

ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

Даний винахід стосується антитіл до рецептора трансферину з підбраною швидкістю дисоціації для людського рецептора трансферину, а також їх застосування в якості транспортного модуля через гематоенцефалічний бар'єр.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Проникнення у мозок ліків від неврологічних порушень, таких як, напр., високомолекулярні біотерапевтичні лікарські засоби або низькомолекулярні лікарські засоби зі слабким проникненням у мозок, строго обмежене розлогим і непроникним гематоенцефалічним бар'єром (ГЕБ) разом із іншим клітинним компонентом нейроваскулярної одиниці (НВО). Було перевірено багато стратегій подолання цієї перепони, і однією з них є використання шляхів трансцитозу, опосередкованих ендogenous рецепторами, що експресуються на ендотелії мозкових капілярів (рецепторами гематоенцефалічного бар'єру). З метою уможливити рецептор-опосередковану доставку біотерапевтичних препаратів до мозку було розроблено рекомбінантні білки до цих рецепторів, такі як моноклональні антитіла або пептиди. Тим не менше, недослідженими лишаються стратегії максимізації рівня споживання мозком при одночасній мінімізації неправильного сортування в клітинах ендотелію мозку (КЕМ) та ступеню накопичення у деяких органелах КЕМ (особливо в органелах, де це призводить до деградації біотерапевтичного засобу).

Моноклональні антитіла та інші біотерапевтичні засоби мають величезний потенціал для лікування патології центральної нервової системи (ЦНС). Однак їх шляху в головний мозок перешкоджає ГЕБ. Попередні дослідження показали, що із введених у кровообіг IgG лише дуже мала відсоткова частка (приблизно 0,1 %) може проникнути у простір ЦНС (Felgenhauer, *Klin. Wschr.* 52 (1974) 1158-1164). Це, безумовно, обмежує будь-який фармакологічний ефект через низьку концентрацію антитіла у ЦНС.

Раніше було виявлено, що частку антитіл, які поширюються в ЦНС, можна збільшити, використовуючи рецептори ГЕБ (тобто рецептор трансферину, рецептор інсуліну і т.п.) (див., напр., WO 95/02421).

Таким чином, існує потреба в системах доставки лікарських засобів від неврологічних порушень через ГЕБ, з метою ефективного транспортування лікарських речовин у мозок.

У WO 2014/033074 повідомлено про транспортер через гематоенцефалічний бар'єр.

У WO 2014/189973 описано антитіла до рецептора трансферину і способи їх застосування. Крім цього, повідомлено, що таргетування рецептора ГЕБ за допомогою традиційного специфічного високоафінного антитіла, як правило, призводило до обмеженого зростання транспорту через ГЕБ. Пізніше було виявлено, що серед досліджуваних антитіл до ГЕБ рівні проходження і розподілу антитіла у ЦНС обернено залежні від афінності його зв'язування з рецептором ГЕБ. Наприклад, низькоафінне антитіло до рецептора трансферину (TfR) у терапевтичних дозах сильно поліпшувало транспорт антитіла до TfR через ГЕБ і утримання в ЦНС порівняно з більш афінним антитілом до TfR, а також уможлиблювало більш легке досягнення терапевтичних концентрацій у ЦНС (Atwal та ін., *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 84ra43). Доказ такого транспорту через ГЕБ було одержано при використанні біспецифічного антитіла, яке зв'язується з TfR та ферментом, що розщеплює білок-попередник амілоїду (APP), β -секретазою (BACE1). Одна системна доза біспецифічного антитіла до TfR/BACE1, сконструйованого з використанням низькоафінного антитіла, не тільки призводила до значного споживання антитіла головним мозком, але також різко знижувала рівні A β 1-40 в мозку порівняно з самим лише моноспецифічним антитілом до BACE1, змушуючи припустити, що проникність через ГЕБ впливає на специфічну активність антитіла до BACE1 (Atwal та ін., *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 84ra43; Yu та ін., *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 84ra44).

Крім того, через постійне ускладнення аспектів конструювання антитіл та варіабельність, викликану різноманітністю клітинних систем рекомбінантного продукування для вироблення антитіл, дуже важливим є ретельне неклінічне оцінювання безпечності моноклональних антитіл (mAb), призначених для терапевтичного застосування. Більше того, складна структура, унікальні біологічні функції та більш тривалий період напівжиття mAb порівняно з традиційними низькомолекулярними лікарськими сполуками посилюють міркування безпеки, як і занепокоєння з приводу тривалішого клінічного застосування mAb у лікуванні хронічних захворювань (Lynch, C.M., та ін., *mAbs* 1 (2009) 2-11; Kim, S.J., та ін., *Mol. Cells* 20 (2005) 17-29).

Загальною метою неклінічних досліджень mAb є визначення токсикологічних властивостей досліджуваного mAb і надання інформації для розробки продукту. Основними завданнями неклінічного оцінювання є (1) ідентифікація органів-мішеней токсичності та визначення того, чи оборотна ця токсичність після лікування, (2) ідентифікація безпечної початкової дози для клінічного дослідження I фази на людях та схем подальшого підвищення дози, (3) здобуття інформації для відстеження безпекових показників у клінічних дослідженнях та (4) здобуття даних про безпеку для обґрунтування тверджень інструкції до продукту. Для досягнення цих цілей проводять доклінічні дослідження як *in vitro*, так і *in vivo*, спрямовані на визначення та розуміння фармакологічних властивостей антитіла (Lynch, C.M., та ін., *mAbs* 1 (2009) 2-11; Cavagnaro, J.A., в: Cavagnaro, J.A. (Ed.) "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals"; Hoboken, NJ: Wiley 2008; 45-65).

З метою успішного доклінічного оцінювання безпечності mAb для перевірки токсичності слід вибирати найбільш придатний вид тварин (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., та ін., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126). Придатний вид – це вид, у якого антитіло фармакологічно активне, наявний або експресується цільовий антиген, а профіль перехресної реактивності у тканинах подібний до людського (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., та ін., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126; Subramanyam, M. та Mertsching, E., у: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205; Hall, W.C., та ін., у: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Придатний вид тварин, який експресує бажаний епітоп та демонструє подібний до людських тканин профіль перехресної реактивності у тканинах, можна ідентифікувати з застосуванням імунохімічного або функціонального аналізів (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., та ін., у: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Корисні у цьому процесі дослідження перехресної реактивності між видами включають імуногістохімічне обстеження тканин різних видів з використанням доступних у продажу мультивидових тканинних мікрочіпів (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., та ін., у: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Альтернативна оцінка зв'язування антитіла з клітинами цих тварин за допомогою проточного сортування клітин (FACS) зазвичай є більш чутливою, ніж імуногістохімічний аналіз зрізів тканин (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. та Mertsching, E., у: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205). У видів слід порівнювати ДНК- та амінокислотні послідовності цільового антигена; також слід визначати міжвидову гомологічність (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. та Mertsching, E., у: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205).

Крім цього, біорозподіл, функція та структура антигену у придатного виду тварин і людини повинні піддаватися порівнянню, щоб уможливити оцінку токсичності, яка виникає внаслідок зв'язування антитіла з цільовим антигеном і називається токсичністю, обумовленою дією на мішень (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; 19,20). Більше того, значна подібність розподілу цільового антигена у тканинах виду тварин і людини збільшує імовірність того, що визначені на тваринах органи-мішені токсичності слугуватимуть передбаченням потенційної токсичності у людей. Недостатньо подібний розподіл антигена в тканинах виду тварин і людини не виключає використання цього виду тварин для досліджень токсичності повністю, але цю різницю слід враховувати при оцінюванні ризиків для людини. У відношенні густини або афінності антигенів також не вимагається абсолютної еквівалентності тваринної моделі та людини. Обґрунтування придатності виду, обраного для перевірки токсичності, слід включати у пакет документів для подання в регуляторний орган. Якщо для оцінювання безпеки використовують лише один вид, слід надати стислий підсумок експериментів, які показали відсутність додаткового придатного виду (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11).

Якщо моноклональне антитіло, призначене для терапевтичного застосування, не має перехресної реактивності по виду, то для моделі слід використовувати або сурогатне антитіло, або інший вид. Тому сурогатні антитіла є потенційним вирішенням обмежень перевірки безпечності, можливих при роботі з гуманізованими моноклональними антитілами з обмеженою перехресною реактивністю по видам. Однак на даний момент немає чітких критеріїв оцінювання потенційних сурогатних антитіл перед їх використанням у визначенні ознак небезпечності лікарської речовини (Regulatory Toxicology and Pharmacology, том 40, номер 3, грудень 2004 р., с. 219–226).

Таким чином, для визначення тваринної моделі для конкретного mAb слід взяти до уваги вищеперелічені міркування. Тим не менш необхідна наявність перехресної реактивності досліджуваного mAb з цільовим антигеном тестового виду. Інакше неможливо використати навіть найбільш придатний тестовий вид. Тому існує потреба у mAb, що не мають внутрішньовидової перехресної реактивності, але мають міжвидову перехресну реактивність зі своєю мішенню у людини і виду, призначеного для доклінічних випробувань.

У EP 2 708 560 описане антитіло, яке специфічно розпізнає рецептор трансферину. У FR 2 953 841 описані антитіла, спрямовані на рецептор трансферину, та їх застосування для імунотерапії залізо залежних пухлин. У US 2009/162359 описані бівалентні біспецифічні антитіла.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Було виявлено, що антитіла до рецептора трансферину згідно наданого тут опису можуть бути застосовані в якості транспортного модуля через гематоенцефалічний бар'єр для доставки об'єкта-ефектора мозку через гематоенцефалічний бар'єр у головний мозок. У певних варіантах виконання транспортний модуль через гематоенцефалічний бар'єр являє собою одновалентний зв'язувальний об'єкт, який специфічно зв'язується з рецептором трансферину. Антитіла до рецептора трансферину згідно даного опису при застосуванні в якості транспортного модуля через гематоенцефалічний бар'єр корисні, напр., для діагностики або лікування неврологічних порушень, таких як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона та хвороба Альцгеймера з супутньою хворобою Паркінсона.

Тут описані антитіла до рецептора трансферину, які специфічно зв'язуються з рецептором

трансферину людини (huTfR) та рецептором трансферину яванських макак (cyTfR). У певних варіантах виконання антитіло до рецептора трансферину

- зв'язується з рецептором трансферину людини (huTfR) та рецептором трансферину яванських макак (cyTfR);

- має швидкість дисоціації для рецептора трансферину людини, яка менша або дорівнює (тобто щонайбільше є рівною) швидкості дисоціації антитіла 128.1 до рецептора трансферину для рецептора трансферину яванських макак, де швидкості дисоціації визначено методом поверхневого плазмонного резонансу, і де антитіло 128.1 до рецептора трансферину має варіабельний домен важкого ланцюга за SEQ ID NO: 64 та варіабельний домен легкого ланцюга за SEQ ID NO: 65;

- зв'язується з рецептором трансферину людини зі швидкістю дисоціації від 0,1 1/с до 0,005 1/с, включно з цими значеннями.

Одним з описаних тут аспектів є антитіло до рецептора трансферину, яке специфічно зв'язується з рецептором трансферину людини та рецептором трансферину яванських макак та включає

I) гуманізований варіабельний домен важкого ланцюга, що походить від варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 01, та

II) гуманізований варіабельний домен легкого ланцюга, що походить від варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 26,

де антитіло має швидкість дисоціації для рецептора трансферину людини, яка менша або дорівнює (тобто щонайбільше є рівною) швидкості дисоціації антитіла 128.1 до рецептора трансферину для рецептора трансферину яванських макак,

де швидкості дисоціації визначено методом поверхневого плазмонного резонансу, і

де антитіло 128.1 до рецептора трансферину має варіабельний домен важкого ланцюга за SEQ ID NO: 64 та варіабельний домен легкого ланцюга за SEQ ID NO: 65.

В одному з варіантів виконання швидкість дисоціації для рецептора трансферину людини становить від 0,1 1/с до 0,005 1/с, включно з цими значеннями.

В одному з варіантів виконання антитіло має у положенні 80 варіабельного домену легкого ланцюга (нумерація за Kabat) амінокислотний залишок проліну (P).

В одному з варіантів виконання антитіло має у положенні 91 варіабельного домену легкого ланцюга (нумерація за Kabat) амінокислотний залишок аспарагіну (N).

В одному з варіантів виконання антитіло має у положенні 93 варіабельного домену легкого ланцюга (нумерація за Kabat) амінокислотний залишок аланіну (A).

В одному з варіантів виконання антитіло має у положенні 100g варіабельного домену важкого ланцюга (нумерація за Kabat) амінокислотний залишок серину (S).

В одному з варіантів виконання антитіло має у положенні 100g варіабельного домену важкого ланцюга (нумерація за Kabat) амінокислотний залишок глутаміну (Q).

В одному з варіантів виконання антитіло має у положенні 65 варіабельного домену важкого ланцюга (нумерація за Kabat) амінокислотний залишок серину (S).

В одному з варіантів виконання антитіло має у положенні 105 варіабельного домену важкого ланцюга (нумерація за Kabat) амінокислотний залишок глутаміну (Q).

В одному з варіантів виконання антитіло має у положенні 80 варіабельного домену легкого ланцюга амінокислотний залишок проліну (P), у положенні 91 варіабельного домену легкого ланцюга амінокислотний залишок аспарагіну (N), у положенні 93 варіабельного домену легкого ланцюга амінокислотний залишок аланіну (A), у положенні 100g варіабельного домену важкого ланцюга амінокислотний залишок серину (S), у положенні 65 варіабельного домену важкого ланцюга амінокислотний залишок серину (S), та у положенні 105 варіабельного домену важкого ланцюга амінокислотний залишок глутаміну (Q) (нумерація за Kabat).

В одному з варіантів виконання антитіло має у положенні 80 варіабельного домену легкого ланцюга амінокислотний залишок проліну (P), у положенні 91 варіабельного домену легкого ланцюга амінокислотний залишок аспарагіну (N), у положенні 93 варіабельного домену легкого ланцюга амінокислотний залишок аланіну (A), у положенні 100g варіабельного домену важкого ланцюга амінокислотний залишок глутаміну (Q), у положенні 65 варіабельного домену важкого ланцюга амінокислотний залишок серину (S), та у положенні 105 варіабельного домену важкого ланцюга амінокислотний залишок глутаміну (Q) (нумерація за Kabat).

Одним з описаних тут аспектів є антитіло до рецептора трансферину, яке включає (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66; (б) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68; (в) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 71, 72 або 73; (г) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75; (г') HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76; та (д) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78.

В одному варіанті виконання, якому віддають перевагу, антитіло до рецептора трансферину включає (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66; (б) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68; (в) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність

SEQ ID NO: 72; (r) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75; (r) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76; та (d) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78.

Одним з описаних тут аспектів є антитіло до рецептора трансферину, яке специфічно зв'язується з рецептором трансферину людини (huTfR) та включає

I) послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH), яка принаймні на 90 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 24, та

II) послідовність варіабельного домену легкого ланцюга (VL), яка принаймні на 90 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 37,

при цьому антитіло має приблизно таку ж саму швидкість дисоціації, як і антитіло, яке включає послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH) за SEQ ID NO: 24 та послідовність варіабельного домену легкого ланцюга (VL) за SEQ ID NO: 37.

В одному з варіантів виконання швидкість дисоціації для рецептора трансферину людини становить від 0,1 1/с до 0,005 1/с, включно з цими значеннями.

Одним з описаних тут аспектів, якому віддають перевагу, є антитіло до рецептора трансферину, яке специфічно зв'язується з рецептором трансферину людини (huTfR) та включає

I) послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH), що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24, та

II) послідовність варіабельного домену легкого ланцюга (VL), що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37.

В одному з варіантів виконання всіх аспектів антитіло являє собою мультиспецифічне антитіло, що має принаймні одну зв'язувальну специфічність до рецептора трансферину і принаймні одну зв'язувальну специфічність до терапевтичної мішені. В одному з варіантів виконання антитіло включає перший антигензв'язувальний сайт, що зв'язується з рецептором трансферину, і другий антигензв'язувальний сайт, що зв'язується з мозковим антигеном. У подальшому варіанті виконання мозковий антиген вибраний із групи, що складається з людського Abeta, рецептора епідермального фактору росту (EGFR), людського рецептора епідермального фактору росту 2 (HER2), людського альфа-синуклеїну, людського тау-білка, фосфорильованого по тирозиновому або сериновому залишку, людського CD20, білка-попередника амілоїду (APP) та людської глюкоцереброзидази. В одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, мультиспецифічне антитіло зв'язується одночасно з

- I) рецептором трансферину та Abeta, або
- II) рецептором трансферину та CD20, або
- III) рецептором трансферину та альфа-синуклеїном, або
- IV) рецептором трансферину та фосфо-тау-білком, або
- V) рецептором трансферину та HER2, або
- VI) рецептором трансферину та глюкоцереброзидазою.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 24 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 37, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 81 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 82, які утворюють сайт зв'язування для людського Abeta.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 24 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 37, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 79 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 80, які утворюють сайт зв'язування для людського CD20. В одному з варіантів виконання варіабельна ділянка важкого ланцюга включає заміну амінокислотного залишку у положенні 11 за системою Kabat на будь-яку амінокислоту, крім лейцину. В одному з варіантів виконання заміщення включає заміну амінокислотного залишку у положенні 11 за системою Kabat на неполярну амінокислоту. В одному з варіантів виконання заміщення включає заміну амінокислотного залишку у положенні 11 варіабельного домену важкого ланцюга SEQ ID NO: 79 за системою Kabat на амінокислотний залишок, вибраний із групи, що складається з валіну, лейцину, ізолейцину, серину та фенілаланіну.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 24 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 37, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 83 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 84, які утворюють сайт зв'язування для людського альфа-синуклеїну.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 24 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 37, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та принаймні

одну пару з гуманізованого варіабельного домену важкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 85, та гуманізованого варіабельного домену легкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 86, які утворюють сайт зв'язування для людського альфа-синуклеїну.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 24 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 37, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та принаймні одну пару з гуманізованого варіабельного домену важкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 87, та гуманізованого варіабельного домену легкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 88, які утворюють сайт зв'язування для людського альфа-синуклеїну.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 24 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 37, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та принаймні одну пару з гуманізованого варіабельного домену важкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 89, та гуманізованого варіабельного домену легкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 90, які утворюють сайт зв'язування для людського альфа-синуклеїну.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 24 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 37, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та принаймні одну пару з гуманізованого варіабельного домену важкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 91, та гуманізованого варіабельного домену легкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 92, які утворюють сайт зв'язування для людського альфа-синуклеїну.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 24 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 37, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та принаймні одну пару з гуманізованого варіабельного домену важкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 93, та гуманізованого варіабельного домену легкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 94, які утворюють сайт зв'язування для людського альфа-синуклеїну.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 24 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 37, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та сайт зв'язування для I) глюкоцереброзидази, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 97, або II) функціонального варіанту SEQ ID NO: 97, ідентичного за послідовністю не менш ніж на 70 %, або III) функціонального варіанту SEQ ID NO: 97, що має одну або більше амінокислотних мутацій, делецій або інсерцій, або IV) вкороченого функціонального варіанту SEQ ID NO: 97, з якого видалений принаймні один амінокислотний залишок з N-кінця або C-кінця або всередині амінокислотної послідовності, або V) комбінації III) та IV).

В одному з варіантів виконання всіх аспектів антитіло включає

I) гомодимерну Fc-ділянку підкласу IgG1 людини, необов'язково з мутаціями P329G, L234A та L235A, або

II) гомодимерну Fc-ділянку підкласу IgG4 людини, необов'язково з мутаціями P329G, S228P та L235E, або

III) гетеродимерну Fc-ділянку, в якій

а) один з поліпептидів Fc-ділянки включає мутацію T366W, а інший поліпептид Fc-ділянки включає мутації T366S, L368A та Y407V, або

б) один з поліпептидів Fc-ділянки включає мутації T366W та Y349C, а інший поліпептид Fc-ділянки включає мутації T366S, L368A, Y407V та S354C, або

в) один з поліпептидів Fc-ділянки включає мутації T366W та S354C, а інший поліпептид Fc-ділянки включає мутації T366S, L368A, Y407V та Y349C, або

IV) гетеродимерну Fc-ділянку підкласу IgG4 людини, в якій обидва поліпептиди Fc-ділянки включають мутації P329G, L234A та L235A

а) один з поліпептидів Fc-ділянки включає мутацію T366W, а інший поліпептид Fc-ділянки включає мутації T366S, L368A та Y407V, або

б) один з поліпептидів Fc-ділянки включає мутації T366W та Y349C, а інший поліпептид Fc-ділянки включає мутації T366S, L368A, Y407V та S354C, або

в) один з поліпептидів Fc-ділянки включає мутації T366W та S354C, а інший поліпептид Fc-ділянки включає мутації T366S, L368A, Y407V та Y349C, або

V) гетеродимерну Fc-ділянку підкласу IgG4 людини, в якій обидва поліпептиди Fc-ділянки включають мутації P329G, S228P та L235E і

а) один з поліпептидів Fc-ділянки включає мутацію T366W, а інший поліпептид Fc-ділянки включає мутації T366S, L368A та Y407V, або

б) один з поліпептидів Fc-ділянки включає мутації T366W та Y349C, а інший поліпептид Fc-ділянки включає мутації T366S, L368A, Y407V та S354C, або

в) один з поліпептидів Fc-ділянки включає мутації T366W та S354C, а інший поліпептид Fc-ділянки включає мутації T366S, L368A, Y407V та Y349C.

В одному з варіантів виконання всіх аспектів антитіло являє собою CrossMab.

Одним з описаних тут аспектів є антитіло до рецептора трансферину, яке включає

I) варіабельний домен важкого ланцюга, вибраний із групи, яка складається з SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57 та 58, а також варіабельний домен легкого ланцюга, вибраний із групи, яка складається з SEQ ID NO: 60, 61, 62 та 63,

або

II) варіабельний домен важкого ланцюга, вибраний із групи, яка складається з SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 та 25, а також варіабельний домен легкого ланцюга, вибраний із групи, яка складається з SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 та 47.

Одним з описаних тут аспектів є фармацевтичний склад, що включає антитіло згідно наданого тут опису і фармацевтично прийнятний носій.

Одним з описаних тут аспектів є антитіло згідно наданого тут опису для застосування як лікарського засобу.

Одним з описаних тут аспектів є застосування антитіла згідно наданого тут опису у виробництві лікарського засобу для лікування неврологічного порушення.

В одному із варіантів виконання неврологічне порушення вибране з групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, порушення захворювання очей, розладу, що супроводжується судомами, хвороби лізосомного накопичення, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, поведінкового розладу, запалення ЦНС, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, множинного склерозу, CD20-позитивного раку з метастазами в головний мозок та Her2-позитивного раку з метастазами в головний мозок.

Одним з описаних тут аспектів є застосування антитіла згідно наданого тут опису у виробництві лікарського засобу для транспортування однієї або більше сполук через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ).

