект нуждается в лечении неврологического нарушения, предпочтительно неврологического нарушения, выбранного из группы, которая состоит из нейродегенеративных заболеваний (таких как болезнь с тельцами Леви, синдром постполиомиелита, синдром Шай-Дрегера, оливопонтocerebellарная атрофия, болезнь Паркинсона, множественная системная атрофия, стриатонигральная дегенерация, спиноцереbellарная атаксия, спинальная мышечная атрофия), тауопатий (таких как болезнь Альцгеймера и супрануклеарный паралич), прионных заболеваний (таких как губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота, скрепи, синдром Крейтцфельда-Якоба, куру, болезнь Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, хроническая истощающая болезнь и фатальная семейная бессонница), бульбарного паралича, заболевания двигательных нейронов и гетеродегенеративных нарушений нервной системы (таких как болезнь Канавана, болезнь Хантингтона, нейрональный цероид-липофусциноз, болезнь Александера, синдром Туретта, синдром курчавых волос Менкеса, синдром Кокейна, синдром Халервордена-Спатца, болезнь Лафоры, синдром Ретта, гепатолентикулярная дегенерация, синдром Леша-Найхана и синдром Унверрихта-Лундборга), деменций

(таких как болезнь Пика и спиноцеребеллярная атаксия) и рака (такого как метастазы в головной мозг, возникающие в результате рака в других частях организма).

26. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 20-25, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, комплекс, мультиспецифическое антитело, слитую конструкцию или фармацевтическую композицию вводят внутривенно.

27. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 20-26, в котором терапевтический агент или терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой лекарственное средство против неврологического нарушения.

28. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 20-23, в котором агент представляет собой визуализирующий агент или агент для обнаружения неврологического нарушения.

29. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 20-28, в котором антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент, комплекс или их слияние не влияет на транспорт аминокислот.

30. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 20-29, в котором введение снижает Fc-опосредованную эффекторную функцию.

31. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 21-30, в котором введение не индуцирует быстрое истощение ретикулоцитов.

32. Способ по варианту осуществления изобретения 31, в котором терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с tau-агрегатами.

33. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 20-32, в котором субъект представляет собой примата, такого как человек, более предпочтительно человек, имеющий неврологическое нарушение.

34. Способ по варианту осуществления изобретения 33, в котором неврологическое нарушение выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (AD), инсульта, деменции, мышечной дистрофии (MD), рассеянного склероза (MS), бокового амиотрофического склероза (ALS), муковисцидоза,

синдрома Ангельмана, синдрома Лиддла, болезни Паркинсона, болезни Пика, болезни Педжета, рака и черепно-мозговой травмы.

Приведенные ниже примеры дополнительно иллюстрируют сущность изобретения. Должно быть очевидно, что приведенные ниже примеры не ограничивают изобретение и объем изобретения, который определяется прилагаемой формулой изобретения.

Примеры

Пример 1

Поскольку гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) предупреждает проникновение вредных субстанций в головной мозг и является необходимым для гомеостаза головного мозга, он представляет собой серьезное препятствие для эффективной доставки лекарственных средств в головной мозг. С этой целью была разработана платформа шаттла для головного мозга на основе моноклонального антитела, проникающего через ГЭБ и обеспечивающего существенно более высокие концентрации МАТ в головном мозге, чем при их индивидуальном использовании.

Создание антител (с использованием ОМТ-крыс и Ablexis-мышей)

ОМТ-крыс (линии OmniRat® фирмы Ligand Pharmaceuticals) и мышей линии Ablexis (фирма Ablexis, LLC, Сан-Диего, шт. Калифорния) иммунизировали CD98hc человека (SEQ ID NO: 1), CD98hc обезьян циномоглус (SEQ ID NO: 2) и CD98hc игрунок (SEQ ID NO: 3). Для иммунизации ОМТ-животных применяли два протокола, короткий (28 дней) и длинный (48 дней), согласно каждому протоколу проводили иммунизацию 5 ОМТ-крыс. Мышей линии Ablexis иммунизировали согласно протоколу повторных иммунизаций в несколько областей (RIMMS) с использованием адъюванта Sigma/CFA в течение либо 20 дней, либо 51 дня. В целом, метод состоял в следующем: животных повторно иммунизировали подкожно в несколько областей вблизи региональных дренирующих лимфатических узлов. Титры в сыворотке определяли с помощью ELISA в день 31 согласно длинному протоколу и в день 14 согласно короткому протоколу с использованием покрытых ECD huCD98hc планшетов (ОМТ) или сверхэкспрессирующих huCD98hc клеток CHO-S (Ablexis). Из сероположительных крыс и мышей изымали лимфатические

узлы и осуществляли слияние для создания гибридом или скрининга в виде единичных В-клеток.

Сначала осуществляли скрининг гибридом методом ELISA в отношении связывания с покрытыми huCD98hc планшетами. Затем дающие требуемый ответ гибридомы («хиты») тестировали, осуществляя подтверждающий скрининг с использованием покрытых CD98hc человека, обезьян циномоглус (SEQ ID NO: 2), игрунок (SEQ ID NO: 3), мышей (SEQ ID NO: 4) и крыс (SEQ ID NO: 5) планшетов для ELISA. Затем осуществляли скрининговый клеточный анализ с использованием CHO-S клеток, сверхэкспрессирующих huCD98hc или cyCD98hc, pBECs (первичные эндотелиальные клетки коры головного мозга человека, эндогенно экспрессирующие CD98hc), и родительских CHO-клеток в качестве негативной клеточной линии. В результате осуществления подтверждающего ELISA отбирали 94 «хита» (62 «хита» на основе слияния 1 и 32 «хита» на основе слияния 2). При осуществлении FACS-анализа удалось идентифицировать 31 связывающий агент, из которых 20 не были идентифицированы как дающие положительный ответ при проведении ELISA.

Все клоны, которые были проанализированы и давали положительный ответ по меньшей мере в одном анализе, перегруппировывали (94 клон) и подвергали повторному анализу методом ELISA и оценке в отношении связывания клеток (FACS). Результаты первого подтверждающего скрининга были подтверждены во втором подтверждающем скрининге. Затем МАт оценивали в отношении интернализации в pBEC. После этого получали результаты секвенирования V-области тех МАт, которые были интернализованы. Результаты секвенирования использовали для конструирования «трехногих» МАт (фиг. 1).

Создание антител (ламы)

Для создания однодоменных (VHH) антител к CD98hc человека, осуществляли иммунизацию двух лам на фирме Abcore. Титры антител определяли с помощью ELISA, используя человеческий белок CD98hc (1 мкг/мл). Анализировали титры образцов, полученных в результате трех кровозвлечений из двух животных, и у обоих животных обнаружены высокие титры ранних антител.

Фаговый дисплей осуществляли на фирме Abscore согласно принятому на фирме стандартному протоколу. Создавали две библиотеки: библиотеку 1 из образцов, полученных при втором кровоизвлечении из обоих животных, и библиотеку 2 из образцов, полученных при втором и третьем кровоизвлечении.

- 5 Осуществляли секвенирование плазмидной ДНК из 12 случайным образом отобранных индивидуальных клонов, и было установлено, что >80% из них содержали VHH-вставки с правильной рамкой считывания. Осуществляли скрининг обеих фаговых дисплейных библиотек, используя CD98hc человека согласно стандартным процедурам пэннинга фирмы Abscore. Осуществляли три раунда
- 10 пэннинга с использованием CD98hc человека в концентрации 10 мкг/мл. После пэннинга осуществляли скрининг 94 индивидуальных клонов с помощью фагового ELISA в отношении специфического связывания с N-концевым доменом активированного протеазой рецептора 1 (Par1) и неспецифического связывания с БСА (бычий сывороточный альбумин). Измеряли перекрестную реактивность с
- 15 CD98hc обезьян циномоглус, мышей и крыс. 94 клон, для которых было установлено наличие связывания, отбирали для анализа последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей. Последовательности использовали для конструирования «трехногих» МАт (фиг. 1).

- Примеры антител к CD98hc или антигенсвязывающих фрагментов,
- 20 предлагаемых в изобретении, обобщены в таблице 1:

Таблица 1

Обозначение	Послед-сть	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD98hc 1	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7 GGSISSGAYY W	SEQ ID NO: 8 IYYSGST	SEQ ID NO: 9 ARAGPKWELWFDY	SEQ ID NO: 10 SSDVDNyny	SEQ ID NO: 11 DVSNRPS	SEQ ID NO: 12 SSFTSSSTWV
CD98hc 2	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29 GRAFSSNG	SEQ ID NO: 30 ISCSGTST	SEQ ID NO: 31 AADTRHCMGYTKDEGY AY			
CD98hc 3	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 48 GRTISTYG	SEQ ID NO: 49 SCSGTST	SEQ ID NO: 50 AADTRHCMGYTKHGG YDY			
CD98hc 4	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67 GFTFSSYG	SEQ ID NO: 68 ISYDGSNK	SEQ ID NO: 69 ARAPSSFYFDY	SEQ ID NO: 70 QSVLFSSNNKN Y	SEQ ID NO: 71 WAS	SEQ ID NO: 72 QQYYSTPPT
CD98hc 5	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 89 GGSISSSY	SEQ ID NO: 90 IYNSGST	SEQ ID NO: 91 ARETYYFDY	SEQ ID NO: 92 QNVGIN	SEQ ID NO: 93 SAA	SEQ ID NO: 94 QQYNSYPLT
CD98hc 6	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 113 GYTFTSYY	SEQ ID NO: 114 INPSGGTT	SEQ ID NO: 115 ARDPNDYGGPKYFPH	SEQ ID NO: 116 QSVLYRSNNK NY	SEQ ID NO: 117 WAS	SEQ ID NO: 118 HQYYSTPLT
CD98hc 7	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 123 EYTFTSYY	SEQ ID NO: 124 INPSGGST	SEQ ID NO: 125 ARAGYCTINSCFNWFDP	SEQ ID NO: 126 QSVLYASRNK NY	SEQ ID NO: 127 WAS	SEQ ID NO: 128 QYYSTPFT
CD98hc 8	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 133 GYTFTSYY	SEQ ID NO: 134 FNPSGGST	SEQ ID NO: 135 ARGGVGATGYFDY	SEQ ID NO: 136 QSVLYRSNNK NY	SEQ ID NO: 137 WAS	SEQ ID NO: 138 QQYYGTPFT
CD98hc 9	SEQ ID NO: 142	SEQ ID NO: 143 GRTFSRYG	SEQ ID NO: 144 ISCSGTST	SEQ ID NO: 145 AADTRHCMGYTKDGG YAY			
CD98hc 10	SEQ ID NO: 149	SEQ ID NO: 150 GYTFTGYG	SEQ ID NO: 151 INPNSGGS	SEQ ID NO: 152 LRGKTFDP	SEQ ID NO: 153 QGISSH	SEQ ID NO: 154 AAS	SEQ ID NO: 155 QQLNNYPLT
CD98hc 11	SEQ ID NO: 159	SEQ ID NO: 160 GYTFTSYY	SEQ ID NO: 161 NPSGGST	SEQ ID NO: 162 ARAGYCRSTTSCFNWF DP	SEQ ID NO: 163 QSVLYNSNNK NY	SEQ ID NO: 164 WAS	SEQ ID NO: 165 QQYYSTPFT