ОПИС ФІГУР

Фігура 1: Схема трансцитозного тесту

Фігура 2: Швидкості дисоціації різних антитіл до рецептора трансферину, визначені при 25 °C за допомогою VIAcore; 1: 128.1; 2: 128.1, злите з антитілом до рTau mAb86; 3: 567; 4: 932; 5: 567, злите з антитілом до рTau mAb86; 6: 1026; 7: 1027; квадрати: зв'язування з рецептором трансферину яванських макак; круги: зв'язування з рецептором трансферину людини; вісь у: швидкість дисоціації [1/с].

Фігура 3: Швидкості дисоціації різних антитіл до рецептора трансферину, визначені при 37 °C за допомогою VIAcore; 1: 128.1; 2: 932; 3: 1026; 4: 1027; квадрати: зв'язування з рецептором трансферину яванських макак; круги: зв'язування з рецептором трансферину людини; вісь у: швидкість дисоціації [1/с].

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВАРІАНТІВ ВИКОНАННЯ ВИНАХОДУ

В даному документі описано гуманізований варіант кролячого антитіла 299, яке демонструє сильний трансцитоз у трансцитозному тесті згідно Прикладу 8, є перехресно реактивним щодо рецепторів трансферину людини і яванської макаки, тобто специфічно зв'язується з обома ортологами рецептора трансферину, добре фарбується у клітинах і має період напівжиття (відображений також швидкістю дисоціації), подібний до мишачого антитіла 128.1 для рецептора трансферину яванської макаки і рецептора трансферину людини.

Одним з описаних тут аспектів є гуманізоване антитіло, що специфічно зв'язується з рецептором трансферину людини, при цьому антитіло включає

у варіабельному домені важкого ланцюга - HVR за SEQ ID NO: 66, 68 та 72,
та

у варіабельному домені легкого ланцюга - HVR за SEQ ID NO: 75, 76 та 78.

В одному із варіантів виконання гуманізоване антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга за SEQ ID NO: 24 та варіабельний домен легкого ланцюга за SEQ ID NO: 37.

В одному із варіантів виконання в гуманізованого антитіла вимкнена ефекторна функція.

В одному з варіантів виконання гуманізоване антитіло специфічно зв'язується з рецептором трансферину людини та рецептором трансферину яванської макаки.

В одному з варіантів виконання гуманізоване антитіло є

а) повнорозмірним антитілом підкласу IgG1 людини, або

б) повнорозмірним антитілом підкласу IgG4 людини, або

в) повнорозмірним антитілом підкласу IgG1 людини з мутаціями L234A, L235A та P329G,

г) повнорозмірним антитілом підкласу IgG4 людини з мутаціями S228P, L235E та необов'язково

P329G,

г) повнорозмірним антитілом підкласу IgG1 людини з мутаціями L234A, L235A та P329G в обох важких ланцюгах, а також мутаціями T366W і S354C в одному з важких ланцюгів та мутаціями T366S, L368A, Y407V і Y349C у відповідному іншому важкому ланцюзі, або

д) повнорозмірним антитілом підкласу IgG4 людини з мутаціями S228P, L235E і необов'язково P329G в обох важких ланцюгах, а також мутаціями T366W і S354C в одному з важких ланцюгів та мутаціями T366S, L368A, Y407V і Y349C у відповідному іншому важкому ланцюзі.

Одним з описаних тут аспектів є біспецифічне антитіло, яке включає

I) перший сайт зв'язування, що включає варіабельний домен важкого ланцюга за SEQ ID NO: 24 та варіабельний домен легкого ланцюга за SEQ ID NO: 37,

та

II) другий сайт зв'язування, вибраний з

а) варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 81 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 82, або

б) варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 83 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 84, або

в) варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 85 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 86, або

г) варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 87 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 88, або

г') варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 91 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 92, або

д) варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 89 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 90, або

е) варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 93 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 94, або

є) варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 79 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 80.

Одним з описаних тут аспектів є фармацевтичний склад, що включає антитіло згідно наданого тут опису і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій.

Одним з описаних тут аспектів є антитіло згідно наданого тут опису для застосування як лікарського засобу.

Одним з описаних тут аспектів є антитіло згідно наданого тут опису для застосування у лікуванні неврологічного порушення.

Одним з описаних тут аспектів є застосування антитіла згідно наданого тут опису у виробництві лікарського засобу.

Одним з описаних тут аспектів є спосіб лікування, що включає введення антитіла згідно наданого тут опису для лікування неврологічного порушення.

I. ВИЗНАЧЕННЯ

"Акцепторна каркасна ділянка людини" для цілей даного опису являє собою каркасну ділянку, що включає амінокислотну послідовність каркасної ділянки варіабельного домену легкого ланцюга (VL) або каркасної ділянки варіабельного домену важкого ланцюга (VH), яка походить від каркасної ділянки імуноглобуліну людини або консенсусної каркасної ділянки людини згідно визначення нижче. Акцепторна каркасна ділянка людини, яка "походить від" каркасної ділянки імуноглобуліну людини або консенсусної каркасної ділянки людини, може включати таку саму амінокислотну послідовність, що і в останніх, або може містити зміни в амінокислотній послідовності. У деяких варіантах виконання кількість амінокислотних змін становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше або 2 або менше. У деяких варіантах послідовність VL-акцепторної каркасної ділянки людини ідентична послідовності VL-каркасної ділянки імуноглобуліну людини або послідовності консенсусної каркасної ділянки людини.

"Афінність" позначає сумарну силу нековалентних взаємодій між окремим сайтом зв'язування в молекулі (напр., антитілі) та її зв'язувальним партнером (напр., антигеном). Якщо не вказано інше, тут і далі "афінність зв'язування" позначає притаманну афінність зв'язування, яка відображає 1:1 взаємодію між членами пари зв'язування (напр., антитілом і антигеном). Афінність молекули X до її партнера Y, як правило, може бути представлена константою дисоціації (K_d). Афінність може бути виміряна загальноприйнятими відомими в галузі методами, включаючи описані тут. Конкретні ілюстративні варіанти та приклади виконання для вимірювання афінності зв'язування описані наступним.

Антитіло з "дозрілою афінністю" позначає антитіло з однією або більше змінами в одній або більше гіперваріабельних ділянках (HVR) порівняно з батьківським антитілом, яке не містить таких змін, причому ці зміни призводять до покращення афінності антитіла до антигену.

Термін "антитіло" тут застосований у найширшому сенсі і охоплює різноманітні структури антитіл,

включаючи, але не обмежуючись ними, моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (напр., біспецифічні антитіла), а також фрагменти антитіл, доки вони виявляють бажану антигензв'язувальну активність.

"Фрагмент антитіла" позначає молекулу, відмінну від інтактного антитіла, яка включає частину інтактного антитіла, що зв'язується з тим же антигеном, з яким зв'язується інтактне антитіло. Приклади фрагментів антитіла включають, але не обмежуються ними, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; діатіла; лінійні антитіла; однокланові молекули антитіл (напр., scFv); а також мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

Термін "химерне антитіло" позначає антитіло, в якому частина важкого і/або легкого ланцюгів походить від певного виду-джерела, тоді як залишок важкого і/або легкого ланцюгів походить від іншого виду-джерела.

"Клас" антитіла стосується типу константного домену або константної ділянки, до якого належить його важкий ланцюг. Існує п'ять основних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG та IgM, а деякі з них можуть далі поділяти на підкласи (ізотипи), напр., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ та IgA₂. Константні домени важких ланцюгів, що відповідають різним класам імуноглобулінів, відповідно позначають α, δ, ε, γ та μ.

"Ефекторні функції" позначають ті біологічні активності, що обумовлені Fc-ділянкою антитіла та змінюються з класом антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають: зв'язування C1q та комплемент-залежну цитотоксичність (КЗЦ); зв'язування з рецептором Fc; антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (АЗКЦ); фагоцитоз; пригнічення рецепторів поверхні клітини (напр., рецепторів В-клітин); а також активацію В-клітин.

"Ефективна кількість" засобу, напр., фармацевтичного складу, означає таку кількість, яка у необхідних дозах та впродовж необхідних періодів часу ефективна для досягнення бажаного терапевтичного або профілактичного результату.

Термін "Fc-ділянка" тут і далі вжито у значенні зони С-кінця важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить принаймні частину константної зони. Термін охоплює Fc-ділянки з природною послідовністю та варіанти Fc-ділянок. В одному з варіантів виконання Fc-ділянка важкого ланцюга IgG людини простягається від Cys226 або Pro230 до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Однак С-кінцевий лізин (Lys447) Fc-ділянки може бути присутнім або відсутнім. Якщо не вказано інше, нумерація амінокислотних залишків у Fc-ділянці або константній ділянці наведена згідно системи нумерації EU, яку також називають показником EU, як описано у Kabat, E.A. та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-те вид., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), публікація NIH 91-3242.

"Каркасні" або "FR"-ділянки - це варіабельні залишки доменів, які відрізняються від залишків гіперваріабельних ділянок (HVR). FR-ділянка варіабельного домену, як правило, складається з чотирьох FR-доменів: FR1, FR2, FR3 та FR4. Відповідно, послідовності HVR та FR у VH (або VL) зазвичай виявляються у наступній послідовності: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" та "цільне антитіло" тут і далі застосовуються взаємозамінно на позначення антитіла, структура якого суттєво подібна до природної структури антитіла, або ж яке містить важкі ланцюги з Fc-ділянкою згідно наданого тут визначення.

Терміни "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїв" та "культура клітин-хазяїв" застосовуються взаємозамінно та позначають клітини, в які було введено екзогенну нуклеїнову кислоту, включаючи потомство таких клітин. Клітини-хазяї включають "трансформанти" і "трансформовані клітини", які охоплюють первинну трансформовану клітину і потомство, яке від неї походить, незважаючи на кількість переносів. Потомство може бути не повністю ідентичним батьківській клітині за складом нуклеїнових кислот, натомість воно може містити мутації. Також сюди включено мутантні потомства, що мають ту ж саму функцію або біологічну активність, яка відслідковувалась або відбиралась у початково трансформованих клітинах.

"Консенсусна каркасна ділянка людини" – це каркасна ділянка, що представляє амінокислотні залишки, які найбільш часто зустрічаються при відборі VL- або VH-каркасних послідовностей імуноглобулінів людини. Як правило, відбір VL- або VH-каркасних послідовностей імуноглобулінів людини здійснюють з підгрупи послідовностей варіабельних доменів. Зазвичай підгрупа послідовностей - це підгрупа за Kabat, E.A. та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-те вид., Bethesda MD (1991), публікація NIH 91-3242, Т. 1-3. В одному з варіантів виконання для VL підгрупа є підгрупою каппа-I згідно Kabat та ін., supra. В одному з варіантів виконання для VH підгрупа є підгрупою III згідно Kabat та ін., supra.

"Гуманізоване" антитіло позначає химерне антитіло, що включає амінокислотні залишки з HVR, одержаних не від людини, та амінокислотні залишки з людських FR. У певних варіантах виконання гуманізоване антитіло включатиме по суті всі з принаймні одного, а як правило, двох варіабельних доменів, в яких всі чи по суті всі HVR (напр., CDR) відповідають таким у антитіла, одержаного не від людини, а всі чи по суті всі FR відповідають таким у людського антитіла. Гуманізоване антитіло може необов'язково включати принаймні частину константної ділянки антитіла, що походить від людського антитіла. "Гуманізована форма" антитіла, напр., антитіла, одержаного не від людини, позначає

антитіло, яке було піддане гуманізації.

Термін "гіперваріабельна ділянка" або "HVR" тут і далі вживається на позначення кожної з ділянок варіабельного домену антитіла, послідовність яких є гіперваріабельною ("ділянки, що визначають комплементарність", або "CDR"), та які утворюють структурно визначені петлі ("гіперваріабельні петлі") і/або містять залишки, що контактують з антигеном ("антигенні контакти"). Як правило, антитіла включають шість HVR; три у VH (H1, H2, H3) і три у VL (L1, L2, L3).

HVR тут і далі включають

(а) гіперваріабельні петлі, що зустрічаються на амінокислотних залишках 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) та 96-101 (H3) (Chothia, C. та Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917);

(б) CDR, що зустрічаються на амінокислотних залишках 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) та 95-102 (H3) (Kabat, E.A. та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-те вид. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), публікація NIH 91-3242);

(в) антигенні контакти, що зустрічаються на амінокислотних залишках 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) та 93-101 (H3) (MacCallum та ін. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); та

(г) комбінації (а), (б) і/або (в), включаючи амінокислотні залишки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) та 94-102 (H3).

Якщо не зазначено інше, HVR-залишки та інші залишки варіабельного домену (напр., FR-залишки) пронумеровані відповідно до Kabat та ін., supra.

"Індивідуум" або "суб'єкт" є ссавцем. Ссавці включають, але не обмежуються ними, домашніх тварин (напр., корів, овець, котів, собак та коней), приматів (напр., людей та приматів, що не відносяться до людей, таких як мавпи), кролів та гризунів (напр., мишей та щурів). У певних варіантах виконання індивідуум або суб'єкт є людиною.

"Ізольоване" антитіло – це антитіло, яке відокремили від компонента його природнього середовища. У деяких варіантах виконання антитіло очищене до ступеня чистоти більш ніж 95 % або 99 %, визначеного, напр., електрофорезом (напр., SDS-PAGE, ізоелектричним фокусуванням (ІЕФ), капілярним електрофорезом) або хроматографією (напр., іонообмінною або обернено-фазовою ВЕРХ). Для огляду методів оцінки чистоти антитіла див., напр., Flatman, S. та ін., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87.

"Ізольована" нуклеїнова кислота – це молекула нуклеїнової кислоти, яку відокремили від компонента її природнього середовища. Ізольована нуклеїнова кислота охоплює молекулу нуклеїнової кислоти, яка міститься у клітинах, що зазвичай містять молекулу нуклеїнової кислоти, але ця молекула нуклеїнової кислоти присутня позахромосомно або у локусі хромосоми, що відрізняється від її природнього локусу.

Термін "моноклональне антиіло" тут і далі позначає антитіло, одержане з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, з яких складається популяція, ідентичні і/або зв'язуються з одним і тим же епітопом, за виключенням можливих варіантів антитіл, напр., таких, що містять мутації, які виникли природним чином або у процесі виробництва препарату моноклональних антитіл, де подібні варіанти зазвичай присутні в незначних кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які зазвичай включають різні антитіла, спрямовані на різні детермінанти (епітопи), кожне моноклональне антитіло з препарату моноклональних антитіл спрямоване на єдину детермінанту антигену. Тому модифікатор "моноклональний" вказує на те, що антитіло було отримане з істотно гомогенної популяції антитіл, і його не слід трактувати як такий, що вимагає виготовлення антитіла будь-яким конкретним методом. Наприклад, моноклональні антитіла для застосування згідно даного винаходу можуть бути виготовлені різноманітними техніками, включаючи, але не обмежуючись ними, метод гібридом, методи рекомбінантної ДНК, метод фаг-дисплею, а також методи, що використовують трансгенних тварин, які включають всі або частину локусів людських імуноглобулінів; такі методи та інші приклади методів виготовлення моноклональних антитіл описані тут і далі.

"Природні антитіла" позначають молекули імуноглобулінів, що зустрічаються у природі, з різними структурами. Наприклад, природні антитіла IgG являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни масою близько 150 000 дальтон, що складаються з двох ідентичних легких ланцюгів та двох ідентичних важких ланцюгів, з'єднаних дисульфідними зв'язками. Від N- до C-кінця кожен важкий ланцюг має варіабельну ділянку (VH), яку також називають важким варіабельним доменом або варіабельним доменом важкого ланцюга, за якою йдуть три константні домени (CH1, CH2 та CH3). Так само від N- до C-кінця кожен легкий ланцюг має варіабельну ділянку (VL), яку також називають легким варіабельним доменом або варіабельним доменом легкого ланцюга, за якою йде легкий константний домен (CL). Легкий ланцюг антитіла на підставі амінокислотної послідовності його константного домену можна віднести до одного з двох типів, які називають каппа (κ) і лямбда (λ).

Термін "листок-вкладка" застосовують на позначення інструкцій, які зазвичай вкладають у товарну упаковку лікарських продуктів, та які містять інформацію про показання, застосування, дози, введення, комбіноване лікування, протипоказання і/або застереження, що стосуються використання таких лікарських продуктів.

"Відсоткову (%) ідентичність амінокислотної послідовності" відносно еталонної поліпептидної

послідовності визначають як відсоток амінокислотних залишків у послідовності-кандидаті, ідентичних амінокислотним залишкам еталонної поліпептидної послідовності після вирівнювання послідовностей і за необхідності введення проміжків задля одержання максимальної відсоткової ідентичності послідовностей, при цьому будь-які консервативні заміщення при визначенні ідентичності послідовностей не враховують. Вирівнювання з метою визначення відсоткової ідентичності амінокислотних послідовностей можна здійснити різними відомими в галузі шляхами, наприклад, з використанням загальнодоступного комп'ютерного програмного забезпечення, такого як програмне забезпечення BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Фахівці у галузі можуть визначити придатні параметри вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, потрібні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині послідовностей, які порівнюють. Тим не менш, для цілей даного опису значення % ідентичності амінокислотних послідовностей генерують з використанням комп'ютерної програми порівняння послідовностей ALIGN-2. Комп'ютерна програма порівняння послідовностей ALIGN-2 була створена Genentech, Inc., і вихідний код разом з користувацькою документацією було подано до Бюро авторського права США, Washington D.C., 20559, де вони зареєстровані під номером TXU510087. Програма ALIGN-2 публічно доступна від Genentech, Inc., Саус-Сан-Франциско, Каліфорнія, або може бути скопійована з вихідного коду. Програму ALIGN-2 слід компілювати для застосування на операційній системі UNIX, включно з цифровою UNIX V4.0D. Всі параметри порівняння послідовностей встановлені програмою ALIGN-2 і не змінюються.

У ситуаціях, коли ALIGN-2 використовують для порівняння амінокислотних послідовностей, % ідентичність амінокислотних послідовностей заданої амінокислотної послідовності А до заданої амінокислотної послідовності В (що можна перефразувати як те, що задана амінокислотна послідовність А має або включає певну % ідентичність амінокислотної послідовності до, із або відносно заданої амінокислотної послідовності В) обраховують наступним чином:

частка X/Y , помножена на 100

де X – кількість амінокислотних залишків, позначених як ідентичні співпадиння програмою вирівнювання послідовностей ALIGN-2 у вирівнюванні А і В, здійсненому цією програмою, та де Y – загальна кількість амінокислотних залишків у В. Слід розуміти, що коли довжина амінокислотної послідовності А не дорівнює довжині амінокислотної послідовності В, то % ідентичність амінокислотної послідовності А до В не дорівнюватиме % ідентичності амінокислотної послідовності В до А. Якщо спеціально не вказано інше, всі використані тут значення % ідентичності амінокислотних послідовностей одержані згідно опису в попередньому абзаці із застосуванням комп'ютерної програми ALIGN-2.

Термін "фармацевтичний склад" стосується препарату, що знаходиться у такій формі, яка уможливорює ефективність біологічної активності діючої речовини, що в ньому міститься, та не містить додаткових компонентів, які були б неприйнятно токсичними для суб'єкта, котрому буде вводиться склад.

"Фармацевтично прийнятний носій" позначає інгредієнт фармацевтичного складу, який не є діючою речовиною і нетоксичний для суб'єкта. Фармацевтично прийнятні носії включають, але не обмежуються ними, буфери, допоміжні речовини, стабілізатори або консерванти.

Тут і далі "лікування" (а також його граматичні варіанти, такі як "лікувати") позначає клінічне втручання зі спробою змінити природній перебіг подій для індивідуума, якого лікують, і може бути проведене як з профілактичною метою, так і під час перебігу клінічної патології. Бажані ефекти лікування включають, але не обмежуються ними, попередження виникнення або рецидиву захворювання, полегшення симптомів, зменшення будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, попередження метастазування, зниження швидкості прогресування захворювання, покращення або тимчасове полегшення стану захворювання, а також ремісію або покращений прогноз. У деяких варіантах виконання антитіла згідно винаходу застосовують для затримки розвитку захворювання або уповільнення прогресування захворювання.

Термін "варіабельна ділянка" або "варіабельний домен" позначає домен важкого або легкого ланцюга антитіла, який бере участь у зв'язуванні антитіла з антигеном. Варіабельні домени важкого і легкого ланцюгів (VH і VL, відповідно) природнього антитіла в цілому мають подібні структури, де кожен домен включає чотири консервативних каркасних ділянки (FR) та три гіперваріабельних ділянки (HVR). (Див., напр., Kindt, T.J. та ін. *Kuby Immunology*, 6-те вид., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), с. 91) Для надання антигензв'язувальної специфічності може бути достатньо одного VH- або VL-домени. Більше того, антитіла, що зв'язуються з конкретним антигеном, можна ізолювати за допомогою VH- або VL-домени антитіла, яке зв'язується з антигеном, задля скринінгу бібліотеки комплементарних VH- або VL-доменив, відповідно. Див., напр., Portolano, S. та ін., *J. Immunol.* 150 (1993) 880-887; Clackson, T. та ін., *Nature* 352 (1991) 624-628). Нумерацію амінокислотних залишків варіабельної ділянки (варіабельних ділянок легкого і важкого ланцюгів) виконують за Kabat (Kabat, E.A. та ін., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-те вид., Bethesda MD (1991), публікація NIH 91-3242, Т. 1-3).

Термін "вектор" тут і далі позначає молекулу нуклеїнової кислоти, здатну розмножувати іншу

нуклеїнову кислоту, з якою вона сполучена. Термін охоплює вектор як самореплікувальну структуру нуклеїнової кислоти, а також вектор, включений у геном клітини-хазяїна, в яку його було введено. Деякі вектори здатні спрямовувати експресію нуклеїнових кислот, з якими вони функціонально зв'язані. Такі вектори тут називають "векторами експресії".

Термін "гематоенцефалічний бар'єр" (ГЕБ) позначає фізіологічний бар'єр між периферичним кровообігом та головним і спинним мозком, утворений щільними контактами між плазматичними мембранами ендотелію мозкових капілярів, що створює щільний бар'єр, який обмежує транспорт молекул у мозок, навіть дуже малих молекул на зразок сечовини (60 дальтонів). ГЕБ у головному мозку, бар'єр між кровоносною системою та спинним мозком, а також гематоретинальний бар'єр у сітківці є суміжними капілярними бар'єрами в ЦНС і тут і далі сукупно позначаються як гематоенцефалічний бар'єр або ГЕБ. ГЕБ також включає гематолікворний бар'єр (хоріоїдне сплетіння), де бар'єр складається з клітин епендими, а не з ендотеліальних клітин капілярів.

Термін "центральна нервова система" (ЦНС) позначає комплекс нервових тканин, які контролюють роботу тіла, і включає головний та спинний мозок.

Термін "рецептор гематоенцефалічного бар'єру" (РГЕБ) позначає зовнішньоклітинний мембранозв'язаний рецепторний білок, що експресується на ендотеліальних клітинах мозку і здатен транспортувати молекули через ГЕБ або використовуватись для транспорту екзогенних введених молекул. Приклади РГЕБ включають, але не обмежуються ними, рецептор трансферину (TfR), рецептор інсуліну, рецептор інсуліноподібного фактору росту (IGF-R), рецептори ліпопротеїнів низької густини, включаючи без обмежень пов'язаний із рецептором ліпопротеїнів низької густини білок 1 (LRP1) та пов'язаний із рецептором ліпопротеїнів низької густини білок 8 (LRP8), а також гепарин-зв'язувальний фактор росту, подібний до епідермального фактору росту (HB-EGF). Прикладом РГЕБ є рецептор трансферину (TfR).

Термін "об'єкт-ефектор мозку" позначає молекулу, призначену для перенесення в мозок через ГЕБ. Об'єкт-ефектор зазвичай має характерну терапевтичну активність, яку бажано доставити до мозку. Об'єкти-ефектори включають ліки від неврологічних порушень і цитотоксичні агенти, такі як, напр., поліпептиди і антитіла, зокрема моноклональні антитіла або їх фрагменти, спрямовані на мішень у мозку.

Термін "одновалентний зв'язувальний об'єкт" позначає молекулу, яка здатна специфічно і одновалентно зв'язуватися з РГЕБ. Транспортний модуль через гематоенцефалічний бар'єр і/або кон'югат згідно наданого тут опису характеризуються наявністю єдиної одиниці одновалентного зв'язувального об'єкта, тобто транспортний модуль через гематоенцефалічний бар'єр і/або кон'югат згідно даного винаходу включають тільки одну одиницю одновалентного зв'язувального об'єкта. Одновалентний зв'язувальний об'єкт включає, але не обмежується ними, поліпептиди, повнорозмірні антитіла, фрагменти антитіл, включно з фрагментами Fab, Fab', Fv, одноланцюгові молекули антитіл, такі як, напр., одноланцюгові Fab, scFv. Одновалентний зв'язувальний об'єкт може бути, наприклад, каркасним білком, сконструйованим за допомогою відомих з рівня техніки технологій, таких як фаг-дисплей або імунізація. Одновалентний зв'язувальний об'єкт може також бути поліпептидом. У деяких варіантах виконання одновалентний зв'язувальний об'єкт включає CH2-CH3 Ig-домен та одноланцюговий Fab (scFab), спрямований на рецептор гематоенцефалічного бар'єру. scFab приєднаний до C-кінця CH2-CH3 Ig-домену за допомогою лінкера. У певних варіантах виконання scFab спрямований на рецептор трансферину.

Термін "одновалентне зв'язування" позначає специфічне зв'язування з РГЕБ, де взаємодія між одновалентним зв'язувальним об'єктом та РГЕБ відбувається по одному окремому епітопу. Одновалентне зв'язування запобігає будь-якій димеризації/мультимеризації РГЕБ завдяки єдиній точці взаємодії з епітопом. Одновалентне зв'язування запобігає змінам у внутрішньоклітинному сортуванні РГЕБ.

Термін "епітоп" позначає будь-яку поліпептидну детермінанту, здатну специфічно зв'язуватися з антитілом. У деяких варіантах виконання епітопні детермінанти включають хімічно активні поверхневі угруповання молекул, таких як амінокислоти, бічні ланцюги цукрів, залишки фосфорилу або сульфонілу, та, у деяких варіантах виконання, можуть мати специфічні тривимірні структурні характеристики і/або специфічні характеристики заряду. Епітоп - це ділянка антигена, що зв'язується з антитілом.

"Рецептор трансферину" (TfR) є трансмембранним глікопротеїном (молекулярна маса приблизно 180 000 Да), який складається з двох дисульфідно зв'язаних субодиниць (кожна з позірною молекулярною масою приблизно 90 000 Да) та бере участь в засвоєнні заліза у хребетних. В одному з варіантів виконання TfR тут і далі є людським TfR, що включає амінокислотну послідовність, описану в Schneider та ін. (Nature 311 (1984) 675-678).

Термін "засіб отримання зображень" позначає сполуку, одна чи більше властивостей якої уможливають пряме або опосередковане виявлення її присутності і/або розташування. Приклади таких засобів отримання зображень включають білки і низькомолекулярні сполуки, що містять мічену групу, яка уможливорює виявлення.

Терміни "ЦНС-антиген" та "мішень у мозку" позначають антиген і/або молекулу, яка експресується в ЦНС, включаючи головний мозок, і яку можна таргетувати за допомогою антитіла або малої молекули. Приклади такого антигена і/або молекули включають, не обмежуючись ними: бета-секретаза 1 (BACE1), бета-амілоїд (Abeta), рецептор епідермального фактору росту (EGFR), рецептор епідермального фактору росту людини 2 (HER2), тау-білок, аполіпопротеїн E4 (ApoE4), альфа-синуклеїн, CD20, гантінгтін, пріоновий білок (PrP), багата на лейцинові повтори кіназа 2 (LRRK2), паркін, пресенілін 1, пресенілін 2, гамма-секретаза, рецептор смерті 6 (DR6), білок-попередник амілоїду (APP), рецептор нейротрофіну р75 (р75NTR), глюкоцереброзидазу і каспазу 6.

Термін "специфічно зв'язується з" позначає антитіло, яке селективно або переважно зв'язується з антигеном. Афінність зв'язування звичайно визначають за допомогою стандартного аналізу, такого як аналіз Скетчарда, або технології поверхневого плазмонного резонансу (напр., з використанням BIACORE®).

Термін "CH2-CH3 Ig-об'єкт" тут і далі позначає білковий об'єкт, що походить від імуноглобулінових доменів CH2 або CH3. "CH2-CH3 Ig-об'єкт" включає два "CH2-CH3" поліпептиди, які утворюють димер. Імуноглобуліном може бути IgG, IgA, IgD, IgE або IgM. В одному з варіантів виконання CH2-CH3 Ig-об'єкт походить від імуноглобуліну IgG і позначається тут і далі як "CH2-CH3 IgG-об'єкт". Термін охоплює природну послідовність доменів CH2-CH3 та варіанти доменів CH2-CH3. В одному з варіантів виконання "CH2-CH3 Ig-об'єкт" походить від CH2-CH3-домену важкого ланцюга IgG людини, який простягається від Cys226 або Pro230 до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Однак С-кінцевий лізин (Lys447) Fc-ділянки може бути присутнім або відсутнім. Якщо не вказано інше, нумерація амінокислотних залишків у ділянці CH2-CH3-домену або константній ділянці наведена згідно системи нумерації EU, яку також називають покажчиком EU, як описано у Kabat та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-те вид., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

"Кон'югат" - це злитий білок згідно даного винаходу, скон'югований з однією або більше гетерологічних молекул, включаючи, але не обмежуючись ними, мітку, лікарський засіб від неврологічного порушення або цитотоксичний засіб.

Термін "лінкер" позначає хімічний лінкер або одноланцюговий пептидний лінкер, який ковалентно сполучає різні об'єкти транспортного модуля через гематоенцефалічний бар'єр і/або злитого поліпептиду і/або кон'югату згідно наданого тут опису. Лінкер сполучає, наприклад, об'єкт-ефектор мозку з одновалентним зв'язувальним об'єктом. Наприклад, якщо одновалентний зв'язувальний об'єкт включає CH2-CH3 Ig-об'єкт і scFab, спрямований на рецептор гематоенцефалічного бар'єру, то лінкер кон'югує scFab до С-кінця CH2-CH3 Ig-об'єкту. Лінкер, що сполучає об'єкт-ефектор мозку з одновалентним зв'язувальним об'єктом (перший лінкер), та лінкер, що приєднує scFab до С-кінця CH2-CH3 Ig-домену (другий лінкер), може бути таким самим або відрізнитися.

Можуть використовуватись одноланцюгові пептидні лінкери, що включають від одного до двадцяти амінокислотних залишків, поєднаних пептидними зв'язками. У деяких варіантах виконання амінокислоти вибрані з-поміж двадцяти амінокислот, що зустрічаються в природі. У певних інших варіантах виконання одна або більше амінокислот вибрані з гліцину, аланіну, проліну, аспарагіну, глутаміну та лізину. В інших варіантах виконання лінкер є хімічним лінкером. У певних варіантах виконання лінкер є одноланцюговим пептидним лінкером з амінокислотою послідовністю довжиною принаймні 25 амінокислотних залишків, в одному варіанті виконання, якому віддають перевагу – довжиною від 32 до 50 амінокислотних залишків. В одному з варіантів виконання пептидний лінкер являє собою лінкер (GxS)_n, де G = гліцин, S = серин, (x=3, n=8, 9 або 10) або (x=4 та n=6, 7 або 8), в одному варіанті виконання x=4, n=6 або 7, в одному варіанті виконання, якому віддають перевагу, x=4, n=7. В одному з варіантів виконання лінкер є (G4S)₄ (SEQ ID NO: 95). В одному з варіантів виконання лінкер є (G4S)₆G₂ (SEQ ID NO: 96).

Кон'югацію можна також здійснити за допомогою різноманітних хімічних лінкерів. Наприклад, одновалентний зв'язувальний об'єкт або злитий поліпептид та об'єкт-ефектор мозку можна скон'югувати за допомогою різноманітних біфункціональних агентів зв'язування білків, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (СПДП), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилат (СМЦК), імінотіолан (ІТ), біфункціональні похідні імідоестерів (такі як диметиладипімідат НС1), активні естери (такі як дисукцинімідил суберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидні сполуки (такі як біс-(р-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(р-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанати (такі як толуолу 2,6-діізоціанат), а також біс-активні сполуки фтору (такі як І, 5-дифтор-2,4-динітробензол). Лінкер може бути "розщеплюваним лінкером", який сприяє вивільненню об'єкта-ефектора після доставки у мозок. Наприклад, можуть використовуватись кислотолабільний лінкер, пептидазочутливий лінкер, фототлабільний лінкер, диметилловий лінкер або лінкер, що містить дисульфідні зв'язки (Charl та ін., Cancer Res. 52 (1992) 127-131; US 5,208,020).

Ковалентна кон'югація може бути безпосередньою або через лінкер. У певних варіантах виконання безпосередня кон'югація здійснена шляхом конструювання злиття поліпептидів (тобто злиттям двох генів, які кодують одновалентний зв'язувальний об'єкт для РГЕБ і об'єкт-ефектор та експресуються як один поліпептид (ланцюг)). У певних варіантах виконання безпосередня кон'югація здійснена шляхом

утворення ковалентного зв'язку між реакційноздатною групою на одній з двох частин одновалентного зв'язувального об'єкта для РГЕБ і відповідною групою або акцептором на об'єкті-ефекторі мозку. У певних варіантах виконання безпосередня кон'югація здійснена шляхом модифікації (тобто генетичної модифікації) однієї з двох молекул, що підлягають кон'югації, таким чином, щоб вона включала реакційноздатну групу (в якості необмежувачих прикладів – сульфгідрильну групу або карбоксильну групу), яка в належних умовах утворює ковалентний зв'язок з іншою молекулою, що підлягає кон'югації. В якості необмежувачого прикладу молекулу (тобто амінокислоту) з бажаною реакційноздатною групою (тобто цистеїновим залишком) можна ввести в, напр., одновалентний зв'язувальний об'єкт для РГЕБ і сформувати з неврологічним лікарським засобом дисульфідний зв'язок. В галузі також відомі способи ковалентної кон'югації нуклеїнових кислот до білків (тобто фотозшивання, див., напр., Zetsepim та ін. Russ. Chem. Rev. 74 (2005) 77-95). Кон'югацію можна також здійснити за допомогою різноманітних лінкерів. Наприклад, одновалентний зв'язувальний об'єкт та об'єкт-ефектор можна скон'югувати за допомогою різноманітних біфункціональних агентів зв'язування білків, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (СПДП), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилат (СМЦК), імінотіолан (ІТ), біфункціональні похідні імідоестерів (такі як диметиладипімідат НС1), активні естери (такі як дисукцинімідил суберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидні сполуки (такі як біс-(p-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(p-діазонійбензоїл)- етилендіамін), диізоціанати (такі як толуолу 2,6-диізоціанат), а також біс-активні сполуки фтору (такі як 1, 5-дифтор-2,4-динітробензол). Можуть також використовуватись пептидні лінкери, що складаються з від одного до двадцяти амінокислотних залишків, поєднаних пептидними зв'язками. У деяких подібних варіантах виконання амінокислотні залишки вибрані з-поміж двадцяти амінокислот, що зустрічаються в природі. У певних інших подібних варіантах виконання один або більше амінокислотних залишків вибрані з гліцину, аланіну, проліну, аспарагіну, глутаміну та лізину. Лінкер може бути "розщеплюваним лінкером", який сприяє вивільненню об'єкта-ефектора після доставки у мозок. Наприклад, можуть використовуватись кислотолабільний лінкер, пептидазочутливий лінкер, фотоллабільний лінкер, диметилловий лінкер або лінкер, що містить дисульфідні зв'язки (Charl та ін., Cancer Res. 52 (1992) 127-131; US 5,208,020).

II. КОМПОЗИЦІЇ ТА МЕТОДИ

Для опису молекулярних взаємодій часто використовують рівноважні константи дисоціації (K_D). Їх використовують як міру сили взаємодії (напр., афінності) двох молекул одна з одною. Тому значення K_D є мірою сили бімолекулярної взаємодії.

Однак значення K_D як таке не описує кінетику молекулярної взаємодії, тобто зі значення K_D не можна вивести, з одного боку, наскільки швидко дві молекули зв'язуються одна з одною (константа швидкості асоціації, або "on-rate"), а з іншого боку, наскільки швидко дві молекули дисоціюють (константа швидкості дисоціації, або "off-rate"). Характеристика бімолекулярних взаємодій лише значенням їх K_D упускає той факт, що можна одержати таке саме значення K_D за надзвичайно різних (таких, що відрізняються на порядки) швидкостей асоціації та дисоціації, оскільки значення K_D є їх відношенням.

Однак швидкості асоціації та дисоціації важливі для характеристики поведінки молекул при зв'язуванні. Швидкість дисоціації особливо важлива, оскільки вона описує тривалість зв'язування, напр., антитіла з його антигеном. Тривала швидкість дисоціації корелює з повільною дисоціацією утвореного комплексу, тоді як коротка швидкість дисоціації корелює зі швидкою дисоціацією.

З метою досягти довготривалих (а отже, таких, що потребують менш частого введення) або спеціально підібраних (напр., таких, що залежать від умов середовища) взаємодій швидкості дисоціації потрібно визначати експериментально. Це ще більш важливо з огляду на те, що передбачити швидкість дисоціації майже неможливо. Крім цього, як зазначено вище, кореляція між швидкістю дисоціації та афінністю зв'язування слабка. Наприклад, через те, що значення K_D є відношенням швидкостей асоціації та дисоціації, навіть слабкі зв'язувачі можуть довго залишатися зв'язаними зі своєю мішенню, тоді як сильні зв'язувачі можуть швидко дисоціювати.

Типовим вузьким місцем проектів створення антитіл є ранжування багатьох кандидатів, одержаних після пеннінгу, на основі сили зв'язування антитіла. В ідеалі такий метод повинен працювати без попереднього мічення антигенів і на неочищених бактеріальних лізатах. Ylera, F. та ін. (Anal. Biochem. 441 (2013) 208-213) повідомляли про метод скринінгу швидкості дисоціації для відбору високоафінних антитіл до лікарських сполук з неочищених лізатів *Escherichia coli*, що містили одновалентні Fab-фрагменти. Вони вибрали швидкість дисоціації як параметр ранжування тому, що серед іншого швидкість дисоціації не залежить від концентрації. Вони вибрали одновалентний формат для уникнення під час ранжування за швидкістю дисоціації та визначення афінності ефектів авідності, які б спостерігалися з цільним IgG. Ylera та ін. було виявлено, що клон з найкращою швидкістю дисоціації був ідентифікований саме на етапі ранжування за koff, але не був би ідентифікований при застосуванні лише сили сигналу ІФА як критерія відбору.

Murray, J.V. та ін. (J. Med. Chem. 57 (2014) 2845-2850) повідомляли про скринінг швидкості дисоціації (СШД) методом поверхневого плазмонного резонансу як про ефективний метод кінетичного

відбору проб потенційного списку з хімічного простору неочищених продуктів реакції. Зазначено, що константа швидкості дисоціації k_d (off-rate) є компонентом ліганд-білкового зв'язування, який має найбільш значний потенціал для посилення специфічної активності сполуки. Автори зазначають, що кінетичне вимірювання афінності протягом програми пошуку ліків є більш інформативним, ніж визначення рівноважної афінності у стаціонарному стані. Наприклад, сполуку зі вдесятеро повільнішими швидкостями асоціації та дисоціації при оцінюванні рівноважними вимірюваннями афінності не відрізняли б. Більше того, автори виявили, що дані, одержані на приладі BIAcore T200, показали середню відмінність k_d у неочищених і очищених зразків 19 %, а ті ж самі дані, одержані на старшому приладі BIAcore T100, мали відмінність 15 %. За спостереженням авторів, k_d при порівнянні різних приладів і різних часів відрізняються в середньому лише на 30 %. Звідси видно, що слідове забруднення попередньою пробою, довготривале зберігання та різне обладнання помірно впливають на спостережувані k_d . Справді, ці малі девіації k_d цілком відображають різницю, яку спостерігали у багатолабораторних дослідженнях, де спостережувана варіабельність становила від 14 % до 40 % залежно від системи (Murray, J.B., та ін., *J. Med. Chem.* 57 (2014) 2845-2850; Katsamba, P.S., та ін., *Anal. Biochem.* 352 (2006) 208-221).

У WO 2014/189973 описано антитіла до рецептора трансферину і способи їх застосування. Крім цього, повідомлено, що таргетування рецептора ГЕБ за допомогою традиційного специфічного високоафінного антитіла, як правило, призводило до обмеженого зростання транспорту через ГЕБ. Пізніше було виявлено, що серед досліджуваних антитіл до ГЕБ рівні проходження і розподілу антитіла у ЦНС обернено залежні від афінності його зв'язування з рецептором ГЕБ. Наприклад, низькоафінне антитіло до рецептора трансферину (TfR) у терапевтичних дозах сильно поліпшувало транспорт антитіла до TfR через ГЕБ і утримання в ЦНС порівняно з більш афінним антитілом до TfR, а також уможлиблювало більш легке досягнення терапевтичних концентрацій у ЦНС (Atwal та ін., *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 84ra43). Доказ такого транспорту через ГЕБ було одержано при використанні біспецифічного антитіла, яке зв'язується з TfR та ферментом, що розщеплює білок-попередник амілоїду (APP), β -секретазою (BACE1). Одна системна доза біспецифічного антитіла до TfR/BACE1, сконструйованого з використанням низькоафінного антитіла, не тільки призводила до значного споживання антитіла головним мозком, але також різко знижувала рівні $A\beta_{1-40}$ в мозку порівняно з самим лише моноспецифічним антитілом до BACE1, змушуючи припустити, що проникність через ГЕБ впливає на специфічну активність антитіла до BACE1 (Atwal та ін., *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 84ra43; Yu та ін., *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 84ra44).

Наявні дані та експерименти висвітлюють декілька причинних механізмів підвищення поглинання антитіла в ЦНС із використанням підходу "антитіло з нижчою афінністю".

По-перше, високоафінні антитіла до рецептора ГЕБ (P-ГЕБ) (напр., антитіло до TfR з Atwal та ін. і Yu та ін., *supra*) обмежують споживання мозком через швидке насичення P-ГЕБ в судинах мозку, таким чином зменшуючи загальну кількість антитіла, яке проходить у мозок, а також обмежуючи його розподіл по судинній системі. Навдивовижу, зниження афінності до P-ГЕБ покращує споживання мозком і розподіл в ньому, при цьому спостерігається стійке зміщення локалізації від судинної системи до нейронів та асоційованого нейропіля, розосередженого по ЦНС. Було виявлено, що афінність повинна бути нижче певного верхнього рівня і вище певного нижнього рівня.

По-друге, нижча афінність антитіла до P-ГЕБ запропонована з метою погіршення здатності антитіла повертатися на судинний бік ГЕБ через P-ГЕБ з ЦНС-боку мембрани, оскільки загальна афінність антитіла до P-ГЕБ низька, а місцева концентрація антитіла на ЦНС-боці ГЕБ не є насичуючою через швидке розсіювання антитіла у просторі ЦНС.

По-третє, *in vivo*, а також згідно спостережень за системою TfR, антитіла з меншою афінністю до P-ГЕБ не видаляються із системи так само ефективно, як антитіла з більшою афінністю до P-ГЕБ, і тому залишаються у більшій циркулюючій концентрації, ніж їхні більш високоафінні відповідники. Це сприятливо, оскільки рівні циркулюючого антитіла з меншою афінністю утримуються на терапевтичному рівні протягом довшого періоду часу, ніж антитіла з вищою афінністю, що в свою чергу покращує поглинання антитіла мозком протягом довшого періоду часу. Більше того, це вдосконалення експозиції як у плазмі крові, так і в головному мозку може знизити частоту введення у клініці, що було б потенційно корисним не тільки для дотримання пацієнтом режиму терапії та його зручності, але також для зменшення будь-яких потенційних ефектів, не обумовлених дією на мішень, або побічних ефектів антитіла і/або приєднаної до нього терапевтичної сполуки.

В зазначених попередніх дослідженнях використовували мишачі антитіла, які специфічно зв'язувалися з мишачим TfR, але які не розпізнавали специфічно TfR приматів або людини. Відповідно, тут надано антитіла та їх функціональні частини, які специфічно розпізнають TfR як приматів, особливо яванських макак, так і людини, з метою сприяти дослідженням безпечності та ефективності антитіл на приматах перед терапевтичним або діагностичним застосуванням для людей.

Через постійне ускладнення аспектів конструювання антитіл та варіабельність, викликану різноманітністю клітинних систем рекомбінантного продукування для вироблення антитіл, дуже важливим є ретельне неклінічне оцінювання безпечності моноклональних антитіл (mAb), призначених

для терапевтичного застосування. Більше того, складна структура, унікальні біологічні функції та більш тривалий період напівжиття mAb порівняно з традиційними низькомолекулярними лікарськими сполуками посилюють міркування безпеки, як і занепокоєння з приводу тривалішого клінічного застосування mAb у лікуванні хронічних захворювань (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Kim, S.J., та ін., Mol. Cells 20 (2005) 17-29).