Обозначение	Послед-сть	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD98hc 12	SEQ ID NO: 169	SEQ ID NO: 170 GFTLSSSW	SEQ ID NO: 171 INSDGSST	SEQ ID NO: 172 ARWNWGWYFDL	SEQ ID NO: 173 QSLHSHGDN Y	SEQ ID NO: 174 LGS	SEQ ID NO: 175 MQTLETPYT
CD98hc 13	SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO: 180 GFTFSSYW	SEQ ID NO: 181 INSDGSII	SEQ ID NO: 182 VREGRYTGSSLDY	SEQ ID NO: 183 NSNIGAGYD	SEQ ID NO: 184 GNS	SEQ ID NO: 185 QSYDSSLTG WV
CD98hc 14	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 194 GFTFSSYG	SEQ ID NO: 195 ISYDGSNK	SEQ ID NO: 196 ARAPSAFYFDY	SEQ ID NO: 197 QSVLFSSNNKN Y	SEQ ID NO: 198 WAS	SEQ ID NO: 199 QQYYSTPPT
CD98hc 15	SEQ ID NO: 203	SEQ ID NO: 204 GFTFSSYG	SEQ ID NO: 205 ISYDGSNK	SEQ ID NO: 206 ARAPSHFYFDY	SEQ ID NO: 207 QSVLFSSNNKN Y	SEQ ID NO: 208 WAS	SEQ ID NO: 209 QQYYSTPPT

Создание «трехногой» конструкции

Антитела, созданные против CD98, подвергали скринингу в отношении конкуренции за связывание с CD98, и неконкурирующие МАт включали в формате scFv или нанотел в архитектуру «трехногого» МАт (обозначаемого также как ТТР МАт) и характеризовали. «Трехногую» конструкцию использовали для доставки представляющей интерес субстанции (например, моноклонального антитела) в головной мозг. Более конкретно, создавали «трехногую» конструкцию (фиг. 1), содержащую слияние антигенсвязывающего фрагмента антитела к CD98hc и представляющего интерес моноклонального антитела (МАт), для того, чтобы способствовать проникновению МАт через ГЭБ и обеспечивать существенно более высокие концентрации МАт в головном мозге, чем при индивидуальном использовании МАт.

Например, «трехногое» МАт состояло из терапевтического МАт и связывающегося с CD98hc scFv или нанотела, присоединенного к С-концу одной из тяжелых цепей антитела с помощью короткого гибкого линкера. «Трехногие» МАт анализировали в отношении характеристик, которые, как описано ранее, усиливают трансцитоз (обзор представлен у Goulatis и Shusta, 2017): валентности, аффинности связывания, pH-зависимого связывания и быстрой интернализации в эндотелиальных клетках головного мозга.

Вариабельные последовательности тяжелой и легкой цепей антитела к CD98hc сливали с получением единой генетической конструкции в виде одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) с использованием следующего формата:

Hc_GTEGKSSGSGSESKST(SEQ ID NO: 189)_Lc

Затем сливали scFv или VHH к CD98hc с С-концом одной из тяжелых цепей (Hc) представляющего интерес антитела с использованием либо линкера GGSGGS (SEQ ID NO: 190), либо линкера GGAGGA (SEQ ID NO: 191). В Hc антитела использовали обеспечивающие гетеродимеризацию мутации в CH3, разработанные фирмой Zymeworks, (Hc A: T350V_L351Y_F405A_Y407V; Hc B: T350V_T366L_K392L_T394W) для создания «трехногой» конструкции (фиг. 1), которую обозначили также как «трехногое» МАт. «Трехногое» МАт содержало две легкие цепи, имеющие идентичную аминокислотную последовательность, и две тяжелые цепи, имеющие различные аминокислотные последовательности.

Только одну из двух тяжелых цепей сливали с scFv или VHH антитела к CD98, предлагаемого в изобретении, и две тяжелые цепи имели также различные константные области для облегчения гетеродимеризации между двумя тяжелыми цепями. Таким образом, каждое «трехногое» МАт согласно варианту

- 5 осуществления изобретения, указанному в заявке, отличалось тем, что имело три аминокислотные последовательности: аминокислотную последовательность первой тяжелой цепи, слитую с антигенсвязывающим фрагментом антитела к CD98, аминокислотную последовательность легкой цепи и аминокислотную последовательность второй тяжелой цепи, не слитую с антигенсвязывающим
- 10 фрагментом антитела к CD98.

Экспрессия и очистка «трехногого» антитела

«Трехногие» МАт экспрессировали в CHO-Expi-клетках и очищали с помощью аффинной хроматографии на белке А и последующей гель-фильтрации или ионообменной хроматографии.

- 15 Примеры полученных «трехногих» МАт представлены в таблице 1а:

Таблица 1а

Обозначение «трехной» конструкции	Обозначение компонента МАт (против мишени)	Обозначение компонента scFv	VL SEQ ID NO	VH SEQ ID NOs
BBBB404	B21M IgG1 AAS	C98hc1	14	13/15
BBBB1058	Анти-Tau IgG1 AAS YTE	C98hc1	17	16/18
BBB1056	Анти-Tau IgG1	C98hc1	20	19/21
BBBB1097	Анти-BAM IgG1 AAS YTE	C98hc1	23	22/24
BBBB1226	B21M IgG4	C98hc1	26	25/27
BBBB448	B21M IgG1 AAS	C98hc2	33	32/34
BBBB1061	Анти-Tau IgG1 AAS YTE	C98hc2	36	35/37
BBBB1059	Анти-Tau IgG1	C98hc2	39	38/40
BBBB1100	Анти-BAM IgG1 AAS YTE	C98hc2	42	41/43
BBBB1228	B21M IgG4	C98hc2	45	44/46
BBBB449	B21M IgG1 AAS	C98hc3	52	51/53
BBBB1064	Анти-Tau IgG1 AAS YTE	C98hc3	55	54/56
BBBB1062	Анти-Tau IgG1	C98hc3	58	57/59
BBBB1103	Анти-BAM IgG1 AAS YTE	C98hc3	61	60/62
BBBB1229	B21M IgG4	C98hc3	64	63/65
BBBB578	B21M IgG1 AAS	C98hc4	74	73/75

Обозначение «трехногой» конструкции	Обозначение компонента МАт (против мишени)	Обозначение компонента scFv	VL SEQ ID NO	VH SEQ ID NOs
B BBB1067	Анти-Тau IgG1 AAS YTE	C98hc4	77	76/78
B BBB1065	Анти-Тau IgG1	C98hc4	80	79/81
B BBB1106	Анти-BAM IgG1 AAS YTE	C98hc4	83	82/84
B BBB1230	B21M IgG4	C98hc4	86	85/87
B BBB584	B21M IgG1 AAS	C98hc5	96	95/97
B BBB1070	Анти-Тau IgG1 AAS YTE	C98hc5	99	98/100
B BBB1068	Анти-Тau IgG1	C98hc5	102	101/103
B BBB1109	Анти-BAM IgG1 AAS YTE	C98hc5	105	104/106
B BBB1231	B21M IgG4	C98hc5	108	107/109
B BBB580	B21M IgG1 AAS	C98hc6	120	119/121
B BBB586	B21M IgG1 AAS	C98hc7	130	129/131
B BBB593	B21M IgG1 AAS	C98hc8	140	139/141
B BBB445	B21M IgG1 AAS	C98hc9	147	146/148
B BBB1227	B21M IgG4	C98hc9	220	219/221
B BBB589	B21M IgG1 AAS	C98hc10	157	156/158
B BBB594	B21M IgG1 AAS	C98hc11	167	166/168
B BBB602	B21M IgG1 AAS	C98hc12	177	176/178
B BBB610	B21M IgG1 AAS	C98hc13	187	186/188

Связывание с клетками и специфичность в отношении CD98hc

Эндотелиальные клетки головного мозга человека (hCMECD3, 5000 клеток) инкубировали с 10 мкг/мл очищенного «трехногого» МАт и инкубацию осуществляли в течение ночи при 4°С в присутствии взятого в 10-кратной молярной концентрации huCD98hc (SEQ ID NO: 1). На следующее утро клетки фиксировали и промывали, инкубировали с вторичным антителом (фирма Jackson Immunosciences, каталожный № 109-546-170), снова промывали и затем анализировали с помощью FACS. В качестве позитивных связывающих агентов рассматривали те, для которых сигнал связывания превышал более чем в 3 раза сигнал от контроля изотипа (таблица 2).