Загальною метою неклінічних досліджень mAb є визначення токсикологічних властивостей досліджуваного mAb і надання інформації для розробки продукту. Основними завданнями неклінічного оцінювання є (1) ідентифікація органів-мішеней токсичності та визначення того, чи оборотна ця токсичність після лікування, (2) ідентифікація безпечної початкової дози для клінічного дослідження I фази на людях та схем подальшого підвищення дози, (3) здобуття інформації для відстеження безпекових показників у клінічних дослідженнях та (4) здобуття даних про безпеку для обґрунтування тверджень інструкції до продукту. Для досягнення цих цілей проводять доклінічні дослідження як *in vitro*, так і *in vivo*, спрямовані на визначення та розуміння фармакологічних властивостей антитіла (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Cavagnaro, J.A., в: Cavagnaro, J.A. (Ed.) "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals"; Hoboken, NJ: Wiley 2008; 45-65).

З метою успішного доклінічного оцінювання безпечності mAb для перевірки токсичності слід вибирати найбільш придатний вид тварин (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., та ін., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126). Придатний вид – це вид, у якого антитіло фармакологічно активне, наявний або експресується цільовий антиген, а профіль перехресної реактивності у тканинах подібний до людського (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., та ін., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126; Subramanyam, M. та Mertsching, E., у: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205; Hall, W.C., та ін., у: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Придатний вид тварин, який експресує бажаний епітоп та демонструє подібний до людських тканин профіль перехресної реактивності у тканинах, можна ідентифікувати з застосуванням імунохімічного або функціонального аналізу (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., та ін., у: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Корисні у цьому процесі дослідження перехресної реактивності між видами включають імуногістохімічне обмеження тканин різних видів з використанням доступних у продажу мультивидових тканинних мікрочіпів (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., та ін., у: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Альтернативна оцінка зв'язування антитіла з клітинами цих тварин за допомогою проточного сортування клітин (FACS) зазвичай є більш чутливою, ніж імуногістохімічний аналіз зрізів тканин (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. та Mertsching, E., у: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205). У видів слід порівнювати ДНК- та амінокислотні послідовності цільового антигена; також слід визначати міжвидову гомологічність (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. та Mertsching, E., у: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205).

Крім цього, біорозподіл, функція та структура антигену у придатного виду тварин і людини повинні піддаватися порівнянню, щоб уможливити оцінку токсичності, яка виникає внаслідок зв'язування антитіла з цільовим антигеном і називається токсичністю, обумовленою дією на мішень (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11; 19,20). Більше того, значна подібність розподілу цільового антигена у тканинах виду тварин і людини збільшує імовірність того, що визначені на тваринах органи-мішені токсичності слугуватимуть передбаченням потенційної токсичності у людей. Недостатньо подібний розподіл антигена в тканинах виду тварин і людини не виключає використання цього виду тварин для досліджень токсичності повністю, але цю різницю слід враховувати при оцінюванні ризиків для людини. У відношенні густини або афінності антигенів також не вимагається абсолютної еквівалентності тваринної моделі та людини. Обґрунтування придатності виду, обраного для перевірки токсичності, слід включати у пакет документів для подання в регуляторний орган. Якщо для оцінювання безпеки використовують лише один вид, слід надати стислий підсумок експериментів, які показали відсутність додаткового придатного виду (Lynch, C.M., та ін., mAbs 1 (2009) 2-11).

Якщо моноклональне антитіло, призначене для терапевтичного застосування, не має перехресної реактивності по виду, то для моделі слід використовувати або сурогатне антитіло, або інший вид. Тому сурогатні антитіла є потенційним вирішенням обмежень перевірки безпечності, можливих при роботі з гуманізованими моноклональними антитілами з обмеженою перехресною реактивністю по видам. Однак на даний момент немає чітких критеріїв оцінювання потенційних сурогатних антитіл перед їх використанням у визначенні ознак небезпечності лікарської речовини (Regulatory Toxicology and Pharmacology, том 40, номер 3, грудень 2004 р., с. 219–226).

Таким чином, для визначення тваринної моделі для конкретного mAb слід взяти до уваги вищеперелічені міркування. Тим не менш необхідна наявність перехресної реактивності досліджуваного mAb з цільовим антигеном тестового виду. Інакше неможливо використати навіть найбільш придатний тестовий вид. Тому існує потреба у mAb, що не мають внутрішньовидової

перехресної реактивності, але мають міжвидову перехресну реактивність зі своєю мішенню у людини і виду, призначеного для доклінічних випробувань.

А. Приклади антитіл до трансферину

Тут описано антитіла до рецептора трансферину, швидкість дисоціації яких при зв'язуванні з рецептором трансферину людини знаходиться у певному діапазоні для забезпечення належного транспорту через ГЕБ. Було виявлено, що цей діапазон визначається з одного боку швидкістю дисоціації мишачого антитіла 128.1 до рецептора трансферину (амінокислотні послідовності варіабельного домену, наведені у SEQ ID NO: 64 та 65), визначеною поверхневим плазмонним резонансом для рецептора трансферину яванської макаки, а з іншого боку – 5 % від цієї швидкості дисоціації (тобто повільнішою у 20 разів дисоціацією). В одному з варіантів виконання швидкість дисоціації для рецептора трансферину людини становить від 0,1 1/с до 0,005 1/с, включно з цими значеннями.

Гуманізовані антитіла клону 299 згідно даного опису не можна було одержати із застосуванням стандартних технік гуманізації. Необхідно було ввести в амінокислотну послідовність нестандартні мутації з метою одержати гуманізоване антитіло зі швидкостями дисоціації при зв'язуванні з рецептором трансферину в бажаному діапазоні від 0,1 1/с до 0,005 1/с, включно з цими значеннями. Це особливо важливо з огляду на те, що описані тут антитіла розробляються для перетину гематоенцефалічного бар'єру людини з метою транспорту терапевтичного корисного навантаження у мозок.

Було виявлено, що для одержання підходящого і придатного для розробки гуманізованого антитіла потрібно було замінити два цистеїнових амінокислотних залишки у легкому ланцюзі батьківського кролячого антитіла на проліновий і аспарагіновий амінокислотні залишки, відповідно. Додатково для утримання в заданому діапазоні швидкості дисоціації сериновий залишок посередині кролячої CDRL3 слід було замінити на аланіновий залишок.

Крім цього, було виявлено, що сприятливою є зміна трьох амінокислотних залишків у важкому ланцюзі у положеннях 65, 100g та 105 (нумерація за Kabat).

Вся нумерація, застосована тут і далі, базується на схемі нумерування варіабельних доменів за Kabat.

Клон 299 кролячого антитіла до трансферину показав властивості, порівнянні з властивостями антитіла 128.1 до рецептора трансферину. Це можна побачити з наступної Таблиці.

джерело	трансктитозне навантаження [пг]	трансктитоз % базолатеральний	загальний базолатеральний [пг]	загальний апікальний [пг]	сумарно перенесено [пг]
mAb 128.1	2226	34	757	1229	1986
клон-299	2773	36	998	1346	2344
джерело	навантаження % mAb 128.1	загальний базолатеральний % mAb 128.1	загальний апікальний % mAb 128.1	сумарно перенесено % mAb 128.1	EC50 [нг/мл] FACS hTfR-CHO
mAb 128.1	100	100	100	100	96
клон-299	125	132	110	118	275
джерело	макс. геом. сер. hTfR-CHO	EC50 [нг/мл] FACS cyTfR	макс. геом. сер. макака TfR-CHO	відношення EC50 макака/людина	макс. відношення макака/людина
mAb 128.1	78200	314	52100	3.3	0,6
клон-299	55600	241	52000	0.9	1,0
джерело	BIACore швидкість дисоціації huTfR [1/с]	BIACore t1/2 huTfR [хв]	BIACore швидкість дисоціації cyTfR [1/с]	BIACore t1/2 макака TfR [хв]	відношення t1/2 людина/макака
mAb 128.1	6,06E-04	19	5,47E-02	0,2	90,2
клон-299	6,16E-04	19	2,77E-04	42	0,4

У наступній Таблиці показано швидкості дисоціації варіантів гуманізації кролячого варіабельного домена легкого ланцюга клону 299 у комбінації з варіантами гуманізації кролячого варіабельного домена важкого ланцюга клону 299. Партнером зв'язування був рецептор трансферину людини (визначення при 25 °C).

VH→ VL↓	0 (rb)	1	2	5	6	7	8	9	11	12
0 (rb)	4.34E-04	9.08E-04	8.06E-04	7.72E-04	6.63E-04	5.15E-04	4.06E-04	9.01E-04	9.05E-04	9.21E-04
1	5.69E-03	1.00E-03	1.00E-03	1.00E-03	1.00E-03	7.52E-03	3.19E-03	6.94E-03	1.00E-03	1.00E-03
2	1.25E-03	2.86E-03	2.75E-03	2.41E-03	1.87E-03	1.31E-03	1.01E-03	3.99E-03	3.85E-03	6.35E-03
3	1.32E-03	4.31E-03	3.84E-03	3.16E-03	2.82E-03	1.45E-03	1.00E-03	4.17E-03	5.65E-03	5.86E-03
4	1.36E-03	2.56E-03	2.63E-03	2.38E-03	1.87E-03	1.25E-03	7.88E-04	2.70E-03	3.88E-03	3.11E-03
5	1.94E-03	2.71E-03	2.62E-03	2.53E-03	1.66E-03	1.35E-03	1.07E-03	3.50E-03	4.56E-03	5.82E-03
6	1.90E-03	5.38E-03	5.55E-03	4.64E-03	3.06E-03	1.97E-03	1.40E-03	6.83E-03	6.71E-03	7.05E-03
7	4.63E-03	7.33E-03	7.50E-03	6.97E-03	5.63E-03	3.66E-03	2.31E-03	7.61E-03	7.81E-03	7.71E-03
8	1.39E-03	4.85E-03	3.94E-03	3.78E-03	3.01E-03	1.72E-03	1.16E-03	5.23E-03	5.52E-03	5.31E-03
9-NYA	1.41E-03	2.46E-03	2.21E-03	2.03E-03	1.41E-03	1.21E-03	1.01E-03	2.52E-03	2.42E-03	2.19E-03
10	1.88E-03	6.77E-03	6.49E-03	6.53E-03	4.55E-03	2.64E-03	1.73E-03	7.19E-03	7.16E-03	7.79E-03
12	5.41E-03	7.05E-03	8.14E-03	1.00E-03	7.78E-03	7.75E-03	6.72E-03	1.00E-03	7.87E-03	1.00E-03
14	1.78E-03	2.99E-03	2.44E-03	2.33E-03	2.20E-03	1.53E-03	1.04E-03	3.32E-03	3.51E-03	5.46E-03
15	6.63E-03	6.69E-03	6.38E-03	6.37E-03	4.21E-03	2.73E-03	1.81E-03	7.39E-03	7.09E-03	7.76E-03
17	1.49E-03	7.56E-03	7.12E-03	7.45E-03	7.17E-03	1.87E-03	1.12E-03	4.25E-03	7.55E-03	7.27E-03
VH→ VL↓	13	15	16	17	18	19	20	21	22	23-DANG
0 (rb)	4.82E-04	7.63E-04	6.53E-04	4.13E-04	1.09E-03	1.00E-03	1.11E-03	5.65E-04	5.06E-04	3.38E-04
1	1.00E-03	7.72E-03	7.71E-03	4.33E-03	1.00E-03	1.00E-03	1.00E-03	7.71E-03	5.78E-03	2.80E-03
2	2.46E-03	2.16E-03	1.97E-03	1.05E-03	4.89E-03	7.69E-03	5.25E-03	1.38E-03	1.26E-03	7.15E-04
3	2.77E-03	2.07E-03	1.73E-03	8.43E-04	6.65E-03	1.00E-03	7.15E-03	1.94E-03	1.43E-03	7.83E-04
4	1.30E-03	1.34E-03	1.27E-03	7.23E-04	3.35E-03	1.00E-03	4.36E-03	1.46E-03	1.18E-03	7.61E-04
5	2.18E-03	2.14E-03	2.23E-03	1.23E-03	3.49E-03	1.00E-03	3.52E-03	1.37E-03	1.41E-03	8.80E-04
6	3.65E-03	3.50E-03	3.39E-03	1.71E-03	6.74E-03	1.00E-03	6.06E-03	2.07E-03	2.14E-03	1.16E-03
7	6.68E-03	5.43E-03	5.25E-03	2.33E-03	7.66E-03	1.00E-03	7.14E-03	2.38E-03	3.37E-03	1.55E-03
8	2.47E-03	2.09E-03	1.97E-03	1.11E-03	6.77E-03	6.71E-03	6.58E-03	1.74E-03	1.65E-03	9.41E-04
9-NYA	1.39E-03	1.42E-03	1.36E-03	9.34E-04	2.21E-03	6.17E-03	1.89E-03	1.13E-03	1.26E-03	7.69E-04
10	5.89E-03	3.99E-03	4.24E-03	1.88E-03	7.46E-03	1.00E-03	7.05E-03	2.11E-03	2.09E-03	1.20E-03
12	7.85E-03	7.64E-03	7.54E-03	2.84E-03	1.00E-03	1.00E-03	1.00E-03	7.54E-03	6.44E-03	1.87E-03
14	2.22E-03	1.94E-03	1.75E-03	1.05E-03	3.00E-03	7.96E-03	2.39E-03	1.03E-03	1.12E-03	7.33E-04
15	7.11E-03	6.03E-03	4.77E-03	1.56E-03	7.58E-03	1.00E-03	7.85E-03	1.92E-03	1.79E-03	9.86E-04
17	3.39E-03	1.69E-03	1.66E-03	9.88E-04	5.30E-03	1.00E-03	4.57E-03	9.97E-04	9.38E-04	6.94E-04

Комбінацію VH23 та VL9 обрали в якості початкової точки для подальшого конструювання з метою розробки сайту зв'язування, який би більш точно відображав зв'язувальні властивості антитіла 128.1 щодо рецептору трансферину яванських макак у відношенні зв'язування з рецептором трансферину людини.

У наступній Таблиці показано порівняння швидкостей дисоціації різних прикладів варіантів VH23 та VL9, а також різних інших варіантів гуманізації варіабельного домену для рецептору трансферину людини (визначених згідно Прикладу 14, 25 °C).

	VK9- NYA	VK9- SYA	VK9- GYS	VK9- CYS	VH567- P...NYA	VK12- HYS	VK17- TYS	VK15- AYS	VK2- SYS	VK6- SYS
VH23- DANG	8.83E-03		3.96E-03		4.62E-03	1.53E-02	2.29E-03	6.97E-03	5.22E-03	1.32E-02
VH23- DASG	3.95E-02	4.84E-04	3.73E-03	2.33E-03						
VH23- DAQG	1.49E-02	7.55E-04	3.75E-03	1.51E-03						
VH9-DANG	1.82E-03			6.52E-03					4.02E-02	
VH9-DAQG	1.25E-03									
VH7-DANG										3.08E-02

еталон: 128.1=7.78E-02 (визначено для рецептору трансферину яванських макак).

У наступній Таблиці показано порівняння кінетичних даних різних прикладів варіантів VH23 та VL9

(визначених згідно Прикладу 13).

Аналіз BIAcore @ 25 °C	TfR	kd [c ⁻¹]	ka [c ⁻¹ M ⁻¹]	kD [M]
mAb 128.1	яванська макака	7.33E-02	5.41E+05	1.36E-07
VH23-DASG/VL09-NYA	людина	3.95E-02	8.83E+04	4.47E-07
VH23-DAQG/VL09-NYA	людина	1.37E-02	1.21E+05	1.13E-07
VH23-DANG/VL09-NYA	людина	8.83E-03	1.55E+05	5.72E-08

У наступній Таблиці показано швидкості дисоціації варіантів гуманізації мишачого варіабельного домена легкого ланцюга клону 494 у комбінації з варіантами гуманізації мишачого варіабельного домена важкого ланцюга клону 494. Партнером зв'язування був рецептор трансферину людини.

VH→ VL↓	0 (mu)	1	2	3	4
0 (mu)	1.36E-04	1.37E-04	1.56E-04	1.48E-04	1.77E-04
1	3.70E-04	4.10E-04	4.54E-04	4.76E-04	4.48E-04
2	3.64E-04	3.99E-04	4.26E-04	4.15E-04	4.38E-04
3	3.39E-04	3.86E-04	4.30E-04	4.34E-04	4.52E-04
4	5.42E-04	6.57E-04	7.03E-04	6.83E-04	7.05E-04
5	5.44E-04	6.84E-04	7.17E-04	7.17E-04	7.28E-04
6	3.81E-04	4.86E-04	5.27E-04	5.50E-04	5.52E-04
7	2.32E-04	2.74E-04	2.99E-04	3.06E-04	3.26E-04

Більш детально, в одному з аспектів винахід частково базується на виявленні того, що антитіло до рецептора трансферину згідно наданого тут опису може бути застосоване в якості транспортного модуля через гематоенцефалічний бар'єр для доставки об'єкта-ефектора мозку через гематоенцефалічний бар'єр у головний мозок. У певних варіантах виконання транспортний модуль через гематоенцефалічний бар'єр являє собою одновалентний зв'язувальний об'єкт, який специфічно зв'язується з рецептором трансферину. Антитіла до рецептора трансферину згідно даного опису при застосуванні в якості транспортного модуля через гематоенцефалічний бар'єр корисні, напр., для діагностики або лікування неврологічних порушень, таких як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона та хвороба Альцгеймера з супутньою хворобою Паркінсона.

Було виявлено, що антитіло, яке включає варіабельний домен важкого ланцюга за SEQ ID NO: 24 та варіабельний домен легкого ланцюга за SEQ ID NO: 37, у відношенні рецептора трансферину людини відображає властивості зв'язування мишачого антитіла 128.1 у відношенні рецептора трансферину яванських макак, що стосуються швидкості дисоціації зв'язування.

Відповідно, одним з описаних тут аспектів є ізольоване антитіло, що зв'язується з рецептором трансферину людини (huTfR) та рецептором трансферину яванських макак (cyTfR), причому антитіло має швидкість дисоціації, визначену методом поверхневого плазмонного резонансу для рецептору трансферину людини, в діапазоні від 0,1 1/с до 0,005 1/с.

Іншим описаним тут аспектом є застосування антитіла або фрагмента антитіла, що зв'язується з рецептором трансферину людини (huTfR) та рецептором трансферину яванських макак (cyTfR), причому антитіло має швидкість дисоціації, визначену методом поверхневого плазмонного резонансу для рецептору трансферину людини, в діапазоні від 0,1 1/с до 0,005 1/с, для доставки терапевтичного об'єкта через гематоенцефалічний бар'єр.

В одному з варіантів виконання швидкість дисоціації визначена при 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 та 0 нМ.

В одному з варіантів виконання швидкість дисоціації визначена з використанням чіпа для поверхневого плазмонного резонансу з біотиновою поверхнею та рухомим буфером 1xФСБ з додаванням 250 мМ хлориду натрію при швидкості потоку 10 мкл/хв.

В одному з варіантів виконання асоціацію відслідковували протягом 180 секунд, а дисоціацію відслідковували протягом 600 секунд.

В одному з варіантів виконання швидкість дисоціації визначали на BIAcore T200.

В одному з варіантів виконання швидкість дисоціації становить від 0,08 1/с до 0,008 1/с.

В одному з варіантів виконання всіх аспектів швидкість дисоціації визначають при 25 °C.

В одному з варіантів виконання всіх аспектів швидкість дисоціації є швидкістю дисоціації, визначеною при 25 °C.

Одним з описаних тут аспектів є антитіло до рецептора трансферину, яке специфічно зв'язується з рецептором трансферину людини (huTfR) та рецептором трансферину яванських макак (cyTfR) та включає I) гуманізований варіабельний домен важкого ланцюга, що походить від варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 01, та II) гуманізований варіабельний домен легкого ланцюга,

що походить від варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 26, при цьому варіабельний домен легкого ланцюга у положенні 80 має проліновий амінокислотний залишок (P), у положенні 91 аспарагіновий амінокислотний залишок (N) і у положенні 93 аланіновий амінокислотний залишок (A) (нумерація за системою Kabat).

В одному з варіантів виконання антитіло додатково має у положенні 100g варіабельного домену важкого ланцюга (нумерація за Kabat) амінокислотний залишок серину (S).

В одному з варіантів виконання антитіло додатково має у положенні 65 варіабельного домену важкого ланцюга (нумерація за Kabat) амінокислотний залишок серину (S).

В одному з варіантів виконання антитіло додатково має у положенні 105 варіабельного домену важкого ланцюга (нумерація за Kabat) амінокислотний залишок глутаміну (Q).

Одним з описаних тут аспектів є антитіло до рецептора трансферину, яке специфічно зв'язується з рецептором трансферину людини (huTfR) та рецептором трансферину яванських макак (cyTfR) та включає I) гуманізований варіабельний домен важкого ланцюга, що походить від варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 01, та II) гуманізований варіабельний домен легкого ланцюга, що походить від варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 26, при цьому антитіло має швидкість дисоціації в одиницях виміру 1/с для рецептора трансферину людини, яка менша або дорівнює (тобто щонайбільше є рівною) швидкості дисоціації в одиницях виміру 1/с антитіла 128.1 до рецептора трансферину для рецептора трансферину яванських макак, де швидкості дисоціації визначено методом поверхневого плазмонного резонансу, і де антитіло 128.1 до рецептора трансферину має варіабельний домен важкого ланцюга за SEQ ID NO: 64 та варіабельний домен легкого ланцюга за SEQ ID NO: 65.

В одному з варіантів виконання антитіло має швидкість дисоціації в одиницях виміру 1/с для рецептора трансферину людини, яка I) менша або дорівнює (тобто щонайбільше є рівною) швидкості дисоціації в одиницях виміру 1/с антитіла 128.1 до рецептора трансферину для рецептора трансферину яванських макак та II) більша або дорівнює (тобто щонайменше є рівною) 5 % швидкості дисоціації в одиницях виміру 1/с антитіла 128.1 до рецептора трансферину для рецептора трансферину яванських макак.

Одним з описаних тут аспектів є антитіло до рецептора трансферину, яке специфічно зв'язується з рецептором трансферину людини (huTfR) та рецептором трансферину яванських макак (cyTfR). У певних варіантах виконання антитіло до рецептора трансферину

- зв'язується з рецептором трансферину людини (huTfR) та рецептором трансферину яванських макак (cyTfR);

- має швидкість дисоціації в одиницях виміру 1/с для рецептора трансферину людини, яка менша або дорівнює (тобто щонайбільше є рівною) швидкості дисоціації антитіла 128.1 до рецептора трансферину для рецептора трансферину яванських макак, де швидкості дисоціації визначено методом поверхневого плазмонного резонансу, і де антитіло 128.1 до рецептора трансферину має варіабельний домен важкого ланцюга за SEQ ID NO: 64 та варіабельний домен легкого ланцюга за SEQ ID NO: 65;

- зв'язується з рецептором трансферину людини зі швидкістю дисоціації від 0,1 1/с до 0,005 1/с, включно з цими значеннями.

В одному аспекті забезпечене антитіло до рецептора трансферину, що включає принаймні одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (а) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66; (б) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68; (в) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 71, 72 або 73; (г) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75; (ґ) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76; та (д) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78.

В одному аспекті винаходом забезпечене антитіло, що включає принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності VH HVR, вибрані з (а) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66; (б) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68; та (в) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 71 або 72 або 73. В одному аспекті винаходом забезпечене антитіло, що включає принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності VH HVR, вибрані з (а) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66; (б) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68; та (в) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 72. В одному аспекті винаходом забезпечене антитіло, що включає принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності VH HVR, вибрані з (а) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66; (б) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68; та (в) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 73. В одному із варіантів виконання антитіло включає HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 71 або 72 або 73. В одному із варіантів виконання антитіло включає HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 71 або 72 або 73, та HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78. В одному із варіантів виконання антитіло включає HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 71 або 72 або 73, HVR-L3, що включає амінокислотну

послідовність SEQ ID NO: 78, та HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68. У подальшому варіанті виконання антитіло включає (а) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66; (б) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68; та (в) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 72.

В іншому аспекті винаходом забезпечене антитіло, що включає принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності VL HVR, вибрані з (а) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75; (б) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76; та (в) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78. В одному із варіантів виконання антитіло включає (а) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75; (б) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76; та (в) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78.

В іншому аспекті антитіло згідно винаходу включає (а) домен VH, що включає принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності VH HVR, вибрані з (I) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66, (II) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68, та (III) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 71 або 72 або 73, та (б) домен VL, що включає принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності VL HVR, вибрані з (I) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75, (II) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76, та (в) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78.

В іншому аспекті винаходом забезпечене антитіло, яке включає (а) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66; (б) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68; (в) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 72; (г) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75; (д) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76; та (е) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 78.

В будь-якому з вищеперелічених варіантів виконання антитіло до рецептора трансферину гуманізоване. В одному із варіантів виконання антитіло до рецептора трансферину включає HVR згідно будь-якого з вищеперелічених варіантів виконання і додатково включає акцепторну каркасну ділянку людини, напр., каркасну ділянку імуноглобуліну людини або консенсусну каркасну ділянку людини.

В іншому аспекті антитіло до рецептора трансферину включає послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH), яка принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 24, та має приблизно таку саму швидкість дисоціації, що й антитіло, яке включає послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH) за SEQ ID NO: 24. У певних варіантах виконання VH-послідовність, ідентична принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або на 99 %, містить заміщення (напр., консервативні заміщення), інсерції або делеції відносно еталонної послідовності, однак антитіло до рецептора трансферину, що включає таку послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з рецептором трансферину з такою ж швидкістю дисоціації. У певних варіантах виконання в SEQ ID NO: 24 заміщено, вставлено і/або видалено всього від 1 до 10 амінокислот. У певних варіантах виконання заміщення, інсерції або делеції відбуваються у ділянках поза HVR (тобто у FR). Антитіло до рецептора трансферину необов'язково включає VH-послідовність за SEQ ID NO: 24, включно з посттрансляційними модифікаціями цієї послідовності. У конкретному варіанті виконання VH включає одну, дві або три HVR, вибрані з: (а) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66, (б) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68, та (в) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 72.

В іншому аспекті надане антитіло до рецептора трансферину, де антитіло включає послідовність варіабельного домену легкого ланцюга (VL), яка принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 37, та має приблизно таку саму швидкість дисоціації, що й антитіло, яке включає послідовність варіабельного домену легкого ланцюга (VL) за SEQ ID NO: 37. У певних варіантах виконання VL-послідовність, ідентична принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або на 99 %, містить заміщення (напр., консервативні заміщення), інсерції або делеції відносно еталонної послідовності, однак антитіло до рецептора трансферину, що включає таку послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з рецептором трансферину з такою ж швидкістю дисоціації. У певних варіантах виконання в SEQ ID NO: 37 заміщено, вставлено і/або видалено всього від 1 до 10 амінокислот. У певних варіантах виконання заміщення, інсерції або делеції відбуваються у ділянках поза HVR (тобто у FR). Антитіло до рецептора трансферину необов'язково включає VL-послідовність за SEQ ID NO: 37, включно з посттрансляційними модифікаціями цієї послідовності. У конкретному варіанті виконання VL включає одну, дві або три HVR, вибрані з: (а) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75; (б) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76; та (в) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78.

В іншому аспекті надане антитіло до рецептора трансферину, де антитіло включає VH за будь-яким з вищевикладених варіантів виконання та VL за будь-яким з вищевикладених варіантів виконання. В одному з варіантів виконання антитіло включає VH- та VL-послідовності за SEQ ID NO: 24 та SEQ ID NO: 37, відповідно, включно з посттрансляційними модифікаціями цих послідовностей.

У подальшому аспекті винаходу антитіло до рецептора трансферину за будь-яким з вищевикладених варіантів виконання є моноклональним антитілом, включно з химерним, гуманізованим або людським антитілом. В одному із варіантів виконання антитіло до рецептора трансферину є фрагментом антитіла, напр., Fv, Fab, Fab", scFv, діатілом або фрагментом F(ab")₂. В іншому варіанті виконання антитіло є повнорозмірним антитілом, напр., інтактним антитілом IgG1 або іншого класу чи ізотипу згідно наданого тут визначення.

В одному з варіантів виконання всіх аспектів антитіло приєднане до лікарської сполуки.

В одному з варіантів виконання всіх аспектів антитіло приєднане до засобу отримання зображень або мітки.

В іншому варіанті виконання антитіло є мультиспецифічним антитілом, і лікарська сполука необов'язково утворює одну з частин мультиспецифічного антитіла. В одному з таких варіантів виконання мультиспецифічне антитіло включає перший антигензв'язувальний сайт, що зв'язується з TfR, і другий антигензв'язувальний сайт, що зв'язується з мозковим антигеном. В одному з таких аспектів мозковий антиген вибраний з групи, яка складається з: бета-секретази 1 (BACE1), Abeta, рецептора епідермального фактору росту (EGFR), рецептора епідермального фактору росту людини 2 (HER2), тау-білка, аполіпопротеїну E (ApoE), альфа-синуклеїну, CD20, гантінгіну, пріонового білка (PrP), багаті на лейцинові повтори кінази 2 (LRRK2), паркіну, пресеніліну 1, пресеніліну 2, гамма-секретази, рецептора смерті 6 (DR6), білка-попередника амілоїду (APP), рецептора нейротрофіну р75 (р75NTR), глюкоцереброзидази і каспази 6. В іншому варіанті виконання мультиспецифічне антитіло зв'язується як з TfR, так і з BACE1. В іншому варіанті виконання мультиспецифічне антитіло зв'язується як з TfR, так і з Abeta. В іншому варіанті виконання мультиспецифічне антитіло зв'язується як з TfR, так і з альфа-синуклеїном. В іншому варіанті виконання мультиспецифічне антитіло зв'язується як з TfR, так і з CD20. В іншому варіанті виконання мультиспецифічне антитіло зв'язується як з TfR, так і з глюкоцереброзидазою. В іншому варіанті виконання лікарська сполука є лікарським засобом від неврологічного порушення.

В одному з аспектів вищезазначеного варіанта виконання винаходом забезпечений фармацевтичний склад, що включає будь-яке із вищезгаданих антитіл та фармацевтично прийнятний носій.

В одному з аспектів вищезазначеного варіанта виконання винаходом забезпечене будь-яке із вищезгаданих антитіл для застосування як лікарського засобу.

В іншому аспекті вищезазначеного варіанта виконання винаходом забезпечене застосування будь-якого із вищезгаданих антитіл для виробництва лікарського засобу для лікування неврологічного порушення. В одному із варіантів виконання неврологічне порушення вибране з групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, порушення захворювання очей, розладу, що супроводжується судомами, хвороби лізосомного накопичення, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, поведінкового розладу та запалення ЦНС.

В іншому аспекті вищезазначеного варіанта виконання винаходом забезпечене будь-яке із вищезгаданих антитіл для застосування у лікуванні неврологічного порушення. В одному із варіантів виконання неврологічне порушення вибране з групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, порушення захворювання очей, розладу, що супроводжується судомами, хвороби лізосомного накопичення, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, поведінкового розладу та запалення ЦНС.

В іншому аспекті вищезазначеного варіанта виконання винаходом забезпечене будь-яке із вищезгаданих антитіл для застосування у транспортуванні однієї або більше сполук через ГЕБ.

В іншому аспекті вищезазначеного варіанта виконання забезпечене застосування будь-якого із вищезгаданих антитіл у виробництві лікарського засобу для транспортування однієї або більше сполук через ГЕБ.

В одному з аспектів вищезазначеного варіанта виконання забезпечено спосіб транспортування сполуки через ГЕБ суб'єкта, який включає піддавання будь-якого із вищезгаданих антитіл дії ГЕБ таким чином, що антитіло переносить приєднану до нього сполуку через ГЕБ. В одному з варіантів виконання ГЕБ знаходиться у суб'єкта-людини. В одному з варіантів виконання антитіло, приєднане до сполуки, вводять у терапевтичній дозі. В одному з варіантів виконання терапевтична доза є такою, що насичує TfR. В іншому варіанті виконання антитіло вводять в дозі і/або з частотою введення дози, підбраною так, щоб мінімізувати гострі клінічні симптоми введення антитіла.

В іншому аспекті вищезазначеного варіанта виконання забезпечено спосіб підвищення експозиції ЦНС суб'єкта до сполуки, який включає піддавання будь-якого із вищезгаданих антитіл дії ГЕБ таким чином, що антитіло переносить приєднану до нього сполуку через ГЕБ. В одному з варіантів виконання ГЕБ знаходиться у суб'єкта-людини. В одному з варіантів виконання антитіло, приєднане до

сполуки, вводять у терапевтичній дозі. В одному з варіантів виконання терапевтична доза є такою, що насичує TfR. В іншому варіанті виконання антитіло вводять в дозі і/або з частотою введення дози, підбраною так, щоб мінімізувати гострі клінічні симптоми введення антитіла.

В одному з аспектів вищезазначеного варіанта виконання забезпечено спосіб підвищення утримання введеної суб'єктові сполуки в ЦНС, який включає піддавання будь-якого із вищезгаданих антитіл дії ГЕБ таким чином, що утримання сполуки в ЦНС підвищується. В одному з варіантів виконання антитіло, приєднане до сполуки, вводять у терапевтичній дозі. В одному з варіантів виконання терапевтична доза є такою, що насичує TfR. В іншому варіанті виконання антитіло вводять в дозі і/або з частотою введення дози, підбраною так, щоб мінімізувати гострі клінічні симптоми введення антитіла.

В одному з аспектів вищезазначеного варіанта виконання забезпечено спосіб лікування неврологічного порушення у ссавця, який включає лікування ссавця будь-яким із вищезгаданих антитіл. В одному із варіантів виконання неврологічне порушення вибрано з групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, порушення захворювання очей, розладу, що супроводжується судомами, хвороби лізосомного накопичення, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, поведінкового розладу та запалення ЦНС. В одному з варіантів виконання неврологічне порушення виникає у суб'єкта-людини. В одному з варіантів виконання антитіло, приєднане до сполуки, вводять у терапевтичній дозі. В одному з варіантів виконання терапевтична доза є такою, що насичує TfR. В іншому варіанті виконання антитіло вводять в дозі і/або з частотою введення дози, підбраною так, щоб мінімізувати гострі клінічні симптоми введення антитіла.

В одному з варіантів виконання антитіло модифіковане за однією або більше властивостей, вибраних з ефекторної функції Fc-ділянки антитіла, функції активації комплементу антитілом, а також афінності антитіла до TfR.

В одному з варіантів виконання властивість є ефекторною функцією Fc-ділянки антитіла.

В одному з варіантів виконання властивість є функцією активації комплементу антитілом.

В одному з варіантів виконання властивість є афінністю антитіла до TfR.

В одному з варіантів виконання ефекторна функція або функція активації комплементу зменшені або усунені порівняно з антитілом того ж ізотипу дикого типу. В одному з варіантів виконання ефекторна функція зменшена або усунена методом, вибраним зі зниження глікозилування антитіла, модифікації ізотипу антитіла до ізотипу, який має природно знижену або усунену ефекторну функцію, а також модифікації Fc-ділянки.

В одному з варіантів виконання ефекторна функція зменшена або усунена зниженням глікозилування антитіла. В одному з варіантів виконання глікозилування антитіла знижують методом, вибраним з: продукування антитіла у середовищі, яке унеможливорює дикотипне глікозилування; видалення вже наявних у антитіла вуглеводневих груп; а також модифікації антитіла таким чином, щоб дикотипне глікозилування не відбувалося.

В одному з варіантів виконання глікозилування антитіла знижують методом продукування антитіла у середовищі, яке унеможливорює дикотипне глікозилування, таким як продукування у системі клітин-продуцентів, які не є клітинами ссавців, або ж синтетичне продукування антитіла. В одному з варіантів виконання антитіло продукують у системі клітин-продуцентів, які не є клітинами ссавців. В іншому варіанті виконання антитіло продукують синтетично.

В одному з варіантів виконання глікозилування антитіла знижують методом модифікації антитіла таким чином, щоб дикотипне глікозилування не відбувалося, таким як включення у Fc-ділянку антитіла мутації в положенні 297, так що дикотипний аспарагіновий залишок в цьому положенні заміщується іншою амінокислотою, яка перешкоджає глікозилуванню в цьому положенні.

В одному з варіантів виконання ефекторна функція зменшена або усунена принаймні однією модифікацією Fc-ділянки. В одному з варіантів виконання ефекторна функція або функція активації комплементу зменшені або усунені делецією всієї Fc-ділянки або її частини, або ж конструюванням такого антитіла, яке не містить Fc-ділянки чи ділянки, що відрізняється від Fc-ділянки і компетентна для ефекторної функції або функції активації комплементу. В одному з варіантів виконання принаймні одна модифікація Fc-ділянки вибрана з: точкової мутації Fc-ділянки з метою погіршити зв'язування з одним або більше Fc-рецепторами, вибраної з наступних положень: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 30 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 та 439; точкової мутації Fc-ділянки з метою погіршити зв'язування з C1q, вибраної з наступних положень: 270, 322, 329 та 321; усунення всієї Fc-ділянки або її частини, і точкової мутації в положенні 132 домену CH1. В одному з варіантів виконання модифікація є точковою мутацією Fc-ділянки з метою погіршити зв'язування з C1q, вибраною з наступних положень: 270, 322, 329 та 321. В іншому варіанті виконання модифікація є усуненням всієї Fc-ділянки або її частини. В іншому варіанті виконання функція приведення комплементу в дію зменшена або усунена делецією всієї Fc-ділянки або її частини, або ж конструюванням такого антитіла, яке не містить Fc-ділянки, яка бере участь у шляху комплементу. В

одному з варіантів виконання антитіло вибрано з Fab або одноланцюгового антитіла. В іншому варіанті виконання ділянку антитіла, що відрізняється від Fc-ділянки, модифікують з метою зменшення або усунення активації антитілом шляху комплементу. В одному з варіантів виконання модифікація є точковою мутацією ділянки СН1 з метою погіршити зв'язування з С3. В одному з варіантів виконання точкова мутація знаходиться у положенні 132 (див., напр., Vidarte та ін., J. Biol. Chem. 276 (2001) 38217-38223).

В одному з аспектів вищезазначеного варіанта виконання знижують афінність антитіла до TfR порівняно з дикотипним антитілом того ж ізо типу, афінність якого до TfR не знижена. В одному такому аспекті антитіло має K_D або IC_{50} для TfR від приблизно 1 пМ до приблизно 100 мкМ.

В одному із варіантів виконання в антитіла згідно даного опису вимкнена ефекторна функція. В одному з варіантів виконання антитіло не має ефекторної функції. В одному з варіантів виконання антитіло належить до підкласу людських IgG1 і має в обох важких ланцюгах мутації L234A, L235A та P329G (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

В одному з варіантів виконання антитіло є

а) повнорозмірним антитілом підкласу IgG1 людини, або

б) повнорозмірним антитілом підкласу IgG4 людини, або

в) повнорозмірним антитілом підкласу IgG1 людини з мутаціями L234A, L235A та P329G,

г) повнорозмірним антитілом підкласу IgG4 людини з мутаціями S228P, L235E та необов'язково P329G,

г) повнорозмірним антитілом підкласу IgG1 людини з мутаціями L234A, L235A та P329G в обох важких ланцюгах, а також мутаціями T366W і S354C в одному з важких ланцюгів та мутаціями T366S, L368A, Y407V і Y349C у відповідному іншому важкому ланцюзі, або

д) повнорозмірним антитілом підкласу IgG4 людини з мутаціями S228P і необов'язково P329G в обох важких ланцюгах, а також мутаціями T366W і S354C в одному з важких ланцюгів та мутаціями T366S, L368A, Y407V і Y349C у відповідному іншому важкому ланцюзі.

В одному з аспектів вищезазначеного варіанта виконання винаходом забезпечений фармацевтичний склад, що включає будь-яке із вищезгаданих антитіл та фармацевтично прийнятний носій.

В одному з аспектів вищезазначеного варіанта виконання винаходом забезпечено будь-яке із вищезгаданих антитіл для застосування як лікарського засобу.

В іншому аспекті вищезазначеного варіанта виконання винаходом забезпечено застосування будь-якого із вищезгаданих антитіл для виробництва лікарського засобу для лікування неврологічного порушення. В одному із варіантів виконання неврологічне порушення вибрано з групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, порушення захворювання очей, розладу, що супроводжується судомами, хвороби лізосомного накопичення, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, поведінкового розладу та запалення ЦНС.

В іншому аспекті вищезазначеного варіанта виконання винаходом забезпечено будь-яке із вищезгаданих антитіл для застосування у лікуванні неврологічного порушення. В одному із варіантів виконання неврологічне порушення вибрано з групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, порушення захворювання очей, розладу, що супроводжується судомами, хвороби лізосомного накопичення, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, поведінкового розладу та запалення ЦНС.

В іншому аспекті вищезазначеного варіанта виконання винаходом забезпечено будь-яке із вищезгаданих антитіл для застосування у транспортуванні однієї або більше сполук через ГЕБ.

В іншому аспекті вищезазначеного варіанта виконання забезпечено застосування будь-якого із вищезгаданих антитіл у виробництві лікарського засобу для транспортування однієї або більше сполук через ГЕБ.

В одному з аспектів вищезазначеного варіанта виконання забезпечено спосіб транспортування сполуки через ГЕБ суб'єкта, який включає піддавання будь-якого із вищезгаданих антитіл дії ГЕБ таким чином, що антитіло переносить приєднану до нього сполуку через ГЕБ. В одному з варіантів виконання ГЕБ знаходиться у суб'єкта-людини. В одному з варіантів виконання антитіло, приєднане до сполуки, вводять у терапевтичній дозі. В одному з варіантів виконання терапевтична доза є такою, що насичує TfR. В іншому варіанті виконання антитіло вводять в дозі і/або з частотою введення дози, підбраною так, щоб мінімізувати гострі клінічні симптоми введення антитіла.

В іншому аспекті вищезазначеного варіанта виконання забезпечено спосіб підвищення експозиції ЦНС суб'єкта до сполуки, який включає піддавання будь-якого із вищезгаданих антитіл дії ГЕБ таким чином, що антитіло переносить приєднану до нього сполуку через ГЕБ. В одному з варіантів виконання ГЕБ знаходиться у суб'єкта-людини. В одному з варіантів виконання антитіло, приєднане до сполуки, вводять у терапевтичній дозі. В одному з варіантів виконання терапевтична доза є такою, що насичує TfR. В іншому варіанті виконання антитіло вводять в дозі і/або з частотою введення дози, підбраною так, щоб мінімізувати гострі клінічні симптоми введення антитіла.

В одному з аспектів вищезазначеного варіанта виконання забезпечено спосіб підвищення

утримання введеної суб'єктові сполуки в ЦНС, який включає піддавання будь-якого із вищезгаданих антитіл дії ГЕБ таким чином, що утримання сполуки в ЦНС підвищується. В одному з варіантів виконання ГЕБ знаходиться у суб'єкта-людини. В одному з варіантів виконання антитіло, приєднане до сполуки, вводять у терапевтичній дозі. В одному з варіантів виконання терапевтична доза є такою, що насичує TfR. В іншому варіанті виконання антитіло вводять в дозі і/або з частотою введення дози, підбраною так, щоб мінімізувати гострі клінічні симптоми введення антитіла.

В одному з аспектів вищезазначеного варіанта виконання забезпечено спосіб лікування неврологічного порушення у ссавця, який включає лікування ссавця будь-яким із вищезгаданих антитіл. В одному із варіантів виконання неврологічне порушення вибране з групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, порушення захворювання очей, розладу, що супроводжується судомами, хвороби лізосомного накопичення, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, поведінкового розладу та запалення ЦНС. В іншому подібному аспекті неврологічне порушення виникає у суб'єкта-людини. В одному з варіантів виконання антитіло, приєднане до сполуки, вводять у терапевтичній дозі. В одному з варіантів виконання терапевтична доза є такою, що насичує TfR. В іншому варіанті виконання антитіло вводять в дозі і/або з частотою введення дози, підбраною так, щоб мінімізувати гострі клінічні симптоми введення антитіла.

В іншому варіанті виконання забезпечено спосіб зниження кліренсу введеної суб'єктові сполуки, в якому сполуку приєднують до антитіла, яке низькоафінно зв'язується з TfR, таким чином, що кліренс сполуки знижується.

В іншому варіанті виконання забезпечено спосіб оптимізації фармакокінетики і/або фармакодинаміки сполуки задля її ефективності у ЦНС суб'єкта, де сполуку приєднують до антитіла, яке низькоафінно зв'язується з TfR, а антитіло обирають таким чином, щоб його афінність до TfR після приєднання до сполуки призводила до транспорту через ГЕБ такої кількості антитіла, скон'югованого зі сполукою, яка була б оптимальною для фармакокінетики і/або фармакодинаміки сполуки у ЦНС.