Таблица 2: Связывание с hCMECD3-клетками «трехногих» МАт

МАт	SEQ ID NO:	Rep 1	Rep 2	Средний сигнал
B BBB404	13, 14, 15	11944	10148	11046
B BBB448	32, 33, 34	12851	7458	10155
B BBB449	51, 52, 53	7359	5521	6440
B BBB578	73, 74, 75	23248	23583	23416

МАт	SEQ ID NO:	Rep 1	Rep 2	Средний сигнал
BVBB584	95, 96, 97	3771	3079	3425
BVBB580	119, 120, 121	13118	11030	12047
Контроль изотипа	110, 111	371	123	247

Оценка функциональной способности CD98hc

Клетки hCMECD высевали в белые непрозрачные 384-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующий день клетки промывали и импульсно обрабатывали раствором Рингера, не содержащим натрия, в течение 30 мин при 37°C. Клетки промывали еще один раз раствором Рингера, не содержащим натрия, и к клеткам добавляли антитела к CD98hc (140нМ) или ингибиторы LAT BCH (50мМ) и T3 (200мкМ). Затем добавляли L-[3,4,5-3H(N)]-лейцин (0,4 мКи) и после инкубации в течение 5 мин клетки промывали дважды охлажденным на льду раствором Рингера, не содержащим натрия, и клетки лизировали с помощью 0,2% ДСН в 0,2н. растворе NaOH. Лизаты инкубировали с раствором Microscint-PS в течение 1 ч при комнатной температуре и определяли количество сцинтилляций с помощью устройства Perkin-Elmer TopCount NXT. Критерием антагонистической активности было ингибирование ³H-лейцина относительно применяемого в качестве контроля изотипа «трехного» антитела Zymeworks [среднее значение - (3 × SD)] (фиг. 2). На основе указанного критерия ни одно из тестируемых антител не ингибировало поглощение ³H-лейцина, в то время как оба ингибитора LAT, т.е. BCH и T3, обладали выраженной способностью ингибировать поглощение ³H-лейцина. Антитело CNTO3930 (контроль изотипа hIgG1) включали в опыт в качестве дополнительного отрицательного контроля, и для него установлено отсутствие активности.

Интернализация

Человеческие эндотелиальные клетки головного мозга (hCMECD3) высевали из расчета 10000 клеток/лунку в покрытые коллагеном 384-луночные планшеты Cell Carrier Ultra (фирма Perkin Elmer) и давали прикрепиться в течение 16 ч при 37°C в увлажняющей камере. Затем клетки (50000 клеток) инкубировали со взятым в концентрации 200 мкг/мл очищенным «трехногим» МАт при 37°C в течение 1 ч. Клетки фиксировали, промывали и инкубировали с

флуоресцентно меченным вторичным антителом в течение 1 ч. Затем клетки снова промывали и инкубировали с флуоресцентно меченным красителем для актина фаллоидином и красителем для окрашивания ядер Hoechst 33342.

Клетки снова промывали и визуализировали с помощью устройства ImageXpress Micro (фирма Molecular Devices), снабженного 40-кратным объективом. Интернализацию МАт выявляли на основе совместной локализации с фаллоидином с использованием MetaXpress 6.0 (пример приведен на фиг. 3) Все МАт оказались позитивными в отношении интернализации.

Анализ аффинности и pH-зависимого связывания, перекрестной реактивности видов

Для достижения дополнительной точности при измерении аффинности аффинность «трехного» МАт к huCD98hc определяли с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и системы BioRad ProteOn XPR36.

Поверхность для захвата Fc создавали путем сшивания анти-Fc IgG МАт (фирма Jackson ImmunoResearch) с чипом GLC (фирма BioRad) с помощью химической реакции аминного сочетания (фирма BioRad). «Трехногие» МАт захватывали, применяя их в концентрации 0,3 мкг/мл в течение 30 с при скорости 60 мкл/мин, до достижения целевой плотности, соответствующей ~200 RU. Затем huCD98hc пропускали над иммобилизованными «трехногими» МАт в концентрациях 6,25 – 400нМ, 800нМ или 100 – 1600нМ (4-кратные серийные разведения) в течение 4 мин (при скорости 50 мкл/мин) для осуществления ассоциации, после чего в течение 30 мин происходила диссоциация при скорости 50 мкл/мин. Поверхность чипа регенерировали с помощью двух 18-секундных импульсов с использованием 100мМ H_3PO_4 (фирма Sigma) при скорости 100 мкл/мин. Собранные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения ProteOn Manager, V3.1.0.6 (фирма BioRad). Сначала данные корректировали с учетом фона с использованием промежуточных пятен. Затем осуществляли вычитание данных, полученных с использованием двойных стандартов, осуществляя инъекцию буфера в качестве инъекций аналита.

Кинетический анализ данных осуществляли с применением Лэнгмюровской модели связывания 1:1. Результат для каждого МАт получали в виде k_a (константа скорости ассоциации), k_d (константа скорости диссоциации) и KD (константа равновесия диссоциации) (таблицы 3 и 3а).

Таблица 3: Аффинность связывания «трехногих» МАт с huCD98hc

ID образца	SEQ ID NO:	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (нМ)
B BBB404	13, 14, 15	(4,23±1,32) E-04	(19,9±4,01) E-03	5,03±1,76
B BBB445	146, 147, 148	7,10E+05	4,48E-03	6,31
B BBB448	32, 33, 34	6,50E+05	1,49E-03	2,29
B BBB449	51, 52, 53	8,33E+05	2,79E-03	3,35
B BBB578	73, 74, 75	3,90E+05	1,54E-03	3,95
B BBB584	95, 96, 97	5,00E+04	5,65E-03	1,13
B BBB580	119, 120, 121	1,88E+05	9,65E-03	51,4
B BBB586	129, 130, 131	(3,00±0,23)E+05	(2,16±0,05)E-03	7,23
B BBB589	156, 157, 158	6,36E+05	2,63E-02	41,3
B BBB593	139, 140, 141	(1,05±0,04)E+05	(3,44±0,14)E-03	32,80
B BBB594	166, 167, 168	3,48E+05	1,39E-03	4,00
B BBB602	176, 177, 178	3,99E+04	8,71E-03	218
B BBB610	186, 187, 188	6,10E+05	8,89E-04	1,46
B BBB1201	200, 201, 202	3,57E+05	6,00E-03	16,85
B BBB1202	210, 211, 212	1,67E+05	8,82E-03	52,90

Таблица 3а. Связывание по данным SPR с МАт изотипа IgG4

Обозначение	Описание	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)
B BBB1227	B21M IgG4 ZW BBBB445	(4,40±0,17)E+05	(2,42±0,64)E-03	(5,49±1,23)E-09
B BBB1228	B21M IgG4 ZW BBBB448	(4,26±1,13)E+05	(1,77±0,71)E-03	(4,21±2,34)E-09
B BBB1229	B21M IgG4 ZW BBBB449	(4,82±1,34)E+05	(3,36±2,38)E-03	(6,88±3,14)E-09

5 Результаты выражены в виде среднего значения ± 95%CI

рН-зависимое связывание оценивали с помощью метода SPR (фирма Proteon), описанного выше, за исключением того, что биотинилированный CD98hc иммобилизовывали на стрептавидиновом чипе и в процессе

10 диссоциации значение рН буфера понижали с 7,4 до 6,5 и до 6,0. Анализировали индивидуальные сенсограммы и оценивали с точки зрения рН-зависимого связывания, если скорость диссоциации повышалась при снижении рН (пример приведен на фиг. 4).

15 Оценивали видовую перекрестную реактивность с помощью того же метода, который использовали для определения аффинности связывания, за исключением того, что применяли CD98hc обезьян циномолгус (SEQ ID NO: 2), игрунок (SEQ ID NO: 3), мышей (SEQ ID NO: 4) и крыс (SEQ ID NO: 5). Не обнаружены обладающие перекрестной реактивностью крысиные или мышинные МАт. Идентифицированы «трехногие» МАт обезьян циномолгус и игрунок,

20 обладающие перекрестной реактивностью (таблица 4).

Таблица 4: Видовая перекрестная реактивность отобранных «трехногих»

МАт

МАт	SEQ ID NO:	KD (M) обезьян циномолгус	KD (M) игрунок	KD (M) человека
BBBB404	13, 14, 15	4,54E-08	Связывание отсутствует	5,03E-09
BBBB445	146, 147, 148	6,31E-09	1,38E-08	2,28E-09
BBBB448	32, 33, 34	5,32E-09	9,45E-09	2,29E-09
BBBB449	51, 52, 53	7,56E-09	1,97E-08	3,35E-09
BBBB578	73, 74, 75	6,22E-08	Связывание отсутствует	3,95E-09
BBBB584	95, 96, 97	1,85E-07	4,70E-07	1,13E-07
BBBB586	119, 120, 121	(2,02±0,15)E-08	Не измеряли	(7,23±0,56)E-09
BBBB589	129, 130, 131	4,13E-08	Связывание отсутствует	9,17E-09
BBBB593	156, 157, 158	(3,35±0,08)E-07	Не измеряли	(3,28±0,18)E-08
BBBB594	139, 140, 141	4,00E-09	Связывание отсутствует	2,17E-09
BBBB602	166, 167, 168	2,18E-07	Слабое связывание	1,28E-07
BBBB610	176, 177, 178	1,46E-09	8,39E-08	2,18E-09

Отбор МАт для исследования на обезьянах цинолгус и оценка шаттлов

5 для головного мозга, слитых с анти-Тату МАт

Решающее значение для подтверждения способности таргетирующих CD98hc «трехногих» МАт повышать экспозицию терапевтического антитела в головном мозге человека имеет демонстрация повышенной доставки в головной мозг на приматах кроме человека. BBBB578, BBBB448 и BBBB584 отбирали для изучения ФК на обезьянах цинолгус. Анти-CD98hc scFv сливали с анти-Тату МАт, PT1B844 (SEQ ID NO: 110, 111), создавая BBBB1067/BBBB1065 (SEQ ID NO: 76, 77, 78/SEQ ID NO: 79, 80, 81), BBBB1061 (SEQ ID NO: 35, 36, 37) и BBBB1070 (SEQ ID NO: 98, 99, 100). Измеряли аффинность к huCD98hc (таблица 5), она оказалась сходной со связыванием слитых с анти-B21M МАт.

Таблица 5. Аффинность связывания с huCD98hc шаттлов для головного мозга, представляющих собой антитело к CD98hc, слитое с анти-Тau МАт

Слияние с МАт	SEQ ID NO:	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)
BVBB1065	79, 80, 81	(4,70±0,21)E+05	(1,39±0,02)E-03	(2,96±0,17)E-09
BVBB1067	76, 77, 78	(4,39±0,15)E+05	(1,38±0,03)E-03	(3,15±0,13)E-09
BVBB1070	98, 99, 100	(5,57 ±0,94)E+04	(6,48±0,82)E-03	(1,18±0,21)E-07
BVBB1061	35, 36, 37	(9,35 ±1,16)E+05	(1,35±0,09)E-03	(1,46±0,18)E-09

Как и в предыдущих исследованиях, оценивали также интернализацию, и было установлено, что слияние шаттла для головного мозга с анти-Тau МАт не влияло на его способность к интернализации эндотелиальными клетками головного мозга человека (фиг. 5).

Фармакокинетика анти-Тau МАт, слитых с шаттлом для головного мозга, в организме обезьян циномолгус

Обезьянам циномолгус вводили исследуемые продукты посредством IV инъекции (медленная болюсная инъекция) в указанной дозе. В запланированные моменты времени изымали головной мозг обезьян циномолгус и промывали холодным физиологическим раствором после перфузии верхней части тела физиологическим раствором в течение как минимум 5 мин. Выделяли определенные заранее области головного мозга, быстро замораживали в жидком азоте и помещали на хранение при -80°C до осуществления процедуры гомогенизации ткани и истощения капилляров.

BVBB1067, BVBB1061 и BVBB1070 вводили обезьянам циномолгус i.v. в дозе 10 мг/кг наряду с МАт РТ1В844 и РТ1В916 без шаттла, обеспечивающего прохождение в головной мозг. Через 4, 24 и 72 ч собирали образцы плазмы. Изымали головной мозг обезьян циномолгус и промывали холодным физиологическим раствором после перфузии верхней части тела физиологическим раствором в течение как минимум 5 мин. Выделяли определенные заранее области головного мозга, быстро замораживали в жидком

азоте и помещали на хранение при -80°C до осуществления процедуры гомогенизации ткани и истощения капилляров.

При приготовлении образцов лизатов ткани головного мозга с истощенными капиллярами получали индивидуальные взвешенные образцы

5 ткани из собранных областей головного мозга. Образцы ткани головного мозга добавляли к рассчитанному объему модифицированного буфера d3ФР (2,5 мкл буфера на 1 мг ткани), содержащего ингибитор протеазы (фирма Pierce; A32955), и переносили в пробирки с лизирующей матрицей D (MP Biomedicals™; 6913-100). Образцы ткани гомогенизировали при скорости 2,9 м/с в течение 15 с с

10 использованием гомогенизатора Bead Ruptor 24 Elite (фирма Omni International). Всю клеточную суспензию переносили в новую пробирку и смешивали с равным объемом 26%-процентного декстранового буфера (конечная концентрация декстрана 13%). Смешанный гомогенат ткани центрифугировали при $2000 \times g$ в течение 10 мин при 4°C . Осторожно отделяли верхний слой (фракция с

15 истощенными капиллярами) от оставшегося образца и переносили в новую пробирку, содержащую 10-кратный буфер для лизиса RIPA (Millipore™; 20-188). Образцы с истощенными капиллярами плюс буфер для лизиса хорошо перемешивали, центрифугировали при 14000 об/мин в течение 30 мин при 4°C и супернатант переносили в новую пробирку. Лизаты образцов головного мозга

20 либо помещали на хранение в замороженном состоянии при -70°C , либо в них измеряли концентрацию белков с помощью набора для ВСА-анализа белков (Pierce™; 23227). Конечные лизаты ткани головного мозга стандартизовали до достижения общей концентрации белка 7 мг/мл перед осуществлением иммуноанализа для определения прошедших через ГЭБ МАт.

25 Концентрацию прошедших через ГЭБ МАт в ткани головного мозга обезьян циномолгус для оценки ФК определяли с использованием технологии ECLIA MesoScale Discovery (MSD®; Гейтерсберг, шт. Мэриленд) в типичном формате сэндвич-иммунноанализа. Анализ проводили на 96-луночных покрытых стрептавидином планшетах MSD Gold™ Small Spot (каталожный №: L45SA).

30 Покрытые стрептавидином планшеты блокировали с использованием 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в 1-кратном забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР) в течение 30 мин при комнатной температуре. Стандартную кривую получали каждый раз с использованием серийных

разведений в 50% лизатах ткани головного мозга наивных обезьян циномолгус. Замороженные образцы для контроля качества (QC), полученные в лизатах ткани головного мозга наивных обезьян циномолгус в 2-кратной относительно применяемой для анализа концентрации, разводили и анализировали при каждом анализе. Мастер-смесь, содержащую реагенты для захвата (биотинилированное МАт к человеческой Fc-области, 1 мкг/мл) и детекции (меченное рутением МАт к человеческой Fc-области, 0,5 мкг/мл) объединяли с разбавленными стандартами, QC, и образцами в объемном соотношении 1:1 на планшете для анализа. Смесь инкубировали в течение 1 ч при встряхивании при комнатной температуре. Планшеты для анализа промывали и во все лунки добавляли буфер для считывания MSD T (1-кратный). Значения необработанных данных считывали с помощью визуализирующего устройства MSD SECTOR® S600. Стандартную кривую тестировали в диапазоне 1-512 нг/мл с использованием минимально необходимого разведения образца (MRD), составляющего 1:2, что обеспечивало предел чувствительности 2 нг/мл в лизатах ткани головного мозга. Выходные MSD-файлы, содержащие необработанные ECL-данные, импортировали в систему управления информацией Watson LIMS (фирма Thermo Scientific) и затем подвергали регрессионному анализу на основе подгонки с использованием 5-параметрической логистической кривой с весовой функцией 1/F2.

Определяли концентрацию четырех МАт в различных областях головного мозга (фиг. 6). Все содержащие шаттл для головного мозга МАт характеризовались большей экспозицией в головном мозге по сравнению с не содержащими шаттл для головного мозга МАт во всех областях головного мозга. Когда данные превращали в % инъектируемой дозы /кг ткани головного мозга, и усредняли для различных областей, обнаружено 16-кратное повышение концентрации в головном мозге содержащих шаттл МАт.

Из-за широко распространенной экспрессии CD98hc в тканях, «трехное» МАт, обладающее способностью связываться с FcγR, может индуцировать ADCC/ADCP в различных тканях. Во избежание этой возможности, использовали Fc с молчащей эффекторной функцией путем интродукции мутаций «AAS» в «трехное» МАт. Хотя отсутствие ADCC/ADCP является важной характеристикой безопасности терапевтического МАт, один из

возможных терапевтических механизмов действия основан на Fc-зависимом фагоцитозе Tau-агрегатов в микроглии. При ингибировании способности МАт с шаттлом для головного мозга связываться с FcγR, МАт не должно обладать способностью связываться с FcγR на клетках микроглии, усиливая фагоцитоз

5 Tau-агрегатов. Однако с использованием предлагаемого в изобретении шаттла для головного мозга осуществляется новый механизм поглощения микроглией посредством CD98hc-опосредованной, не зависящей от Fc интернализации.

Для оценки потенциальной способности «трехногого» МАт IgG1-подкласса с мутацией AAS стимулировать поглощение Tau-агрегатов клеткой микроглии

10 человеческую микроглию, полученную из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), высевали на 384-луночные планшеты Perkin Elmer Cell Carrier Ultra в разведении 7000 клеток на лунку и культивировали в обогащенной среде DMEM/F12, содержащей глутамакс+, пенициллин/стрептомицин, IL34 (100 нг/мл) и GMCSF (10 нг/мл). В день проведения анализа создавали комплекс

15 биотинилированных фосфо-tau-олигомеров [последовательность: SCBiot-(dPEG4)GTPGSRSR(pT)PSLP(pT)PPTREPLL-амид (SEQ ID NO: 192)] со стрептавидином Alexa Fluor 488 (AF488) в 15-кратном молярном избытке. Затем меченым фосфо-tau-олигомерам давали связываться с тестируемыми МАт примерно в 2-кратном молярном избытке в течение 30 мин при комнатной

20 температуре. Затем комплекс МАт:tau-олигомер добавляли к микроглии из расчета 20 мкл/лунку. Через 2, 4 и 8 ч после инкубации клетки дважды промывали забуференным фосфатом физиологическим раствором (ЗФР) и фиксировали в присутствии 4% параформальдегида в течение 15 мин при комнатной температуре. После фиксации клетки снова промывали дважды ЗФР и

25 инкубировали в течение ночи с первичным антителом к LAMP1, маркером лизосом, в концентрации 4 мкг/мл в буфере для пермеабиллизации (0,1% сапонины + 1% желатина из кожи рыб) при 4°C. После инкубации клетки промывали дважды ЗФР и окрашивали вторичным антителом, конъюгированным с Alexa Fluor 647, в концентрации 1 мкг/мл в буфере для пермеабиллизации в

30 течение 1 ч при 4°C. После инкубации клетки промывали дважды ЗФР, контрастно окрашивали красителем для ДНК Hoechst в концентрации 1 мкг/мл в ЗФР в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки промывали в последний раз ЗФР, ресуспендировали в ЗФР из расчета 20 мкл/лунку и

визуализировали с помощью конфокального микроскопа с высоким разрешением Opera Phenix. Полученные изображения анализировали с помощью программы для анализа и обработки изображений Harmony and ImageJ. Оценивали примерно по 500 клеток на изображение для выявления Tau-олигомеров, присутствующих в фаголизосомных структурах и меченных антителом к LAMP1.

Содержащее шаттл для головного мозга МАт ВВВВ1067 стимулировало более эффективное поглощение фагосомами, чем не содержащее шаттл для головного мозга МАт РТ1В844 (фиг. 7), в то время как результаты, полученные для ВВВВ1065, неожиданно оказались хуже. Полученные данные демонстрируют, что элиминация связывания с FcγR не влияла на терапевтическую эффективность анти-Tau МАт, фактически опосредуемые CD98hc интернализация и транспорт в фаголизосому, по-видимому, являются более эффективными в микроглии, чем традиционный опосредуемый FcγR фагоцитоз.