У подальшому аспекті антитіло до рецептора трансферину за будь-яким із вищеперелічених аспектів та варіантів виконання може включати будь-яку з ознак, окремо або в комбінації, описаних у Розділах 1-5 нижче:

1. Афінність антитіла

В одному з варіантів виконання Kd вимірюють аналізом зв'язування з радіоміченим антигеном (PIA). В одному з варіантів виконання PIA виконують з Fab-версією досліджуваного антитіла та його антигеном. Наприклад, афінність зв'язування Fab з антигеном у розчині вимірюють врівноваженням Fab з мінімальною концентрацією міченого ¹²⁵I антигену у присутності титрувальних серійних розведень неміченого антигену з наступним захопленням зв'язаного антигену на планшеті, вкритому антитілом до Fab (див, напр., Chen, Y. та ін., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Для створення умов аналізу багатолункові планшети MICROTITER® (Thermo Scientific) вкривали, залишаючи на ніч, 5 мкг/мл захоплювального антитіла до Fab (Cappel Labs) у 50 мМ карбонату натрію (pH 9,6) з наступним блокуванням за допомогою 2 % (мас./об.) бичачого сироваткового альбуміну у ФСБ протягом від двох до п'яти годин при кімнатній температурі (приблизно 23 °C). На неадсорбуючому планшеті (Nunc #269620) змішували 100 пМ або 26 пМ [¹²⁵I]-антигену і серійні розведення досліджуваного Fab (напр., сумісного з оцінкою антитіла до VEGF, Fab-12, у Presta, L.G. та ін., Cancer Res. 57 (1997) 4593-4599). Тоді досліджуваний Fab інкубували протягом ночі; однак період інкубації могли продовжити (напр., до приблизно 65 годин), щоб гарантувати встановлення рівноваги. Потім суміші переносили на захоплювальний планшет для інкубації при кімнатній температурі (напр., протягом години). Розчин видаляли і планшет промивали вісім разів 0,1 %-вим полісорбатом 20 (TWEEN-20®) у ФСБ. Коли планшети висохли, додали 150 мкл/лунку сцинтилятора (MICROSCINT-20™; Packard) і обраховували планшети на гамма-лічильнику TOPCOUNT™ (Packard) протягом 10 хвилин. Концентрації кожного Fab, що давали менше або дорівнювали 20 % від максимального зв'язування, відбирали для використання у аналізах конкурентного зв'язування.

Згідно іншого варіанта виконання Kd вимірюють за допомогою аналізу поверхневого плазмонного резонансу BIACORE®. Наприклад, аналіз за допомогою BIACORE®-2000 або BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Піскатавей, NJ) виконують при 25 °C з антигеном, іммобілізованим на чіпах CM5 з ~10 одиниць відповіді (ОВ). В одному з варіантів виконання біосенсорні чіпи з карбоксиметильованого декстрану (CM5, BIACORE, Inc.) активують за допомогою N-етил-N'- (3-диметиламінопропіл)-карбодіміду гідрохлориду (ЕДК) та N-гідроксисукциніміду (НГС) згідно інструкцій постачальника. Антиген розводять у 10 мМ ацетату натрію, pH 4,8, до концентрації 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед введенням на швидкості потоку 5 мкл/хв для одержання приблизно 10 одиниць відповіді (ОВ) приєданого білка. Після введення антигену вводять 1 М етаноламін для блокування груп, що не прореагували. Для кінетичних вимірювань вводять серійні розведення вдвічі Fab (від 0,78 нМ до 500 нМ) у ФСБ з 0,05 % поверхнево-активної речовини полісорбату 20 (TWEEN-20™) (ФСБТ) при 25 °C на швидкості потоку приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (k_{on}) та дисоціації (k_{off}) обчислюють з використанням простої моделі зв'язування Ленгмюра 1:1 (BIACORE® Evaluation Software версії 3.2) шляхом одночасної обробки сенсограм асоціації та дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (KD) обчислюють як відношення

k_{off}/k_{on} (див, напр., Chen, Y. та ін., *J. Mol. Biol.* 293 (1999) 865-881). Якщо швидкість асоціації у вищеописаному аналізі поверхневого плазмонного резонансу перевищує $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, то швидкість асоціації можна визначити за допомогою техніки гасіння флуоресценції, яка вимірює зростання або зменшення інтенсивності флуоресцентного випромінювання (збудження = 295 нм; емісія = 340 нм, смуга пропускання 16 нм) при 25 °C 20 нМ антитіла до антигену (Fab-форма) у ФСБ, pH 7,2, у присутності підвищуваних концентрацій антигену згідно вимірювань на спектрометрі, такому як спектрофотометр з зупинкою потоку (Aviv Instruments) або спектрофотометр SLM-AMINCO™ серії 8000 (ThermoSpectronic) з перемішуваною кюветою.

2. Фрагменти антитіла

У певних варіантах виконання забезпечене тут антитіло є фрагментом антитіла. Фрагменти антитіла включають, але не обмежуються ними, фрагменти Fab, Fabⁿ, Fab'-SH, F(abⁿ)₂, Fv та scFv, а також інші фрагменти, описані нижче. Для огляду деяких фрагментів антитіла див. Hudson, P.J. та ін., *Nat. Med.* 9 (2003) 129-134. Для огляду фрагментів scFv див., напр., Plueckthun, A., у; *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Т. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, Нью-Йорк (1994), с. 269-315; див. також WO 93/16185; US 5,571,894 та US 5,587,458. Для обговорення фрагментів Fab та F(abⁿ)₂, що включають залишки епітопу зв'язування рецептора реутилізації та мають продовжений період напівжиття *in vivo*, див. US 5,869,046.

Діатіла - це фрагменти антитіла з двома антигензв'язувальними сайтами, які можуть бути бівалентними або біспецифічними. Див., наприклад, EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. та ін., *Nat. Med.* 9 (2003) 129-134; та Holliger, P. та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448. Тріатіла і тетратіла також описані в Hudson, P.J. та ін., *Nat. Med.* 9 (2003) 129-134.

Однодоменні антитіла є фрагментами антитіла, що включають весь варіабельний домен важкого ланцюга антитіла або його частину, або ж весь варіабельний домен легкого ланцюга антитіла або його частину. У певних варіантах виконання однодоменне антитіло є людським однодоменним антитілом (Domantis, Inc., Волтгем, MA; див., напр., US 6,248,516).

Фрагменти антитіла можна одержати різноманітними техніками, включаючи, але не обмежуючись ними, протеолітичне розщеплення інтактного антитіла, а також продукування в рекомбінантних клітинах-хазяях (напр., *E. coli* або фаг) згідно наданого тут опису.

3. Химерні та гуманізовані антитіла

У певних варіантах виконання забезпечене тут антитіло є химерним антитілом. Певні химерні антитіла описані, напр., у US 4,816,567; а також Morrison, S.L. та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855). В одному з прикладів химерне антитіло включає варіабельну ділянку, що походить не від людини (напр., варіабельну ділянку, яка походить від миші, щура, хом'яка, кроля або примата, який не є людиною, такого як мавпа), і людську константну ділянку. У ще одному прикладі химерне антитіло є антитілом з "перемкнутим класом", в якого змінили клас або підклас батьківського антитіла. Химерні антитіла охоплюють свої антигензв'язувальні фрагменти.

У певних варіантах виконання химерне антитіло є гуманізованим антитілом. Зазвичай антитіло, яке походить не від людини, гуманізують з метою зниження імуногенності в людей при одночасному збереженні специфічності та афінності батьківського не-людського антитіла. Як правило, гуманізоване антитіло включає один або більше варіабельних доменів, у яких HVR, напр., CDR, (або їх частини), походять від не-людського антитіла, а FR (або їх частини походять від послідовностей людського антитіла. Гуманізоване антитіло може також необов'язково включати принаймні частину людської константної ділянки. У деяких варіантах виконання деякі залишки FR у гуманізованому антитілі заміщені відповідними залишками не-людського антитіла (напр., антитіла, з якого походять залишки HVR), напр., з метою відновити або покращити специфічність чи афінність антитіла.

Гуманізовані антитіла та способи їх одержання оглянуті, напр., в Almagro, J.C. та Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633, та додатково описані, напр., у Riechmann, I. та ін., *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C. та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033; US 5, 821,337, US 7,527,791, US 6,982,321 та US 7,087,409; Kashmiri, S.V. та ін., *Methods* 36 (2005) 25-34 (описана пересадка ділянки, яка визначає специфічність (SDR)); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (описана "перекладка"); Dall'Acqua, W.F. та ін., *Methods* 36 (2005) 43-60 (описане "перетасування FR"); а також Osbourn, J. та ін., *Methods* 36 (2005) 61-68 та Klimka, A. та ін., *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (описаний підхід "керованого відбору" до перетасування FR).

Людські каркасні ділянки, які можна використати для гуманізації, включають, але не обмежуються ними: каркасні ділянки, вибрані методом максимальної відповідності (див., напр., Sims, M.J. та ін., *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308; каркасні ділянки, що є похідними консенсусної послідовності людських антитіла, що належать до певної підгрупи за варіабельними ділянками легких або важких ланцюгів (див., напр., Carter, P. та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; і Presta, L.G. та ін., *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632); людські дозрілі (соматично мутовані) каркасні ділянки або каркасні ділянки людської зародкової лінії (див., напр., Almagro, J.C. та Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633); а також каркасні ділянки, одержані шляхом скринінгу бібліотек FR (див., напр., Vasa, M. та ін., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 і Rosok, M.J. та ін., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618).

4. Мультиспецифічні антитіла

У певних варіантах виконання надане тут антитіло є мультиспецифічним антитілом, напр., біспецифічним антитілом. Мультиспецифічні антитіла – це моноклональні антитіла, що володіють специфічністю зв'язування принаймні до двох різних сайтів. У деяких варіантах виконання одна зі специфічностей зв'язування призначена для рецептора трансферину, а інша - для будь-якого іншого антигена. Біспецифічні антитіла можуть також застосовуватись для локалізації цитотоксичних агентів у клітинах, які експресують рецептор трансферину. Біспецифічні антитіла можна виготовити як повнорозмірні антитіла або фрагменти антитіл.

Технології виготовлення мультиспецифічних антитіл включають, але не обмежуються ними, рекомбінантну співекспресію двох імуноглобулінових пар важкий ланцюг-легкий ланцюг, які мають різну специфічність (див. Milstein, C. та Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540, WO 93/08829, а також Traunecker, A. та ін., EMBO J. 10 (1991) 3655-3659), та конструкцію "виступ-у-отвір" (див., напр., US 5,731,168). Мультиспецифічні антитіла також можна створити шляхом проектування електростатичних напрямних ефектів для утворення Fc-гетеродимерних молекул антитіл (WO 2009/089004); поперечного зшивання двох або більше антитіл або їх фрагментів (див., напр., US 4,676,980 і Brennan, M. та ін., Science 229 (1985) 81-83); використання лейцинових застібок для одержання біспецифічних антитіл (див., напр., Kostelny, S.A. та ін., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553; використання технології "діатіл" для одержання біспецифічних фрагментів антитіл (див., напр., Holliger, P. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448); використання димерів одноланцюгових Fv (scFv) (див., напр. Gruber, M та ін., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374); а також одержання триспецифічних антитіл, як описано, напр., у Tutt, A. та ін., J. Immunol. 147 (1991) 60-69).

Тут також охоплені антитіла, сконструйовані з трьома або більше функціональними сайтами зв'язування, включно з "антитілами-восьминогами" (див., напр., US 2006/0025576).

Антитіло або його фрагмент тут і далі також охоплюють "Fab подвійної дії", або "DAF", яке включає антигензв'язувальний сайт, що зв'язується з рецептором трансферину, а також з іншим, відмінним антигеном (див., наприклад, US 2008/0069820).

Антитіло або його фрагмент тут і далі також охоплюють мультиспецифічні антитіла, описані в WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 та WO 2010/145793.

В одному з варіантів виконання всіх описаних тут аспектів антитіло до рецептора трансферину є біспецифічним антитілом.

Одним з описаних тут аспектів є бівалентне, біспецифічне антитіло, яке включає

а) перший легкий ланцюг та перший важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном; та

б) другий легкий ланцюг та другий важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, і при цьому варіабельні домени VL та VH у другому легкому ланцюзі та другому важкому ланцюзі другого антитіла взаємозаміннені,

де перший антиген або другий антиген є рецептором трансферину людини.

Антитіло за пунктом а) не містить модифікації, описаної в пункті б), і важкий та легкий ланцюги за пунктом а) є ізольованими ланцюгами.

В антитілі за пунктом б)

у легкому ланцюзі

варіабельний домен легкого ланцюга VL замінений варіабельним доменом важкого ланцюга VH зазначеного антитіла,

та

у важкому ланцюзі

варіабельний домен важкого ланцюга VL замінений варіабельним доменом легкого ланцюга VH зазначеного антитіла.

В одному з варіантів виконання

I) в константному домені CL першого легкого ланцюга при а) амінокислота в положенні 124 (нумерація згідно Kabat) заміщена позитивно зарядженою амінокислотою, і де в константному домені CH1 першого важкого ланцюга при а) амінокислота в положенні 147 або амінокислота в положенні 213 (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat) заміщена негативно зарядженою амінокислотою, або

II) в константному домені CL другого легкого ланцюга при б) амінокислота в положенні 124 (нумерація згідно Kabat) заміщена позитивно зарядженою амінокислотою, і де в константному домені CH1 другого важкого ланцюга при б) амінокислота в положенні 147 або амінокислота в положенні 213 (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat) заміщена негативно зарядженою амінокислотою.

В одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу

I) в константному домені CL першого легкого ланцюга при а) амінокислота в положенні 124 незалежно заміщена лізином (K), аргініном (R) або гістидином (H) (нумерація згідно Kabat) (в одному кращому варіанті виконання незалежно лізином (K) або аргініном (R)), і де в константному домені CH1

першого важкого ланцюга при а) амінокислота в положенні 147 або амінокислота в положенні 213 незалежно заміщена глутаміновою кислотою (E) або аспарагіновою кислотою (D) (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat),

або

II) в константному домені CL другого легкого ланцюга при б) амінокислота в положенні 124 незалежно заміщена лізином (K), аргініном (R) або гістидином (H) (нумерація згідно Kabat) (в одному кращому варіанті виконання незалежно лізином (K) або аргініном (R)), і де в константному домені CH1 другого важкого ланцюга при б) амінокислота в положенні 147 або амінокислота в положенні 213 незалежно заміщена глутаміновою кислотою (E) або аспарагіновою кислотою (D) (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

В одному з варіантів виконання в константному домені CL другого важкого ланцюга амінокислоти в положеннях 124 та 123 заміщені K (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

В одному з варіантів виконання в константному домені CH1 другого легкого ланцюга амінокислоти в положеннях 147 та 213 заміщені E (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

В одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, в константному домені CL першого легкого ланцюга амінокислоти в положеннях 124 та 123 заміщені K, а в константному домені CH1 першого важкого ланцюга амінокислоти в положеннях 147 та 213 заміщені E (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

В одному з варіантів виконання в константному домені CL другого важкого ланцюга амінокислоти в положеннях 124 та 123 заміщені K, і при цьому в константному домені CH1 другого легкого ланцюга амінокислоти в положеннях 147 та 213 заміщені E, а також у варіабельному домені VL першого легкого ланцюга амінокислота у положенні 38 заміщена K, у варіабельному домені VH першого важкого ланцюга амінокислота у положенні 39 заміщена E, у варіабельному домені VL другого важкого ланцюга амінокислота у положенні 38 заміщена K, та у варіабельному домені VH другого легкого ланцюга амінокислота у положенні 39 заміщена E (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

Одним з описаних тут аспектів є бівалентне, біспецифічне антитіло, яке включає

а) перший легкий ланцюг та перший важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном; та

б) другий легкий ланцюг та другий важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, і при цьому варіабельні домени VL та VH у другому легкому ланцюзі та другому важкому ланцюзі взаємозамінені, і при цьому константні домени CL та CH1 у другому легкому ланцюзі та другому важкому ланцюзі взаємозамінені,

де перший антиген або другий антиген є рецептором трансферину людини.

Антитіло за пунктом а) не містить модифікації, описаної в пункті б), і важкий та легкий ланцюги за пунктом а) є ізольованими ланцюгами.

В антитілі за пунктом б)

у легкому ланцюзі

варіабельний домен легкого ланцюга VL замінений на варіабельний домен важкого ланцюга VH зазначеного антитіла, а константний домен легкого ланцюга CL замінений на константний домен важкого ланцюга CH1 зазначеного антитіла;

та

у важкому ланцюзі

варіабельний домен важкого ланцюга VH замінений на варіабельний домен легкого ланцюга VL зазначеного антитіла, а константний домен важкого ланцюга CH1 замінений на константний домен легкого ланцюга CL зазначеного антитіла.

Одним з описаних тут аспектів є бівалентне, біспецифічне антитіло, яке включає

а) перший легкий ланцюг та перший важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном; та

б) другий легкий ланцюг та другий важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, і при цьому константні домени CL та CH1 у другому легкому ланцюзі та другому важкому ланцюзі другого антитіла взаємозамінені,

де перший антиген або другий антиген є рецептором трансферину людини.

Антитіло за пунктом а) не містить модифікації, описаної в пункті б), і важкий та легкий ланцюги за пунктом а) є ізольованими ланцюгами.

В антитілі за пунктом б)

у легкому ланцюзі

константний домен легкого ланцюга CL замінений константним доменом важкого ланцюга CH1 зазначеного антитіла;

і у важкому ланцюзі

константний домен важкого ланцюга CH1 замінений константним доменом легкого ланцюга CL зазначеного антитіла;

Одним з описаних тут аспектів є мультиспецифічне антитіло, яке включає

а) повнорозмірне антитіло, яке специфічно зв'язується з першим антигеном та складається з двох важких ланцюгів антитіла і двох легких ланцюгів антитіла, та

б) один, два, три або чотири одноланцюгових Fab-фрагменти, що специфічно зв'язуються з додатковими антигенами в кількості від одного до чотирьох (тобто з другим і/або третім і/або четвертим і/або п'ятим антигеном, більш бажано специфічно зв'язуються з одним додатковим антигеном, тобто з другим антигеном),

де зазначені одноланцюгові Fab-фрагменти за пунктом б) злиті з зазначеним повнорозмірним антитілом за пунктом а) за допомогою пептидного лінкера на С- або N-кінці важкого або легкого ланцюга зазначеного повнорозмірного антитіла.

де перший антиген або один з додаткових антигенів є рецептором трансферину людини.

В одному з варіантів виконання один або два ідентичних одноланцюгових Fab-фрагменти, що зв'язуються з другим антигеном, злиті з зазначеним повнорозмірним антитілом за допомогою пептидного лінкера на С-кінці важких або легких ланцюгів зазначеного повнорозмірного антитіла.

В одному з варіантів виконання один або два ідентичних одноланцюгових Fab-фрагменти, що зв'язуються з другим антигеном, злиті з зазначеним повнорозмірним антитілом за допомогою пептидного лінкера на С-кінці важких ланцюгів зазначеного повнорозмірного антитіла.

В одному з варіантів виконання один або два ідентичних одноланцюгових Fab-фрагменти, що зв'язуються з другим антигеном, злиті з зазначеним повнорозмірним антитілом за допомогою пептидного лінкера на С-кінці легких ланцюгів зазначеного повнорозмірного антитіла.

В одному з варіантів виконання два ідентичних одноланцюгових Fab-фрагменти, що зв'язуються з другим антигеном, злиті з зазначеним повнорозмірним антитілом за допомогою пептидного лінкера на С-кінці кожного з важких або легких ланцюгів зазначеного повнорозмірного антитіла.

В одному з варіантів виконання два ідентичних одноланцюгових Fab-фрагменти, що зв'язуються з другим антигеном, злиті з зазначеним повнорозмірним антитілом за допомогою пептидного лінкера на С-кінці кожного з важких ланцюгів зазначеного повнорозмірного антитіла.

В одному з варіантів виконання два ідентичних одноланцюгових Fab-фрагменти, що зв'язуються з другим антигеном, злиті з зазначеним повнорозмірним антитілом за допомогою пептидного лінкера на С-кінці кожного з легких ланцюгів зазначеного повнорозмірного антитіла.

Одним з описаних тут аспектів є тривалентне, біспецифічне антитіло, яке включає

а) повнорозмірне антитіло, яке специфічно зв'язується з першим антигеном та складається з двох важких ланцюгів антитіла і двох легких ланцюгів антитіла,

б) перший поліпептид, що складається з

ба) варіабельного домену важкого ланцюга антитіла (VH),
або

бб) варіабельного домену важкого ланцюга антитіла (VH) та константного домену 1 антитіла (CH1), причому N-кінець зазначеного першого поліпептиду за допомогою пептидного лінкера злитий з С-кінцем одного з двох важких ланцюгів зазначеного повнорозмірного антитіла,

в) другий поліпептид, що складається з

ва) варіабельного домену легкого ланцюга антитіла (VL),
або

вб) варіабельного домену легкого ланцюга антитіла (VL) та константного домену легкого ланцюга антитіла (CL),

причому N-кінець VL-домену зазначеного другого поліпептиду за допомогою пептидного лінкера злитий з С-кінцем іншого з двох важких ланцюгів зазначеного повнорозмірного антитіла,

та

причому варіабельний домен важкого ланцюга антитіла (VH) першого поліпептиду та варіабельний домен легкого ланцюга антитіла (VL) другого поліпептиду разом утворюють антигензв'язувальний сайт, що специфічно зв'язується з другим антигеном,

та

де перший антиген або другий антиген є рецептором трансферину людини.

В одному з варіантів виконання варіабельний домен важкого ланцюга антитіла (VH) поліпептиду за пунктом б) та варіабельний домен легкого ланцюга антитіла (VL) поліпептиду за пунктом в) з'єднані та стабілізовані міжланцюговим дисульфідним містком, введеним за допомогою дисульфідного зв'язку в наступних положеннях:

I) між положенням 44 варіабельного домену важкого ланцюга та положенням 100 варіабельного домену легкого ланцюга, або

II) між положенням 105 варіабельного домену важкого ланцюга та положенням 43 варіабельного домену легкого ланцюга, або

III) між положенням 101 варіабельного домену важкого ланцюга та положенням 100 варіабельного домену легкого ланцюга (нумерація всюди за покажчиком EU системи Kabat).

Техніки введення неприродних дисульфідних містків для стабілізації описані, напр., в WO 94/029350, Rajagopal, V., та ін., Prot. Eng. (1997) 1453-59; Kobayashi, H., та ін., Nuclear Medicine &

Biology, T. 25, (1998) 387-393; або Schmidt, M., та ін., Oncogene (1999) 18 1711-1721. В одному з варіантів виконання необов'язковий дисульфідний зв'язок між варіабельними доменами поліпептидів за пунктами б) і в) розташований між положенням 44 варіабельного домену важкого ланцюга та положенням 100 варіабельного домену легкого ланцюга. В одному з варіантів виконання необов'язковий дисульфідний зв'язок між варіабельними доменами поліпептидів за пунктами б) і в) розташований між положенням 105 варіабельного домену важкого ланцюга та положенням 43 варіабельного домену легкого ланцюга (нумерація всюди за покажчиком EU системи Kabat). В одному з варіантів виконання перевагу віддають тривалентному біспецифічному антитілу без зазначеної необов'язкової дисульфідної стабілізації між варіабельними доменами VH та VL одноланцюгових фрагментів Fab.

Одним з описаних тут аспектів є триспецифічне або тетраспецифічне антитіло, яке включає

а) перший легкий ланцюг та перший важкий ланцюг повнорозмірного антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном; та

б) другий (модифікований) легкий ланцюг та другий (модифікований) важкий ланцюг повнорозмірного антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, і при цьому варіабельні домени VL та VH взаємозамінені, і/або при цьому константні домени CL та CH1 взаємозамінені, та

в) де від одного до чотирьох антигензв'язувальних пептидів, які специфічно зв'язуються з одним або двома додатковими антигенами (тобто з третім і/або четвертим антигеном), злито за допомогою пептидного лінкера з C- або N-кінцем легких або важких ланцюгів за пунктами а) і/або б),

де перший антиген або другий антиген або один з додаткових антигенів є рецептором трансферину людини.