Обсуждение

Для разработки оптимальной платформы для доставки в головной мозг на основе опосредуемого рецептором транцитоза создавали МАт, специфически связывающиеся с человеческим CD98hc с аффинностями, находящимися в определенном диапазоне в зависимости от значения pH. Взаимосвязь между аффинностью связывания и эффективностью транцитоза широко освещалась в многочисленных публикациях с акцентом на константу равновесия диссоциации, KD. Хотя KD является важным показателем, при создании изобретения неожиданно было продемонстрировано, что для транцитоза решающее значение имеют кинетические характеристики связывания k_a и k_d . При создании изобретения обнаружено, что для эффективного транцитоза и фармакодинамической активности доставляемого терапевтического МАт необходимо оптимизировать как скорость ассоциации, так и скорость диссоциации. На основе полученных результатов установлено, что оптимальный транцитоз имеет место, например, при $k_a \geq 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и нейтральной величине $k_d = 8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Не вдаваясь в конкретную теорию, можно предположить, что взаимосвязь между скоростью ассоциации и скоростью диссоциации имеет решающее значение для обеспечения эффективного трансклеточного транспорта

через разнообразные внутриклеточные везикулы, ответственные за транспорт белка в поляризованных клетках.

Продemonстрировано, что введение доз «трехногих» МАт обезьянам циномолгус приводило к 16-кратному увеличению концентрации в головном мозге по сравнению с контрольным МАт. Повышение связывания с FcRn при кислых значениях рН приводило к снижению периферического клиренса и повышению концентрации в головном мозге. В нормальных физиологических условиях FcRn-опосредованный отток антител из головного мозга, по-видимому, имеет решающее значение для поддержания гомеостаза в головном мозге, позволяя избегать нежелательного воспаления и иммунных реакций в головном мозге (Schlachetzki, Zhu и др., 2002, Roopenian и Akilesh, 2007). Хотя преобладающее количество фактических данных свидетельствует о важной роли FcRn-опосредованного оттока антител, все еще продолжаются некоторые дебаты об этом механизме клиренса (Garg и Balthasar, 2009, Abuqayyas и Balthasar, 2013). При создании изобретения было установлено, что повышение аффинности связывания с FcRn оказывает положительное влияние как на периферическую концентрацию, так и на концентрацию в головном мозге, это позволяет предположить, что любой повышенный отток имеет незначительное влияние для этой системы.

Явным недостатком мутагенеза Fc является элиминация эффекторной функции терапевтического МАт. Считается, что для многих терапевтических мишеней в головном мозге, таких как бета-амилоид и Tau, ADP имеет решающее значение для эффективности. При создании изобретения продемонстрировано, это указанное эндогенное перенаправление многовалентных карго-молекул можно использовать в качестве альтернативного, неклассического, не связанного с Fc механизма ADP. Tau, интернализованные посредством неклассического и классического ADP, транспортируются в микроглию сходным образом, при этом Tau-агрегаты транспортируются через эндолизосомальную систему в лизосому для расщепления. Описанный неклассический ADP можно использовать для различных терапевтических применений, в которых для эффективности необходим ADP, но классический ADP вреден с позиций безопасности.

Полученные данные свидетельствуют о том, что неклассический ADP более эффективен, чем классический ADP. Изучение истощения макрофагов, которое

проводили *in vitro* и на пациентах (Baig, 2014), продемонстрировало, что указанный фенотип истощения может влиять на терапевтическую эффективность МАт с эффекторной функцией. Неклассический ADP обеспечивает преимущество с позиции эффективности, позволяя избегать указанный фенотип истощения за счет опосредования ADP без активации микроглии путем связывания FcγR.

Другим преимуществом неклассического ADP является то, что, поскольку в этом случае не происходит активации микроглии, ADP осуществляется без стимуляции производства провоспалительных цитокинов. Продолжаются дебаты о безопасности использования компетентных в отношении эффекторной функции МАт при лечении заболеваний головного мозга, особенно в связи с усилением нейровоспаления у пациентов, которые уже страдают от хронического нейровоспаления (обзор представлен у Heneka и др., *Lancet Neurol.* 14(4), апрель 2015 г., сс. 388-405). Кроме того, все большее внимание уделяется роли, которую играет воспаление в патогенезе нейродегенеративного заболевания, участвуя в усилении воспаления, а также обсуждаемой способности вовлекать или дополнительно активировать потенциально уже истощенную микроглию. Например, было продемонстрировано токсическое воздействие классического ADP на нейроны и выдвинута гипотеза о том, что компетентные в отношении эффекторной функции МАт могут представлять риски с позиций безопасности (Lee и др., 2016). И, наконец, надежная платформа доставки в мозг охарактеризована с точки зрения фармакокинетики, фармакодинамики и безопасности, что обеспечивает надежную доклиническую характеристику, необходимую для перехода к клиническим испытаниям.

Оптимизированные шаттлы для головного мозга сливали с PT1B844, связывающим Тау МАт. Для шаттлов для головного мозга, слитых с PT1B844, установлено увеличенная в 16 раз концентрация в головном мозге при введении *i.v.* обезьянам циномолгус. Повышение концентрации в головном мозге превышало лучшие показатели для шаттлов для головного мозга, описанные в литературе. В дополнение к очень хорошим характеристикам ФК в головном мозге, шаттлы для головного мозга созданы так, чтобы снижать Fc-опосредованную эффекторную функцию и не вызывать быстрого истощения ретикулоцитов у обезьян циномолгус, что известно из существующего уровня

техники. Важно отметить, что снижение Fc-функции не влияло на эффективность терапевтического МАт к Тау, поскольку шаттл для головного мозга оказался более эффективным в отношении опосредованного микроглией поглощения Тау, чем при индивидуальном (без шаттла для головного мозга) применении РТ1В844.

Пример 2

Отобранные антитела к CD98, представляющие собой шаттлы для головного мозга, следует сливать с прототипическим анти-BACE (β -секретаза) МАт и повторно оценивать аффинность связывания с использованием метода, такого же как описанный выше. Ожидается, что аффинность антител к CD98 в качестве шаттлов для головного мозга, должна быть такой же, как и при слиянии с МАт В21М (антитело к респираторному синцитиальному вирусу человека) и антагонистического МАт к BACE. Следует оценивать интернализацию отобранных молекул и следует ожидать, что она не изменится по сравнению с интернализацией, обнаруженной при слиянии антитела к CD98, представляющего собой шаттл для головного мозга, с МАт В21М.

Поскольку ни одно из антител к CD98, представляющих собой шаттл для головного мозга, не связывалось с мышиным или крысиным CD98, опыты на грызунах *in vivo* следует проводить на мышах с «нокином» (KI) huCD98hc, используя антагонистическое МАт к BACE. Антагонистическое МАт к BACE выбирали в качестве модели ФД-системы для ингибирования BACE1 (путем концентрирования ее пептидного продукта A β 1-40), что отражает количество МАт, транспортированного в головной мозг.

В первом исследовании *in vivo* следует оценивать взаимосвязь ФК/ФД в сетчатке huCD98hc-мышей. Мышам с «нокином» (KI) следует вводить в дозе 10 мг/кг *i.v.* антагонистическое МАт к BACE и контрольное МАт. Через 4 и 24 ч после дозирования следует изымать глаза и собрать плазму. В запланированные моменты времени мышей следует анестезировать путем ингаляции изофлураном. Изъятие глаз KI-мышей следует осуществлять после перфузии всего тела с использованием 5 мл 0,9% физиологического раствора. Выделенный образец глаза (за исключением глазного нерва) следует быстро замораживать в жидком азоте и помещать на хранение при -70°C до гомогенизации ткани или подготовки к иммуногистохимии.

Измерения ВАСЕ-активности следует осуществлять путем гомогенизации глаз мышей в пробирке, содержащей лизирующую матрицу D (8 мкл 0,4% DEA/50мМ NaCl на 1 мг головного мозга, гомогенизатор Fast Prep-24, при 6/встряхиваниях/с в течение 20 с). Затем пробирки следует центрифугировать при 4°C в течение 5 мин в центрифуге Эппендорфа при максимальной скорости. Затем гомогенат (супернатант) следует переносить в предварительно охлажденные пробирки и затем центрифугировать в течение 70 мин при 13000 об/мин при 4°C. После этого супернатанты следует переносить в пробирку, содержащую 10% 0,5М Трис/HCL, и замораживать при -80°C до анализа.

Стандарты пептида A β ₁₋₄₀ и подвергнутый оттаиванию обработанный глазной гомогенат следует предварительно включать в комплекс в соотношении 1:1 с меченным рутением (фирма Meso Scale Discovery (MSD), R91AN-1) антителом к A β . Следует добавлять 50 мкл комплекса на заблокированный планшет, содержащий захватывающее антитело к A β ₁₋₄₀. После инкубации в течение ночи при 2-8°C без встряхивания планшеты следует промывать и добавлять 2-кратный буфер для считывания (MSD, R92TC-1). Планшеты следует считывать с использованием устройства Meso Sector S 600 (фирма MSD, IC0AA).

Специалистам в данной области должно быть очевидно, что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отклонения от концепции изобретения в ее широком смысле. Таким образом, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но оно охватывает модификации, не противоречащие сущности и объему настоящего изобретения, которые определяются прилагаемой формулой изобретения.

Процитированная литература

Abuqayyas L. и J. P. Balthasar, «Investigation of the role of Fc γ and FcRn in mAb distribution to the brain», Mol Pharm 10(5), 2013, cc. 1505-1513.

Church A. K., K. R. VanDerMeid, N. A. Baig, A. M. Baran, T. E. Witzig, G. S. Nowakowski и C. S. Zent, «Anti-CD20 monoclonal antibody-dependent phagocytosis of chronic lymphocytic leukaemia cells by autologous macrophages», Clin Exp Immunol 183(1), 2016, cc. 90-101.

Cooper P. R., G. J. Ciambrone, C. M. Kliwinski, E. Maze, L. Johnson, Q. Li, Y. Feng и P. J. Hornby, «Efflux of monoclonal antibodies from rat brain by neonatal Fc receptor, FcRn», *Brain Res* 1534, 2013, cc. 13-21.

5 Dall'Acqua W. F., P. A. Kiener и H. Wu, «Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn)» *J Biol Chem* 281(33), 2006, cc. 23514-23524.

Garg A. и J. P. Balthasar, «Investigation of the influence of FcRn on the distribution of IgG to the brain» *AAPS J* 11(3), 2009, cc. 553-557.

10 Goulatis L. I. и E. V. Shusta, «Protein engineering approaches for regulating blood-brain barrier transcytosis», *Curr Opin Struct Biol* 45, 2017, cc. 109-115.

Johnsen K. B., A. Burkhart, F. Melander, P. J. Kempen, J. B. Vejlebo, P. Siupka, M. S. Nielsen, T. L. Andresen и T. Moos, «Targeting transferrin receptors at the blood-brain barrier improves the uptake of immunoliposomes and subsequent cargo transport into the brain parenchyma», *Sci Rep* 7(1), 2017, cc. 10396.

15 Robbie G. J., R. Criste, W. F. Dall'acqua, K. Jensen, N. K. Patel, G. A. Losonsky и M. P. Griffin, «A novel investigational Fc-modified humanized monoclonal antibody, motavizumab-YTE, has an extended half-life in healthy adults», *Antimicrob Agents Chemother* 57(12), 2013, cc. 6147-6153.

20 Roopenian D. C. и S. Akilesh, «FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age», *Nat Rev Immunol* 7(9), 2007, cc. 715-725.

Schlachetzki F., C. Zhu и W. M. Pardridge, «Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood-brain barrier», *J Neurochem* 81(1), 2002, cc. 203-206.

25 Vandermeeren M., M. Borgers, K. Van Kolen, C. Theunis, B. Vasconcelos, A. Bottelbergs, C. Wintmolders, G. Daneels, R. Willems, K. Dockx, L. Delbroek, A. Marreiro, L. Ver Donck, C. Sousa, R. Nanjunda, E. Lacy, T. Van De Castele, D. Van Dam, P. P. De Deyn, J. A. Kemp, T. J. Malia и M. H. Mercken, «Anti-Tau Monoclonal Antibodies Derived from Soluble and Filamentous Tau Show Diverse Functional Properties in vitro and in vivo», *J Alzheimers Dis* 65(1), 2018, cc. 265-281.

30 Yu Y. J., J. K. Atwal, Y. Zhang, R. K. Tong, K. R. Wildsmith, C. Tan, N. Bien-Ly, M. Hersom, J. A. Maloney, W. J. Meilandt, D. Bumbaca, K. Gadkar, K. Hoyte, W. Luk, Y. Lu, J. A. Ernst, K. Searce-Levie, J. A. Couch, M. S. Dennis и R. J.

Watts, «Therapeutic bispecific antibodies cross the blood-brain barrier in nonhuman primates» *Sci Transl Med* 6(261), 2014, 261ra154.

Yu Y. J., Y. Zhang, M. Kenrick, K. Hoyte, W. Luk, Y. Lu, J. Atwal, J. M. Elliott, S. Prabhu, R. J. Watts и M. S. Dennis, «Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target», *Sci Transl Med* 3(84), 2011, 84ra44.

Zent C. S. и M. R. Elliott, «Maxed out macs: physiologic cell clearance as a function of macrophage phagocytic capacity», *FEBS J* 284(7), 2017, cc. 1021-1039.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент,
предназначенное/предназначенный для доставки агента в головной мозг
5 субъекта, который нуждается в этом, где антитело к CD98 или его
антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD98, предпочтительно
человеческим CD98hc, с константной диссоциации K_D , составляющей по
меньшей мере 1нМ, предпочтительно 1-500нМ, при нейтральном значении pH, и
константой скорости диссоциации k_d , составляющей по меньшей мере 10^{-4}с^{-1} ,
10 предпочтительно от 10^{-4}с^{-1} до 10^{-1}с^{-1} при кислом значении pH, предпочтительно
pH 5.

2. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1,
имеющее/имеющий константу скорости диссоциации k_d , составляющую от $2 \times$
15 10^{-2} до $2 \times 10^{-4} \text{с}^{-1}$, предпочтительно $8,0 \times 10^{-3} \text{с}^{-1}$, при нейтральном значении pH.

3. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2,
содержащее/содержащий:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит определяющие
20 комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и
вариабельную область легкой цепи, которая содержит определяющие
комплементарность участки легкой цепи (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где
HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют следующие
аминокислотные последовательности:

25 (I) SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 и 12 соответственно;
(II) SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70, 71 и 72 соответственно;
(II) SEQ ID NO: 89, 90, 91, 92, 93 и 94 соответственно;
(IV) SEQ ID NO: 113, 114, 115, 116, 117 и 118 соответственно;
(V) SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127 и 128 соответственно;
30 (VI) SEQ ID NO: 133, 134, 135, 136, 137 и 138 соответственно;
(VII) SEQ ID NO: 150, 151, 152, 153, 154 и 155 соответственно;
(VIII) SEQ ID NO: 160, 161, 162, 163, 164 и 165 соответственно;
(IX) SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно;

(X) SEQ ID NO: 180, 181, 182, 183, 184 и 185 соответственно;

(XI) SEQ ID NO: 194, 195, 196, 197, 198 и 199 соответственно; или

(XII) SEQ ID NO: 204, 205, 206, 207, 208 и 209 соответственно, или

(2) единичный переменный домен на тяжелой цепи (VHH), который

5 содержит определяющие комплементарности участки тяжелой цепи (HCDR)
HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие следующие аминокислотные
последовательности:

(I) SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно;

(II) SEQ ID NO: 48, 49 и 50 соответственно; или

10 (III) SEQ ID NO: 143, 144 и 145 соответственно.

4. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из
п.п. 1-3, представляющее/представляющий собой VHH-фрагмент, который
содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере
15 на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%
последовательности SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 142.

5. Антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из
п.п. 1-3, представляющее/представляющий одноцепочечный переменный
20 фрагмент (scFv), который содержит переменную область тяжелой цепи,
ковалентно связанную с переменной областью легкой цепи через линкер,
предпочтительно линкер, который имеет аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 189, более предпочтительно scFv содержит аминокислотную
последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, например, по
25 меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100% аминокислотным
последовательностям SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO:
112, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 159, SEQ ID
NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 193 или SEQ ID NO: 203.

30 6. Конъюгат, содержащий антитело к CD98 или его антигенсвязывающий
фрагмент по одному из п.п. 1-5, сшитое/сшитый с терапевтическим или
диагностическим агентом, предпочтительно конъюгат представляет собой
мультиспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий

участок, который связывается с CD98 и содержит антигенсвязывающий фрагмент по одному из п.п. 1-5, и второй антигенсвязывающий участок, который связывается с мишенью в головном мозге, такой как мишень в головном мозге, выбранная из группы, состоящей из бета-секретазы 1 (BACE1), амилоида бета (Abeta), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2), Тау, аполипопротеина E4 (ApoE4), альфа-синуклеина, CD20, гентингтина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора смерти 6 (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина p75 (p75NTR) и каспазы 6.

7. Слитая конструкция, содержащая антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из п.п. 1-5, ковалентно связанное/связанный со вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое/который связывается с мишенью в головном мозге, такой как мишень в головном мозге, выбранная из группы, состоящей из бета-секретазы 1 (BACE1), амилоида бета (Abeta), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2), Тау, аполипопротеина E4 (ApoE4), альфа-синуклеина, CD20, гентингтина, прионного белка (PrP), киназы 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркина, пресенилина 1, пресенилина 2, гамма-секретазы, рецептора смерти 6 (DR6), белка-предшественника амилоида (APP), рецептора нейротрофина p75 (p75NTR) и каспазы 6.

8. Слитая конструкция по п. 7, в которой антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связано/связан с карбоксильным концом только одной из двух тяжелых цепей второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через линкер, предпочтительно линкер, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 191.

9. Слитая конструкция по п. 8, в которой каждая из двух тяжелых цепей второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит одну или несколько способствующих образованию гетеродимера мутаций, например, модифицированный гетеродимерный СНЗ-домен, или одну или несколько мутаций, приводящих к образованию «выступа» и «впадины», по сравнению с полипептидом СНЗ-домена дикого типа.

10. Слитая конструкция по п. 9, в которой способствующие образованию гетеродимера мутации, которые содержатся в модифицированном гетеродимерном СНЗ-доме первой тяжелой цепи, включают аминокислотные модификации в положениях Т350, L351, F405 и Y407, и в модифицированном гетеродимерном СНЗ-доме второй тяжелой цепи, включают аминокислотные модификации в положениях Т350, Т366, К392 и Т394, где аминокислотная модификация в положении Т350 представляет собой Т350V, Т350I, Т350L или Т350M; аминокислотная модификация в положении L351 представляет собой L351Y; аминокислотная модификация в положении F405 представляет собой F405A, F405V, F405T или F405S; аминокислотная модификация в положении Y407 представляет собой Y407V, Y407A или Y407I; аминокислотная модификация в положении Т366 представляет собой Т366L, Т366I, Т366V или Т366M, аминокислотная модификация в положении К392 представляет собой К392F, К392L или К392M и аминокислотная модификация в положении Т394 представляет собой Т394W, и где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, предложенному Кэботом.

11. Слитая конструкция по п. 10, в которой модифицированный гетеродимерный СНЗ-домен первой тяжелой цепи содержит мутации Т350V, L351Y, F405A и Y407V, а модифицированный гетеродимерный СНЗ-домен второй тяжелой цепи содержит мутации Т350V, Т366L, К392L и Т394W.

12. Слитая конструкция по одному из п.п. 7-11, в которой второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько мутаций в Fc-доме, которая(ые) усиливает(ют) связывание слитой конструкции с неонатальным Fc-рецептором (RcRn), предпочтительно одну или несколько

мутаций, которая(ые) усиливает(ют) связывание при кислом значении pH, более предпочтительно Fc имеет мутации M252Y/S254T/T256E (YTE), где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, предложенному Кэботом.