Антитіло за пунктом а) не містить модифікації, описаної в пункті б), і важкий та легкий ланцюги за пунктом а) є ізольованими ланцюгами.

В одному з варіантів виконання триспецифічне або тетраспецифічне антитіло включає за пунктом в) один або два антигензв'язувальні пептиди, які специфічно зв'язуються з одним або двома додатковими антигенами.

В одному з варіантів виконання антигензв'язувальні пептиди вибрані з групи, що включає scFv-фрагмент та scFab-фрагмент.

В одному з варіантів виконання антигензв'язувальні пептиди являють собою scFv-фрагменти.

В одному з варіантів виконання антигензв'язувальні пептиди являють собою scFab-фрагменти.

В одному з варіантів виконання антигензв'язувальні пептиди злиті з C-кінцем важких ланцюгів за пунктами а) і/або б).

В одному з варіантів виконання триспецифічне або тетраспецифічне антитіло включає за пунктом в) один або два антигензв'язувальні пептиди, які специфічно зв'язуються з одним додатковим антигеном.

В одному з варіантів виконання триспецифічне або тетраспецифічне антитіло включає за пунктом в) два ідентичні антигензв'язувальні пептиди, які специфічно зв'язуються з третім антигеном. В одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, зазначені два ідентичні антигензв'язувальні пептиди обидва злиті з C-кінцем важких ланцюгів за пунктами а) і б) за допомогою одного і того самого пептидного лінкера. В одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, зазначені два ідентичні антигензв'язувальні пептиди являють собою або scFv-фрагмент, або scFab-фрагмент.

В одному з варіантів виконання триспецифічне або тетраспецифічне антитіло включає за пунктом в) два антигензв'язувальні пептиди, які специфічно зв'язуються з третім і четвертим антигенами. В одному з варіантів виконання зазначені два антигензв'язувальні пептиди обидва злиті з C-кінцем важких ланцюгів за пунктами а) і б) за допомогою одного і того самого пептидного лінкера. В одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, зазначені два антигензв'язувальні пептиди являють собою або scFv-фрагмент, або scFab-фрагмент.

Одним з описаних тут аспектів є біспецифічне, тетравалентне антитіло, яке включає

а) два легкі ланцюги і два важкі ланцюги антитіла, які специфічно зв'язуються з першим антигеном (і включають два Fab-фрагменти),

б) два додаткові Fab-фрагменти антитіла, які специфічно зв'язуються з другим антигеном, причому обидва зазначені додаткові Fab-фрагменти злиті за допомогою пептидного лінкера з C- або N-кінцями важких ланцюгів за пунктом а),

та

в якому в Fab-фрагментах були виконані наступні модифікації

I) в обох Fab-фрагментах за пунктом а) або в обох Fab-фрагментах за пунктом б) варіабельні домени VL та VH взаємозамінені, і/або константні домени CL та CH1 взаємозамінені,

або

II) в обох Fab-фрагментах за пунктом а) варіабельні домени VL та VH взаємозамінені, і константні домени CL та CH1 взаємозамінені,

та

в обох Fab-фрагментах за пунктом б) варіабельні домени VL та VH взаємозамінені, або константні

домени CL та CH1 взаємозамінені,

або

III) в обох Fab-фрагментах за пунктом а) варіабельні домени VL та VH взаємозамінені, або константні домени CL та CH1 взаємозамінені,

та

в обох Fab-фрагментах за пунктом б) варіабельні домени VL та VH взаємозамінені, і константні домени CL та CH1 взаємозамінені,

або

IV) в обох Fab-фрагментах за пунктом а) варіабельні домени VL та VH взаємозамінені, і в обох Fab-фрагментах за пунктом б) константні домени CL та CH1 взаємозамінені,

або

V) в обох Fab-фрагментах за пунктом а) константні домени CL та CH1 взаємозамінені, і в обох Fab-фрагментах за пунктом б) варіабельні домени VL та VH взаємозамінені,

де перший антиген або другий антиген є рецептором трансферину людини.

В одному з варіантів виконання зазначені додаткові Fab-фрагменти обидва злиті за допомогою пептидного лінкера або з С-кінцями важких ланцюгів за пунктом а), або з N-кінцями важких ланцюгів за пунктом а).

В одному з варіантів виконання зазначені додаткові Fab-фрагменти обидва злиті з С-кінцями важких ланцюгів за пунктом а) за допомогою пептидного лінкера.

В одному з варіантів виконання зазначені додаткові Fab-фрагменти обидва злиті з N-кінцями важких ланцюгів за пунктом а) за допомогою пептидного лінкера.

В одному з варіантів виконання у Fab-фрагментах виконані наступні модифікації:

I) в обох Fab-фрагментах за пунктом а) або в обох Fab-фрагментах за пунктом б) варіабельні домени VL та VH взаємозамінені,

і/або

константні домени CL та CH1 взаємозамінені.

В одному з варіантів виконання у Fab-фрагментах виконані наступні модифікації:

I) в обох Fab-фрагментах за пунктом а) варіабельні домени VL та VH взаємозамінені,

і/або

константні домени CL та CH1 взаємозамінені.

В одному з варіантів виконання у Fab-фрагментах виконані наступні модифікації:

I) в обох Fab-фрагментах за пунктом а) константні домени CL та CH1 взаємозамінені.

В одному з варіантів виконання у Fab-фрагментах виконані наступні модифікації:

I) в обох Fab-фрагментах за пунктом б) варіабельні домени VL та VH взаємозамінені,

і/або

константні домени CL та CH1 взаємозамінені.

В одному з варіантів виконання у Fab-фрагментах виконані наступні модифікації:

I) в обох Fab-фрагментах за пунктом б) константні домени CL та CH1 взаємозамінені.

Одним з описаних тут аспектів є біспецифічне, тетравалентне антитіло, яке включає:

а) (модифікований) важкий ланцюг першого антитіла, який специфічно зв'язується з першим антигеном та включає першу пару доменів VH-CH1, при цьому до С-кінця зазначеного важкого ланцюга прикріплено за допомогою пептидного лінкера N-кінець другої пари доменів VH-CH1 зазначеного першого антитіла,

б) два легкі ланцюги зазначеного першого антитіла за пунктом а),

в) (модифікований) важкий ланцюг другого антитіла, який специфічно зв'язується з другим антигеном та включає першу пару доменів VH-CL, при цьому до С-кінця зазначеного важкого ланцюга прикріплено за допомогою пептидного лінкера N-кінець другої пари доменів VH-CL зазначеного другого антитіла, і

г) два (модифіковані) легкі ланцюги зазначеного другого антитіла за пунктом в), кожен з яких включає пару доменів CL-CH1,

де перший антиген або другий антиген є рецептором трансферину людини.

Одним з описаних тут аспектів є біспецифічне антитіло, яке включає

а) важкий ланцюг та легкий ланцюг першого повнорозмірного антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном; та

б) важкий ланцюг та легкий ланцюг другого повнорозмірного антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, причому N-кінець важкого ланцюга приєднаний до С-кінця легкого ланцюга пептидним лінкером,

де перший антиген або другий антиген є рецептором трансферину людини.

Антитіло за пунктом а) не містить модифікації, описаної в пункті б), і важкий та легкий ланцюги є ізольованими ланцюгами.

Одним з описаних тут аспектів є біспецифічне антитіло, яке включає

а) повнорозмірне антитіло, яке специфічно зв'язується з першим антигеном та складається з двох

важких ланцюгів антитіла і двох легких ланцюгів антитіла, та

б) Fv-фрагмент, що специфічно зв'язується з другим антигеном та включає домен VH² і домен VL², причому обидва домени поєднані дисульфідним містком,

де або тільки домен VH², або тільки домен VL² злитий за допомогою пептидного лінкера з важким або легким ланцюгом повнорозмірного антитіла, що специфічно зв'язується з першим антигеном, де перший антиген або другий антиген є рецептором трансферину людини.

У біспецифічному антитілі важкі та легкі ланцюги за пунктом а) є ізольованими ланцюгами.

В одному з варіантів виконання інший з доменів VH² або VL² не є злитим за допомогою пептидного лінкера з важким або легким ланцюгом повнорозмірного антитіла, що специфічно зв'язується з першим антигеном.

У всіх описаних тут аспектах перший легкий ланцюг включає домен VL і домен CL, а перший важкий ланцюг включає домен VH, домен CH1, шарнірну ділянку, домен CH2 і домен CH3.

Одним з описаних тут аспектів є біспецифічне тривалентне антитіло, яке включає

а) два Fab-фрагменти, що специфічно зв'язуються з першим антигеном,

б) один CrossFab-фрагмент, який специфічно зв'язується з другим антигеном і в якому домени CH1 і CL взаємозамінені,

в) одну Fc-ділянку, яка включає перший важкий ланцюг Fc-ділянки та другий важкий ланцюг Fc-ділянки,

при цьому С-кінці доменів CH1 двох Fab-фрагментів приєднані до N-кінців поліпептидів важких ланцюгів Fc-ділянки, та

при цьому С-кінець домену CL CrossFab-фрагменту приєднаний до N-кінця домену VH одного з Fab-фрагментів, та

де перший антиген або другий антиген є рецептором трансферину людини.

Одним з описаних тут аспектів є біспецифічне тривалентне антитіло, яке включає

а) два Fab-фрагменти, що специфічно зв'язуються з першим антигеном,

б) один CrossFab-фрагмент, який специфічно зв'язується з другим антигеном і в якому домени CH1 і CL взаємозамінені,

в) одну Fc-ділянку, яка включає перший важкий ланцюг Fc-ділянки та другий важкий ланцюг Fc-ділянки,

при цьому С-кінець домену CH1 першого Fab-фрагменту приєднаний до N-кінця одного з поліпептидів важких ланцюгів Fc-ділянки, та С-кінець домену CL CrossFab-фрагменту приєднаний до N-кінця іншого з поліпептидів важких ланцюгів Fc-ділянки, і

при цьому С-кінець домену CH1 другого Fab-фрагменту приєднаний до N-кінця домену VH першого Fab-фрагменту або до N-кінця домену VH CrossFab-фрагменту, та

де перший антиген або другий антиген є рецептором трансферину людини.

Одним з описаних тут аспектів є біспецифічне антитіло, яке включає

а) повнорозмірне антитіло, яке специфічно зв'язується з першим антигеном та складається з двох важких ланцюгів антитіла і двох легких ланцюгів антитіла, та

б) Fab-фрагмент, що специфічно зв'язується з другим антигеном та включає домен VH² і домен VL², фрагмент важкого ланцюга і фрагмент легкого ланцюга, де

у фрагменті легкого ланцюга

варіабельний домен легкого ланцюга VL² замінений варіабельним доменом важкого ланцюга VH² зазначеного антитіла,

та

у фрагменті важкого ланцюга

варіабельний домен важкого ланцюга VH² замінений варіабельним доменом легкого ланцюга VL² зазначеного антитіла

де Fab-фрагмент важкого ланцюга вставлений між доменом CH1 одного із важких ланцюгів повнорозмірного антитіла та відповідною Fc-ділянкою повнорозмірного антитіла, і N-кінець Fab-фрагменту легкого ланцюга скон'югований із С-кінцем легкого ланцюга повнорозмірного антитіла, що спарений з важким ланцюгом повнорозмірного антитіла, в який вставлений Fab-фрагмент важкого ланцюга, і

де перший антиген або другий антиген є рецептором трансферину людини.

Одним з описаних тут аспектів є біспецифічне антитіло, яке включає

а) повнорозмірне антитіло, яке специфічно зв'язується з першим антигеном та складається з двох важких ланцюгів антитіла і двох легких ланцюгів антитіла, та

б) Fab-фрагмент, що специфічно зв'язується з другим антигеном та включає домен VH² і домен VL², фрагмент важкого ланцюга і фрагмент легкого ланцюга, де

у фрагменті легкого ланцюга

варіабельний домен легкого ланцюга VL² замінений варіабельним доменом важкого ланцюга VH² зазначеного антитіла,

та

у фрагменті важкого ланцюга
варіабельний домен важкого ланцюга VH² замінений варіабельним доменом легкого ланцюга VL²
зазначеного антитіла

де С-кінець важколанцюгового фрагменту Fab-фрагменту скон'югований з N-кінцем одного із
важких ланцюгів повнорозмірного антитіла, і С-кінець легколанцюгового фрагменту Fab-фрагменту
skon'югований з N-кінцем легкого ланцюга повнорозмірного антитіла, що спарений з важким ланцюгом
повнорозмірного антитіла, з яким скон'югований важколанцюговий фрагмент Fab-фрагменту, і

де перший антиген або другий антиген є рецептором трансферину людини.

В одному з варіантів виконання антитіло згідно даного опису є мультиспецифічним антитілом, що
потребує гетеродимеризації принаймні двох важколанцюгових поліпептидів, і при цьому антитіло
специфічно зв'язується з рецептором трансферину людини та другим антигеном, який не є
рецептором трансферину людини.

Описано кілька підходів до СНЗ-модифікацій з метою забезпечення гетеродимеризації, наприклад,
у WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO
2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291,
які включено сюди шляхом посилання. У типових відомих в галузі підходах домен СНЗ першого
важкого ланцюга і домен СНЗ другого важкого ланцюга обидва сконструйовані комплементарним
способом так, щоб важкий ланцюг, який містить один сконструйований домен СНЗ, більше не міг
димеризуватися з іншим важким ланцюгом такої ж структури (напр., перший важкий ланцюг, який
містить сконструйований домен СНЗ, більше не міг димеризуватися з іншим першим важким ланцюгом,
який містить сконструйований домен СНЗ; і другий важкий ланцюг, який містить сконструйований
домен СНЗ, більше не міг димеризуватися з іншим другим важким ланцюгом, який містить
skonструйований домен СНЗ). Таким чином важкий ланцюг, який містить один сконструйований домен
СНЗ, змушений гетеродимеризуватися з іншим важким ланцюгом, який містить домен СНЗ,
skonструйований комплементарним способом. Для цього варіанта виконання винаходу домен СНЗ
першого важкого ланцюга і домен СНЗ другого важкого ланцюга конструюють у комплементарний
спосіб за допомогою амінокислотних заміщень, так що перший важкий ланцюг і другий важкий ланцюг
змушені гетеродимеризуватися, тоді як перший важкий ланцюг і другий важкий ланцюг більше не
здатні гомодимеризуватися (напр., зі стеричних причин).

Інші підходи до забезпечення гетеродимеризації важких ланцюгів, відомі у процитованому вище
рівні техніки та включені в цей опис, розглядаються як різні альтернативи, що використовуються в
мультиспецифічному антитілі згідно винаходу, яке включає "неперехрещену Fab-ділянку", яка
походить від першого антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном, та "перехрещену
Fab-ділянку", яка походить від другого антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у
комбінації з конкретними амінокислотними заміщеннями, описаними вище для винаходу.

Домени СНЗ мультиспецифічного антитіла згідно даного опису можна змінити технологією
"виступів-в-отвори", яка детально описана у кількох прикладах, напр., у WO 96/027011, Ridgway, J.B.,
та ін., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; та Merchant, A.M., та ін., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681. У
цьому способі поверхні взаємодії двох доменів СНЗ змінені таким чином, щоб підвищити
гетеродимеризацію обох важких ланцюгів, що містять ці два домени СНЗ. Кожен із двох доменів СНЗ
(двох важких ланцюгів) може бути "виступом", тоді як інший є "отвором". Введення дисульфідного
містка ще більш стабілізує гетеродимери (Merchant, A.M., та ін., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681;
Atwell, S., та ін., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35) та підвищує їх вихід.

В одному кращому варіанті виконання мультиспецифічне антитіло згідно даного опису включає
мутацію T366W в домені СНЗ "виступаючого ланцюга" і мутації T366S, L368A, Y407V в домені СНЗ
"отвірного ланцюга" (нумерація за покажчиком EU системи Kabat). Також може бути використаний
додатковий дисульфідний місток між доменами СНЗ (Merchant, A.M., та ін., Nature Biotech. 16 (1998)
677-681), напр., введенням мутації Y349C у домен СНЗ "виступного ланцюга"; та мутації E356C або
S354C у домен СНЗ "отвірного ланцюга". Тому в іншому варіанті виконання, якому віддають перевагу,
мультиспецифічне антитіло згідно даного опису містить мутації Y349C та T366W в одному із двох
доменів СНЗ і мутації E356C, T366S, L368A та Y407V в іншому із двох доменів СНЗ; або
мультиспецифічне антитіло згідно даного опису містить мутації Y349C та T366W в одному із двох
доменів СНЗ і мутації S354C, T366S, L368A та Y407V в іншому із двох доменів СНЗ (додаткова мутація
Y349C в одному із доменів СНЗ і додаткова мутація E356C або S354C в іншому домені СНЗ
утворюють міжланцюговий дисульфідний місток) (нумерація за покажчиком EU системи Kabat).

Однак альтернативно або додатково можуть застосовуватися і інші технології "виступів-в-отвори",
як описано у EP 1 870 459 A1. В одному варіанті виконання мультиспецифічне антитіло згідно даного
опису включає мутації R409D та K370E у домені СНЗ "виступного ланцюга" і мутації D399K та E357K у
домені СНЗ "отвірного ланцюга" (нумерація за покажчиком EU системи Kabat).

В одному варіанті виконання мультиспецифічне антитіло згідно даного опису містить мутацію
T366W у домені СНЗ "виступного ланцюга" і мутації T366S, L368A і Y407V у домені СНЗ "отвірного
ланцюга", а також додатково містить мутації R409D та K370E у домені СНЗ "виступного ланцюга" і

мутації D399K та E357K у домені СН3 "отвірного ланцюга" (нумерація за покажчиком ЕУ системи Kabat).

В одному із варіантів виконання мультиспецифічне антитіло згідно даного опису містить мутації Y349C та T366W в одному із двох доменів СН3 і мутації S354C, T366S, L368A та Y407V в іншому із двох доменів СН3; або мультиспецифічне антитіло згідно даного опису містить мутації Y349C та T366W в одному із двох доменів СН3 і мутації S354C, T366S, L368A та Y407V в іншому із двох доменів СН3, а також додатково містить мутації R409D та K370E у домені СН3 "виступного ланцюга" і мутації D399K та E357K у домені СН3 "отвірного ланцюга" (нумерація за покажчиком ЕУ системи Kabat).

Окрім технології "виступів-в-отвори", в галузі відомі й інші техніки модифікації доменів СН3 важких ланцюгів мультиспецифічного антитіла для спонукання до гетеродимеризації. Ці технології, особливо описані в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 і WO 2013/096291, розглядаються тут як альтернативи технології "виступів-в-отвори" в комбінації з описаним тут мультиспецифічним антитілом.

В одному з варіантів виконання мультиспецифічного антитіла згідно даного опису для забезпечення гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла використовують підхід, описаний в EP 1870459. Цей підхід базується на введенні заряджених амінокислот з протилежними зарядами у конкретних положеннях поверхні контакту доменів СН3/СН3 між обома, першим і другим, важкими ланцюгами.

Відповідно, цей варіант виконання стосується мультиспецифічного антитіла згідно даного опису, де у третинній структурі антитіла домен СН3 першого важкого ланцюга і домен СН3 другого важкого ланцюга утворюють поверхню контакту, розташовану між відповідними доменами СН3 антитіла, де кожна з відповідних амінокислотних послідовностей домену СН3 першого важкого ланцюга і домену СН3 другої важкої ланцюга включає набір амінокислот, розташований в межах зазначеної поверхні контакту в третинній структурі антитіла, причому з набору амінокислот, розташованого в межах поверхні контакту в домені СН3 одного важкого ланцюга, перша амінокислота заміщена позитивно зарядженою амінокислотою, і з набору амінокислот, розташованого в межах поверхні контакту в домені СН3 іншого важкого ланцюга, друга амінокислота заміщена негативно зарядженою амінокислотою. Мультиспецифічне антитіло згідно цього варіанту виконання також називають "сконструйоване з СН3(+/-) мультиспецифічне антитіло" (де скорочення "+/-" позначає протилежно заряджені амінокислоти, введені у відповідні домени СН3).

В одному з варіантів виконання вказаного сконструйованого з СН3(+/-) мультиспецифічного антитіла згідно даного опису позитивно заряджена амінокислота вибрана з К, R і Н, а негативно заряджена амінокислота вибрана з Е або D.

В одному з варіантів виконання вказаного сконструйованого з СН3(+/-) мультиспецифічного антитіла згідно даного опису позитивно заряджена амінокислота вибрана з К і R, а негативно заряджена амінокислота вибрана з Е або D.

В одному з варіантів виконання вказаного сконструйованого з СН3(+/-) мультиспецифічного антитіла згідно даного опису позитивно зарядженою амінокислотою є К, а негативно зарядженою амінокислотою є Е.

В одному з варіантів виконання вказаного сконструйованого з СН3(+/-) мультиспецифічного антитіла згідно даного опису в домені СН3 одного важкого ланцюга амінокислота R у положенні 409 заміщена D і амінокислота K у положенні заміщена E, а в домені СН3 іншого важкого ланцюга амінокислота D у положенні 399 заміщена K і амінокислота E у положенні 357 заміщена K (нумерація згідно покажчика ЕУ системи Kabat).

В одному з варіантів виконання мультиспецифічного антитіла згідно даного опису для забезпечення гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла використовують підхід, описаний в WO 2013/157953. В одному з варіантів виконання вказаного мультиспецифічного антитіла згідно даного опису в домені СН3 одного важкого ланцюга амінокислота T у положенні 366 заміщена K, а в домені СН3 іншого важкого ланцюга амінокислота L у положенні 351 заміщена D (нумерація згідно покажчика ЕУ системи Kabat). В іншому варіанті виконання вказаного мультиспецифічного антитіла згідно даного опису в домені СН3 одного важкого ланцюга амінокислота T у положенні 366 заміщена K і амінокислота L у положенні 351 заміщена K, а в домені СН3 іншого важкого ланцюга амінокислота L у положенні 351 заміщена D (нумерація згідно покажчика ЕУ системи Kabat).