5 13. Слитая конструкция по одному из п.п. 7-12, в которой второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько мутаций в Fc-домене, которая(ые) снижает(ют) или элиминирует(ют) эффекторную функцию, предпочтительно Fc имеет одну или несколько аминокислотную(ых) модификацию(ий) в положениях L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, 10 P331 и P329, например, одну, две или три мутации L234A, L235A и P331S, где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, предложенному Кэботом.

15 14. Слитая конструкция по одному из п.п. 7-13, в которой второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с Тау и содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, которые имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 213-218 соответственно, предпочтительно второе антитело представляет собой моноклональное антитело, которое содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID 20 NO: 110, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111.

15. Слитая конструкция по одному из п.п. 7-14, содержащая:
(1) первую тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, 25 идентичную по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22, 25, 32, 35, 38, 41, 44, 51, 54, 57, 60, 63, 73, 76, 79, 82, 85, 95, 98, 101, 104, 107, 119, 129, 139, 146, 156, 166, 176, 186, 200, 210 и 219;
30 (2) две легкие, каждая из которых независимо друг от друга имеет аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14,

17, 20, 23, 26, 33, 36, 42, 45, 52, 55, 58, 61, 64, 74, 77, 80, 83, 86, 96, 99, 102, 105, 108, 120, 130, 140, 147, 157, 167, 177, 187, 201, 211 и 220 соответственно; и

(3) вторую тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, например, по
5 меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100%, аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 18, 21, 24, 27, 34, 37, 43, 46, 53, 56, 59, 62, 65, 75, 78, 81, 84, 87, 97, 100, 103, 106, 109, 121, 131, 141, 148, 158, 168, 178, 188, 202, 212 и 221 соответственно.

10 16. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из п.п. 1-5, конъюгат по п. 6 или слитую конструкцию по одному из п.п. 7-15.

15 17. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 16.

18. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 16 или вектор по п. 17.

20 19. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из п.п. 1-5, конъюгата по п. 6 или слитой конструкции по одному из п.п. 7-15, включающий культивирование клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат или слитую конструкцию, в условиях, пригодных для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата или слитой
25 конструкции, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата или слитой конструкции из клетки или клеточной культуры.

30 20. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из п.п. 1-5, конъюгат по п. 6 или слитую конструкцию по одному из п.п. 7-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

21. Способ лечения или обнаружения нарушения, предпочтительно неврологического нарушения, у субъекта, который нуждается в этом, включающий введение субъекту в эффективном количестве антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из п.п. 1-5, конъюгата по п. 6 или
5 слитой конструкции по одному из п.п. 7-15, или фармацевтической композиции по п. 20, в котором предпочтительно неврологическое нарушение выбирают из группы, которая состоит из нейродегенеративных заболеваний (таких как болезнь с тельцами Леви, синдром постполиомиелита, синдром Шай-Дрегера, оливопонтocerebellарная атрофия, болезнь Паркинсона, множественная
10 системная атрофия, стриатонигральная дегенерация, спиноцереbellарная атаксия, спинальная мышечная атрофия), тауопатий (таких как болезнь Альцгеймера и супрануклеарный паралич), прионных заболеваний (таких как губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота, скрепи, синдром Крейтцфельдта-Якоба, куру, болезнь Герстмана-Штраусслера-Шейнкера,
15 хроническая истощающая болезнь и фатальная семейная бессонница), бульбарного паралича, заболевания двигательных нейронов и гетеродегенеративных нарушений нервной системы (таких как болезнь Канавана, болезнь Хантингтона, нейрональный цероид-липофусциноз, болезнь Александера, синдром Туретта, синдром курчавых волос Менкеса, синдром
20 Кокейна, синдром Халервордена-Спатца, болезнь Лафоры, синдром Ретта, гепатолентикулярная дегенерация, синдром Леша-Найхана и синдром Унверрихта-Лундборга), деменций (таких как болезнь Пика и спиноцереbellарная атаксия) и рака (такого как метастазы в головной мозг, возникающие в результате рака в других частях организма).

25

22. Способ по п. 21, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат или фармацевтическую композицию вводят внутривенно.

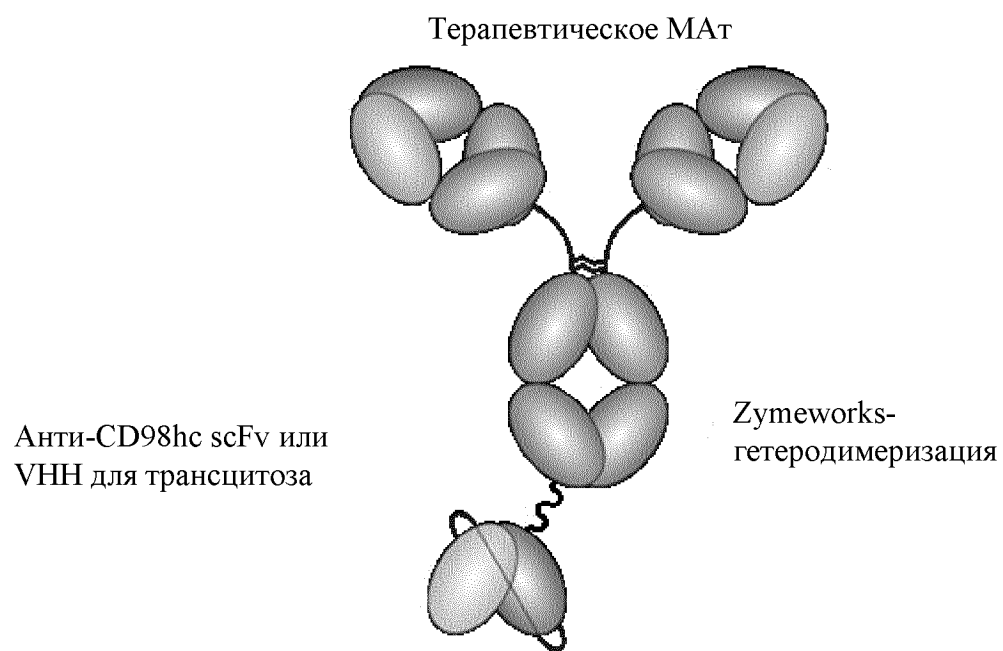
23. Способ доставки терапевтического или диагностического агента через
30 гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) субъекту, который нуждается в этом, включающий введение субъекту комплекса, содержащего терапевтический или диагностический агент, сшитый, предпочтительно ковалентно

конъюгированный, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по одному из п.п. 1-5.

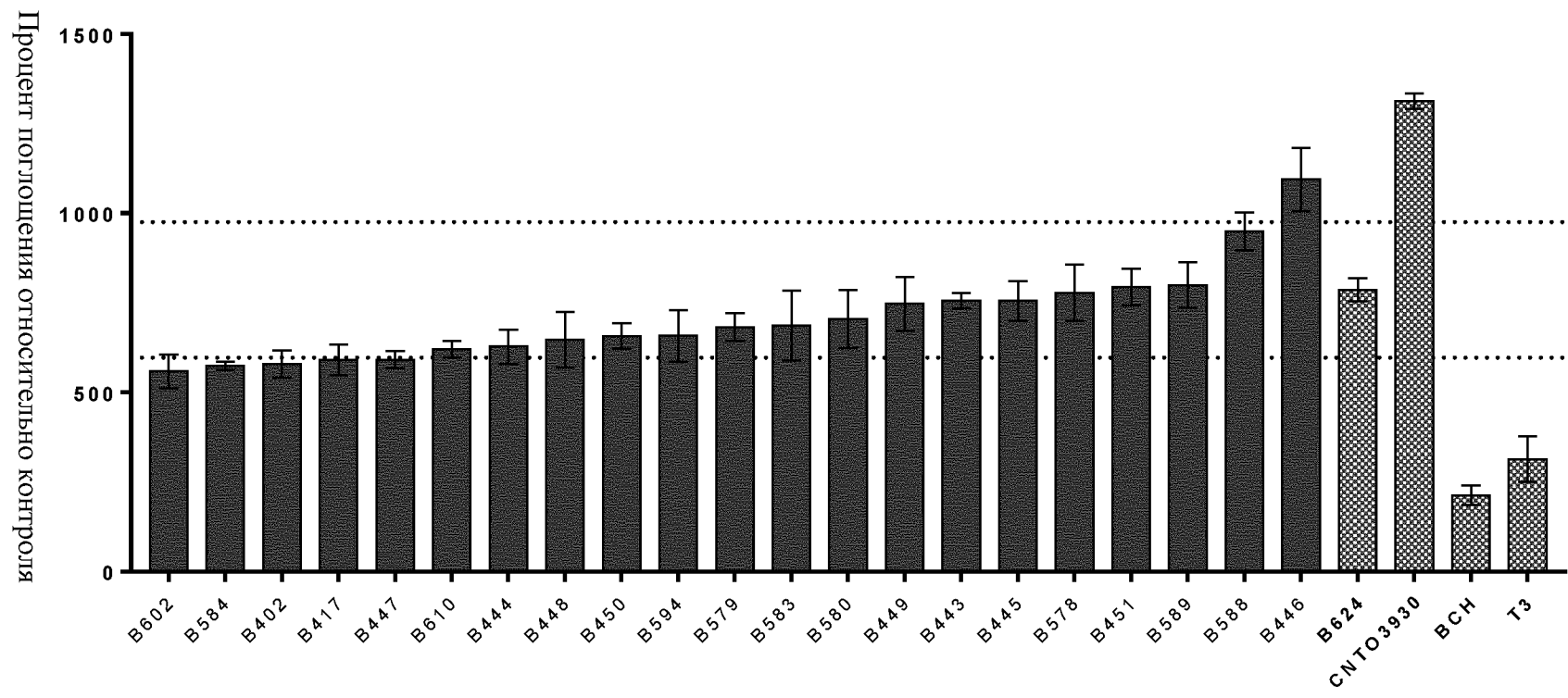
24. Способ по одному из п.п. 21-24, в котором введение снижает опосредованную Fc эффекторную функцию и/или не индуцирует быстрое истощение ретикулоцитов.

25. Способ индукции антителозависимого фагоцитоза (ADP) без стимуляции секреции провоспалительного цитокина у субъекта, который нуждается в этом, включающий введение субъекту комплекса, содержащего терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, сшитое/сшитый, предпочтительно ковалентно конъюгированное/конъюгированный, с антигенсвязывающим фрагментом по одному из п.п. 1-5, в котором терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько аминокислотную(ых) модификацию(ий) в положениях L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329, например, одну, две или три мутации L234A, L235A и P331S, где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, предложенному Кэботом.

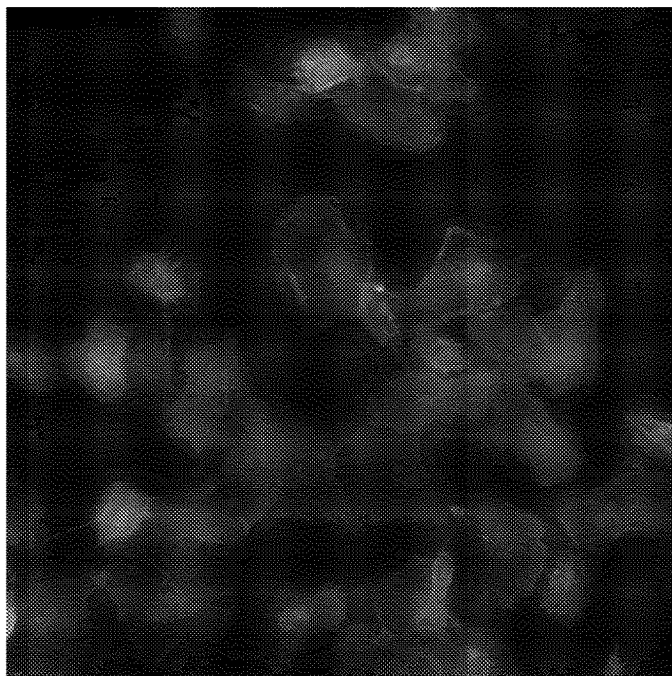
26. Способ по п. 25, в котором терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с tau-агрегатами.



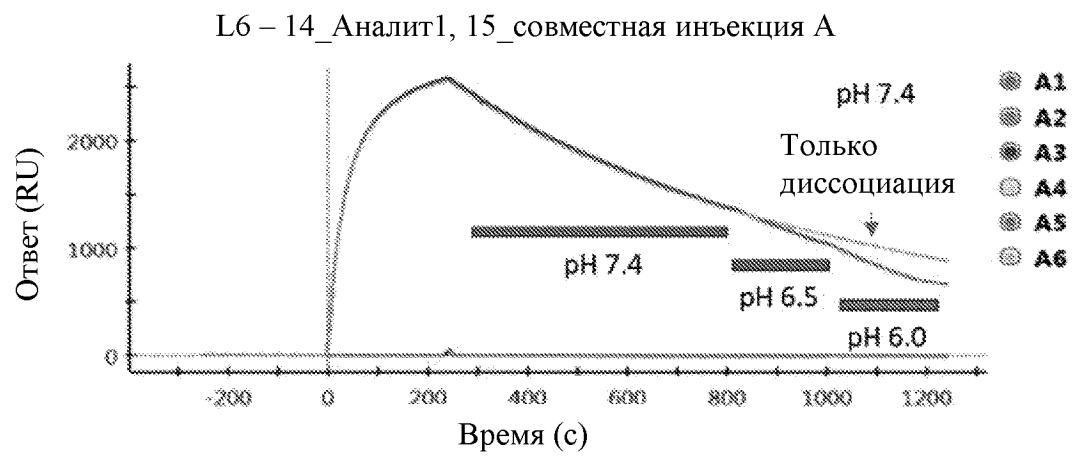
Фиг. 1



Фиг. 2

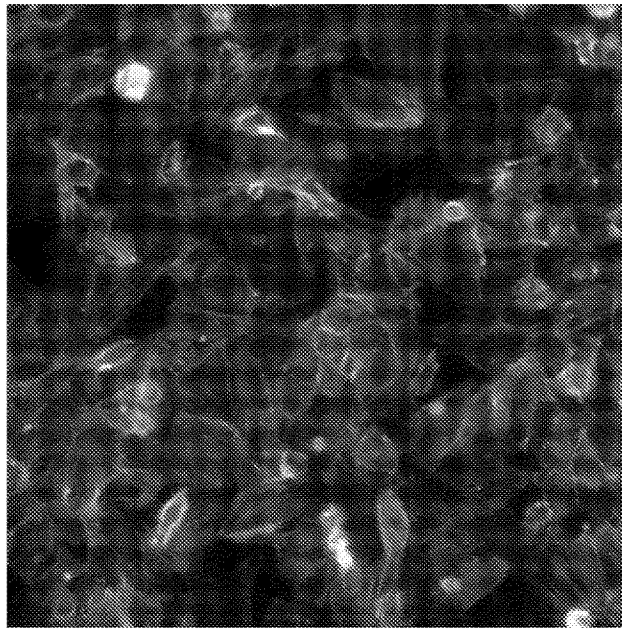


Фиг. 3

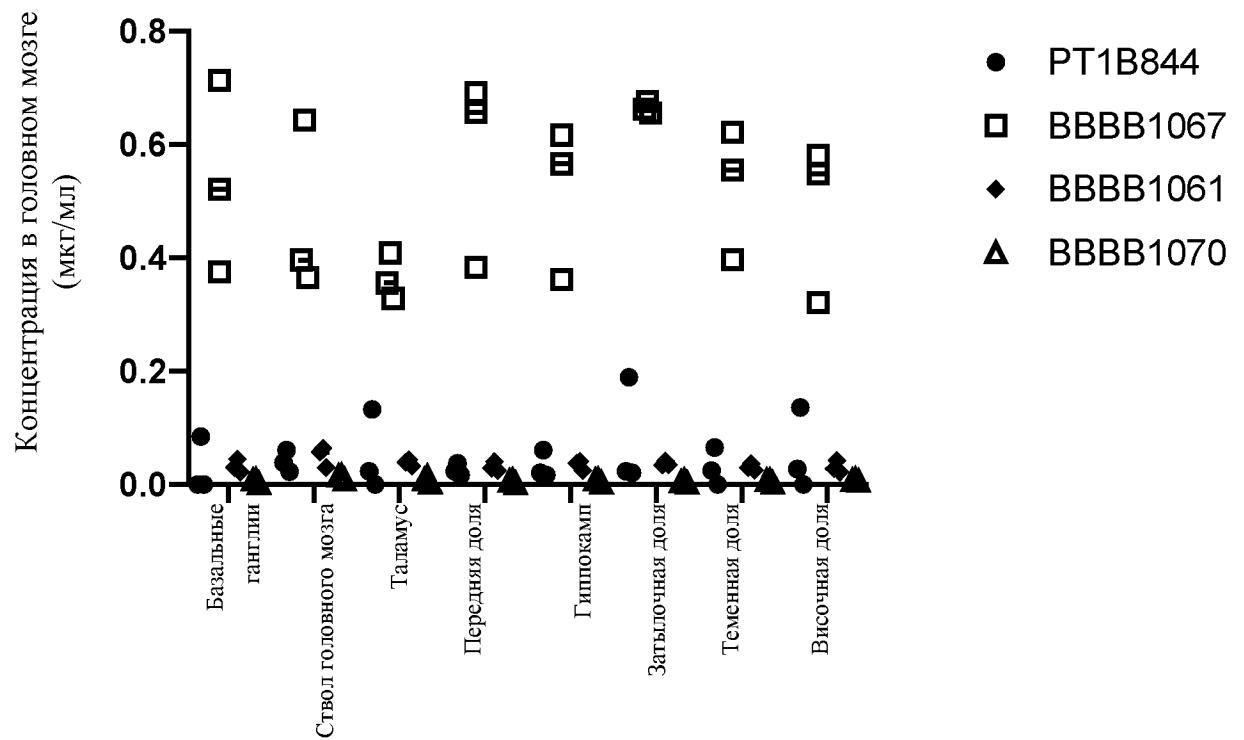


Фиг. 4

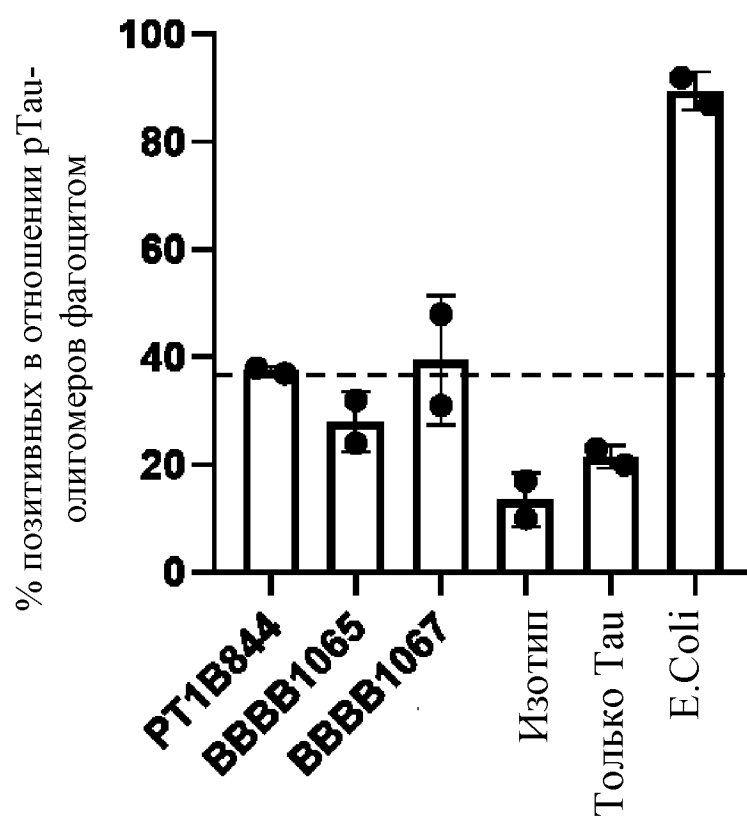
2/1 1



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7