В іншому варіанті виконання вказаного мультиспецифічного антитіла згідно даного опису в домені СН3 одного важкого ланцюга амінокислота T у положенні 366 заміщена K і амінокислота L у положенні 351 заміщена K, а в домені СН3 іншого важкого ланцюга амінокислота L у положенні 351 заміщена D (нумерація згідно покажчика ЕУ системи Kabat). Додатково домен СН3 іншого важкого ланцюга включає принаймні одне з наступних заміщень: амінокислота Y у положенні 349 заміщена E, амінокислота Y у положенні 349 заміщена D, і амінокислота L у положенні 368 заміщена E (нумерація згідно покажчика ЕУ системи Kabat). В одному з варіантів виконання амінокислота L у положенні 368

заміщена E (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

В одному з варіантів виконання мультиспецифічного антитіла згідно даного опису для забезпечення гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла використовують підхід, описаний в WO 2012/058768. В одному з варіантів виконання вказаного мультиспецифічного антитіла згідно даного опису в домені СН3 одного важкого ланцюга амінокислота L у положенні 351 заміщена Y і амінокислота Y у положенні 407 заміщена A, а в домені СН3 іншого важкого ланцюга амінокислота T у положенні 366 заміщена A і амінокислота K у положенні 409 заміщена F (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat). В іншому варіанті виконання додатково до вищезазначених заміщень в домені СН3 іншого важкого ланцюга заміщена принаймні одна з амінокислот у положеннях: 411 (початково T), 399 (початково D), 400 (початково S), 405 (початково F), 390 (початково N) and 392 (початково K) (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat). Заміщеннями, яким віддають перевагу, є:

- заміщення амінокислоти T у положенні 411 амінокислотою, вибраною з N, R, Q, K, D, E і W (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat),

- заміщення амінокислоти D у положенні 399 амінокислотою, вибраною з R, W, Y і K (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat),

- заміщення амінокислоти S у положенні 400 амінокислотою, вибраною з E, D, R і K (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat),

- заміщення амінокислоти F у положенні 405 амінокислотою, вибраною з I, M, T, S, V і W (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat),

- заміщення амінокислоти N у положенні 390 амінокислотою, вибраною з R, K і D (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat),

- заміщення амінокислоти K у положенні 392 амінокислотою, вибраною з V, M, R, L, F і E (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat),

В іншому варіанті виконання вказаного мультиспецифічного антитіла згідно даного опису (сконструйованого відповідно до WO 2012/058768) в домені СН3 одного важкого ланцюга амінокислота L у положенні 351 заміщена Y і амінокислота Y у положенні 407 заміщена A, а в домені СН3 іншого важкого ланцюга амінокислота T у положенні 366 заміщена V і амінокислота K у положенні 409 заміщена F (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat). В іншому варіанті виконання вказаного мультиспецифічного антитіла згідно даного опису в домені СН3 одного важкого ланцюга амінокислота Y у положенні 407 заміщена A, а в домені СН3 іншого важкого ланцюга амінокислота T у положенні 366 заміщена A і амінокислота K у положенні 409 заміщена F (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat). В зазначеному останньому попередньому варіанті виконання в домені СН3 зазначеного іншого важкого ланцюга амінокислота K у положенні 392 заміщена E, амінокислота T у положенні 411 заміщена E, амінокислота D у положенні 399 заміщена R і амінокислота S у положенні 400 заміщена R (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

В одному з варіантів виконання мультиспецифічного антитіла згідно даного опису для забезпечення гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла використовують підхід, описаний в WO 2011/143545. В одному з варіантів виконання зазначеного мультиспецифічного антитіла згідно даного опису амінокислотні модифікації доменів СН3 обох важких ланцюгів вводять у положення 368 і/або 409 (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

В одному з варіантів виконання мультиспецифічного антитіла згідно даного опису для забезпечення гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла використовують підхід, описаний в WO 2011/090762. WO 2011/090762 стосується амінокислотних модифікацій за технологією "виступів-в-отвори". В одному з варіантів виконання вказаного сконструйованого з СН3(ВвО) мультиспецифічного антитіла згідно даного опису в домені СН3 одного важкого ланцюга амінокислота T у положенні 366 заміщена W, а в домені СН3 іншого важкого ланцюга амінокислота Y у положенні 407 заміщена A (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat). В іншому варіанті виконання вказаного сконструйованого з СН3(ВвО) мультиспецифічного антитіла згідно даного опису в домені СН3 одного важкого ланцюга амінокислота T у положенні 366 заміщена Y, а в домені СН3 іншого важкого ланцюга амінокислота Y у положенні 407 заміщена T (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

В одному з варіантів виконання мультиспецифічного антитіла згідно даного опису, яке належить до ізотипу IgG2, для забезпечення гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла використовують підхід, описаний в WO 2011/090762.

В одному з варіантів виконання мультиспецифічного антитіла згідно даного опису для забезпечення гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла використовують підхід, описаний в WO 2009/089004. В одному з варіантів виконання вказаного мультиспецифічного антитіла згідно даного опису в домені СН3 одного важкого ланцюга амінокислота K або N у положенні 392 заміщена негативно зарядженою амінокислотою (в одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, E або D, в одному з

варіантів виконання, якому віддають перевагу, D), а в домені CH3 іншого важкого ланцюга амінокислота D у положенні 399, амінокислота E або D у положенні 356 або амінокислота E у положенні 357 заміщена позитивно зарядженою амінокислотою (в одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, K або R, в одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, K, в одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, амінокислоти у положеннях 399 або 356 заміщені K) (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat). В одному додатковому варіанті виконання додатково до вищезазначених заміщень в домені CH3 одного важкого ланцюга амінокислота K або R у положенні 409 заміщена негативно зарядженою амінокислотою (в одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, E або D, в одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, D) (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat). У ще одному додатковому варіанті виконання додатково або альтернативно до вищезазначених заміщень в домені CH3 одного важкого ланцюга амінокислота K у положенні 439 і/або амінокислота K у положенні 370 незалежно одна від одної заміщені негативно зарядженою амінокислотою (в одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, E або D, в одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, D) (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

В одному з варіантів виконання мультиспецифічного антитіла згідно даного опису для забезпечення гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла використовують підхід, описаний в WO 2007/147901. В одному з варіантів виконання вказаного мультиспецифічного антитіла згідно даного опису в домені CH3 одного важкого ланцюга амінокислота K у положенні 253 заміщена E, амінокислота D у положенні 282 заміщена K і амінокислота K у положенні 322 заміщена D, а в домені CH3 іншого важкого ланцюга амінокислота D у положенні 239 заміщена K, амінокислота E у положенні 240 заміщена K і амінокислота K у положенні 292 заміщена D (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

В одному з варіантів виконання мультиспецифічного антитіла згідно даного опису для забезпечення гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла використовують підхід, описаний в WO 2007/110205.

В одному з варіантів виконання всіх аспектів та варіантів виконання згідно даного опису мультиспецифічне антитіло є біспецифічним антитілом або триспецифічним антитілом. В одному кращому варіанті виконання винаходу мультиспецифічне антитіло являє собою біспецифічне антитіло.

В одному з варіантів виконання всіх аспектів згідно даного опису антитіло є бівалентним або тривалентним антитілом. В одному з варіантів виконання антитіло є бівалентним антитілом.

В одному з варіантів виконання всіх аспектів згідно даного опису мультиспецифічне антитіло має структуру константного домену антитіла типу IgG. У ще іншому варіанті виконання всіх аспектів згідно даного опису мультиспецифічне антитіло характеризується тим, що зазначене мультиспецифічне антитіло належить до підкласу людських IgG1 або до підкласу людських IgG1 з мутаціями L234A та L235A. У ще іншому варіанті виконання всіх аспектів згідно даного опису мультиспецифічне антитіло характеризується тим, що зазначене мультиспецифічне антитіло належить до підкласу людських IgG2. У ще іншому варіанті виконання всіх аспектів згідно даного опису мультиспецифічне антитіло характеризується тим, що зазначене мультиспецифічне антитіло належить до підкласу людських IgG3. У ще іншому варіанті виконання всіх аспектів згідно даного опису мультиспецифічне антитіло характеризується тим, що зазначене мультиспецифічне антитіло належить до підкласу людських IgG4 або до підкласу людських IgG4 з додатковою мутацією S228P. У ще іншому варіанті виконання всіх аспектів згідно даного опису мультиспецифічне антитіло характеризується тим, що зазначене мультиспецифічне антитіло належить до підкласу людських IgG1 або підкласу людських IgG4. У ще іншому варіанті виконання всіх аспектів згідно даного опису мультиспецифічне антитіло характеризується тим, що зазначене мультиспецифічне антитіло належить до підкласу людських IgG1 з мутаціями L234A та L235A (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat). У ще іншому варіанті виконання всіх аспектів згідно даного опису мультиспецифічне антитіло характеризується тим, що зазначене мультиспецифічне антитіло належить до підкласу людських IgG1 з мутаціями L234A, L235A та P329G (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat). У ще іншому варіанті виконання всіх аспектів згідно даного опису мультиспецифічне антитіло характеризується тим, що зазначене мультиспецифічне антитіло належить до підкласу людських IgG4 з мутаціями S228P та L235E (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat). У ще іншому варіанті виконання всіх аспектів згідно даного опису мультиспецифічне антитіло характеризується тим, що зазначене мультиспецифічне антитіло належить до підкласу людських IgG4 з мутаціями S228P, L235E та P329G (нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

В одному варіанті виконання усіх аспектів згідно даного опису антитіло, яке містить важкий ланцюг, що включає домен CH3, як визначено тут і далі, містить додатковий С-кінцевий гліцин-лізиновий дипептид (G446 та K447, нумерація згідно покажчика EU системи Kabat). В одному варіанті виконання антитіло, яке містить важкий ланцюг, що включає домен CH3, як визначено тут і далі, містить додатковий С-кінцевий гліциновий залишок (G446, нумерація згідно покажчика EU системи Kabat).

5. Варіанти антитіл

У певних варіантах виконання розглядаються варіанти амінокислотних послідовностей наданих тут антитіл. Наприклад, може знадобитись покращити афінність зв'язування і/або інші біологічні властивості антитіла. Варіанти амінокислотних послідовностей антитіл можна підготувати шляхом введення належних модифікацій у нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло, або шляхом синтезу пептидів. Такі модифікації включають, наприклад, делеції з і/або інсерції в і/або заміщення залишків у амінокислотних послідовностях антитіла. Для одержання кінцевої конструкції можна виконувати будь-яку комбінацію делецій, інсерцій та заміщень, за умови, що кінцева конструкція володіє бажаними характеристиками, напр., зв'язуванням з антигеном.

а) Варіанти заміщень, інсерцій та делецій

У деяких варіантах виконання забезпечують варіанти антитіла, що мають одне або більше заміщень амінокислот. Місця, що представляють інтерес для заміщувального мутагенезу, включають HVR та FR. Консервативні заміщення наведені у Таблиці 1 під заголовком "консервативні заміщення". Більш суттєві зміни наведені у Таблиці 1 під заголовком "приклади заміщень", а також додатково описані нижче по відношенню до класів бокових ланцюгів амінокислот. Амінокислотні заміщення можна вводити в досліджуване антитіло і продукти, які випробовують на бажану активність, напр., продовжене/покращене зв'язування з антигеном, знижену імуногенність чи покращену АЗКЦ чи КЗЦ.

Таблиця 1

Початковий залишок	Приклади заміщень	Консервативні заміщення
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

Амінокислоти можуть бути згруповані за спільними властивостями бічних ланцюгів:

- (1) гідрофобні: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотні: Asp, Glu;
- (4) основні: His, Lys, Arg;
- (5) залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro;
- (6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміщення включатимуть заміну члена одного з цих класів на член іншого класу.

Один із типів заміщувального варіанта включає заміщення одного або більше залишків гіперваріабельної ділянки батьківського антитіла (напр., гуманізованого або людського антитіла). Як правило, одержаний(-і) варіант(-и), відібраний для подальших досліджень, матимуть модифікації (напр., вдосконалення) певних біологічних властивостей (напр., підвищену афінність, знижену імуногенність) порівняно з батьківським антитілом і/або істотно зберігатимуть певні біологічні властивості батьківського антитіла. Прикладом заміщувального варіанта є антитіло з дозрілою афінністю, яке звичайно можна створити, напр., користуючись техніками дозрівання антитіл на основі фаг-дисплею, такими, як описані тут. Коротко, один або більше залишків HVR піддають мутації, і варіанти антитіл піддають фаг-дисплею та випробовують на конкретну біологічну активність (напр., афінність зв'язування).

До HVR можуть вносити зміни (напр., заміщення), напр., для покращення афінності антитіла. Такі

зміни можуть вносити в "гарячі точки" HVR, тобто залишки, кодовані кодонами з високою частотою мутацій під час процесу соматичного дозрівання (див., напр., Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196), і/або в залишки, що контактують з антигеном, перевіряючи одержаний варіантний VH або VL на афінність зв'язування. Дозрівання антитіл шляхом конструювання і перевідбору з вторинних бібліотек описане, напр., у Hoogenboom, H.R. та ін. в *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37. В деяких варіантах виконання дозрівання антитіл різноманітність вводять у варіабельні гени, обрані для дозрівання, будь-яким із різноманітних методів (напр., стійка до помилок ПЛР, перестановка ланцюгів або спрямований на олігонуклеотиди мутагенез). Тоді створюють вторинну бібліотеку. Бібліотеку піддають скринінгу з метою ідентифікувати будь-які варіанти антитіл з бажаною афінністю. Інший метод введення різноманітності включає підходи через HVR, в яких декілька залишків HVR (напр., 4-6 залишків за раз) рандомізують. Можна конкретно ідентифікувати залишки HVR, що беруть участь у зв'язуванні з антигеном, напр., використовуючи аланін-сканувальний мутагенез або моделювання. Зокрема, часто мішенню стають CDR-H3 та CDR-L3.

У певних варіантах виконання заміщення, інсерції або делеції можуть відбуватися в одній або більше HVR доти, поки такі зміни не знижують істотно здатність антитіла зв'язуватися з антигеном. Наприклад, у HVR можна вносити консервативні зміни (напр., описані тут консервативні заміщення), які не знижують істотно афінність зв'язування. Такі зміни можуть, наприклад, знаходитись поза залишками HVR, що контактують з антигеном. У певних варіантах виконання наданих вище варіантів послідовностей VH та VL кожна HVR або незмінена, або містить не більш ніж одне, два або три амінокислотних заміщення.

Корисним методом ідентифікації залишків або ділянок антитіла, що можуть слугувати мішенями мутагенезу, є "аланін-сканувальний мутагенез", описаний Cunningham, B.C. та Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085. В цьому методі залишок або групу залишків-мішеней (напр., заряджених залишків, таких як Arg, Asp, His, Lys та Glu) ідентифікують та замінюють нейтральною або негативно зарядженою амінокислотою (напр., аланіном або поліаланіном) з метою визначити, чи впливає це на взаємодію антитіла з антигеном. В амінокислотні положення, що виявили функціональну чутливість до початкових заміщень, можуть вводитись подальші заміщення. Альтернативно або додатково для ідентифікації точок контакту антитіла з антигеном може слугувати кристалічна структура комплексу антиген-антитіло. Такі контактні залишки та сусідні залишки можна брати як мішені або виключити з кандидатів на заміщення. Варіанти можна піддавати скринінгу для визначення, чи мають вони бажані властивості.

Інсерції в амінокислотних послідовностях включають аміно- і/або карбоксикінцеві злиття, довжина яких різниться від одного залишку до поліпептидів, що містять сто або більше залишків, а також вставки окремих або множинних амінокислотних залишків всередину послідовності. Приклади кінцевих інсерцій включають антитіло з N-кінцевим метіонільним залишком. Інші інсерційні варіанти молекули антитіла включають злиття з N- або C-кінцем антитіла фермента (напр., для ADEPT) або поліпептиду, який подовжує період напівжиття антитіла в сироватці.

б) Варіанти глікозилювання

У певних варіантах виконання надане тут антитіло змінене з метою підвищити або знизити ступінь його глікозилювання. Додавання або видалення сайтів глікозилювання до/з антитіла можна звичайно здійснити шляхом зміни амінокислотної послідовності таким чином, щоб створити або вилучити один або більше сайтів глікозилювання.

Якщо антитіло включає Fc-ділянку, то можна змінити приєднаний до неї вуглевод. Природні антитіла, які виробляються в клітинах ссавців, зазвичай включають розгалужений біантенний олігосахарид, приєднаний, як правило, N-зв'язком до Asn297 домену CH2 Fc-ділянки (див., напр., Wright, A. і Morrison, S.L., *TIBTECH* 15 (1997) 26-32). Олігосахарид може охоплювати різні вуглеводи, напр., манозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу та сіалову кислоту, а також фукозу, приєдану до GlcNAc у "стовбурі" біантенної структури олігосахариду. У деяких варіантах виконання олігосахарид антитіла згідно винаходу може бути модифікований з метою створити варіанти антитіла з певними покращеними властивостями.

В одному з варіантів виконання надано варіанти антитіла, в структурі вуглеводу яких бракує фукози, приєднаної (напрямую або непрямо) до Fc-ділянки. Наприклад, кількість фукози в такому антитілі може становити від 1 % до 80 %, від 1 % до 65 %, від 5 % до 65 % або від 20 % до 40 %. Кількість фукози визначають розрахунком середньої кількості фукози в цукровому ланцюзі при Asn297 відносно суми всіх глікоструктур, приєднаних до Asn297 (напр., комплексних, гібридних та високоманозних структур), вимірною мас-спектрометрією MALDI-TOF, як описано, наприклад, у WO 2008/077546. Asn297 позначає залишок аспарагіну, розташований приблизно в положенні 297 Fc-ділянки (нумерація залишків Fc-ділянки за покажчиком EU); однак через незначні варіації послідовностей Asn297 також може бути розташований приблизно на ± 3 амінокислоти вище або нижче від положення 297, тобто між положеннями 294 та 300. Такі варіанти фукозилювання можуть мати покращену функцію АЗКЦ. Див., напр., US 2003/0157108; US 2004/0093621. Приклади публікацій, які стосуються "дефукозилюваних" або "фукозодефіцитних" варіантів антитіл, включають: US

2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A. та ін., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. та ін., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. Приклади клітинних ліній, що здатні виробляти дефукозилзовані антитіла, включають клітини Lec13 CHO, дефіцитні за білковим фукозилуванням (Ripka, J. та ін., Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; US 2003/0157108; а також WO 2004/056312, особливо Приклад 11), та нокаутні клітинні лінії, такі як клітини CHO з нокаутом гену альфа-1,6-фукозилтрансферази, FUT8, (див, напр., Yamane-Ohnuki, N. та ін., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. та ін., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; а також WO 2003/085107).

Додатково надані варіанти антитіл з роздвоєними олігосахаридами, напр., де приєднаний до Fc-ділянки антитіла біантенний олігосахарид розсічений надвоє GlcNAc. Такі варіанти антитіл можуть мати зменшене фукозилування і/або покращену функцію АЗКЦ. Приклади подібних варіантів антитіл описані, напр., в WO 2003/011878; US 6,602,684; та US 2005/0123546. Також надано варіанти антитіла з принаймні одним галактозним залишком в приєднаному до Fc-ділянки олігосахариді. Такі варіанти антитіл можуть мати покращену функцію КЗЦ. Такі варіанти антитіл описані, напр., в WO 1997/30087; WO 1998/58964; та WO 1999/22764.

в) Варіанти Fc-ділянки

У певних варіантах виконання у Fc-ділянку наданого тут антитіла може бути внесена одна або більше модифікацій, утворюючи варіант за Fc-ділянкою. Варіант за Fc-ділянкою може включати послідовність людської Fc-ділянки (напр., людської Fc-ділянки IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4), яка включає амінокислотну модифікацію (напр., заміщення) в одному або більше амінокислотних положеннях.

У певних варіантах виконання винаходом передбачено варіант антитіла, який володіє деякими, але не всіма ефекторними функціями, що робить його бажаним кандидатом для застосування, в якому важливий період напівжиття антитіла *in vivo*, а певні ефекторні функції (такі як комплемент і АЗКЦ) не потрібні або шкідливі. Для підтвердження зниження/вичерпання активностей КЗЦ і/або АЗКЦ можна провести аналіз цитотоксичності *in vitro* і/або *in vivo*. Наприклад, щоб упевнитися в тому, що антитіло не зв'язує FcγR (а отже, імовірно, не має АЗКЦ-активності), але зберігає здатність зв'язувати FcRn, можна провести аналіз зв'язування з Fc-рецептором (FcR). Основні клітини, що опосередковують АЗКЦ, НК-клітини, експресують лише Fc(R)III, тоді як моноцити експресують FcγRI, FcγRII та FcγRIII. Експресія FcR на гемопоетичних клітинах підсумована в Таблиці 3 на сторінці 464 Ravetch, J.V. та Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Необмежуючі приклади аналізів оцінки активності АЗКЦ досліджуваної молекули *in vitro* описані у US 5,500,362 (див., напр. Hellstrom, I. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; та Hellstrom, I. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502); US 5,821,337 (див. Bruggemann, M. та ін., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361). Альтернативно можуть використовуватись методи нерадіоактивного аналізу (див., наприклад, нерадіоактивний аналіз цитотоксичності для проточної цитометрії АСТІ™ (CellTechnology, Inc. Маунтін-В'ю, СА; і нерадіоактивний аналіз цитотоксичності CytoTox 96® (Promega, Медісон, WI). Застосовні у таких аналізах ефекторні клітини включають одноподібні клітини периферичної крові (ОКПК) та природні кілери (НК). Альтернативно або додатково АЗКЦ-активність досліджуваної молекули можна оцінити *in vivo*, напр., на тваринній моделі, такій, як описано у Clynes, R. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. Для підтвердження нездатності антитіла зв'язувати C1q і, відповідно, відсутності в нього КЗЦ, можна також виконати аналіз зв'язування C1q. Див., напр., ІФА зв'язування C1q і C3c у WO 2006/029879 та WO 2005/100402. Для оцінки активації комплементу можна виконати КЗЦ-аналіз (див., наприклад, Gazzano-Santoro, H. та ін., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S. та ін., Blood 101 (2003) 1045-1052; та Cragg, M.S. і M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743). Можна також провести визначення зв'язування FcRn та кліренсу/напівжиття *in vivo*, використовуючи відомі в галузі методи (див., напр., Petkova, S.B. та ін., Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769).

Антитіла зі зниженою ефекторною функцією включають антитіла із заміщенням одного або більше залишків Fc-ділянки 238, 265, 269, 270, 297, 327 та 329 (US 6,737,056). Такі Fc-мутанти включають Fc-мутантів із заміщеннями у двох або більше з амінокислотних положень 265, 269, 270, 297 і 327, включно з так званим Fc-мутантом "DANA" із заміщеннями залишків 265 і 297 на аланін (US 7,332,581).

Описані деякі варіанти антитіл із покращеним або зниженим зв'язуванням FcR (див., напр., US 6,737,056; WO 2004/056312, та Shields, R.L. та ін., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

У певних варіантах виконання варіант антитіла включає Fc-ділянку з одним або більше амінокислотними заміщеннями, які покращують АЗКЦ, напр., заміщеннями у положеннях 298, 333 і/або 334 Fc-ділянки (нумерація залишків за покажчиком EU).

У деяких варіантах виконання внесені у Fc-ділянку зміни призводять до змінених (тобто покращених або знижених) зв'язування C1q і/або комплемент-залежної цитотоксичності (КЗЦ), напр.,

як описано у US 6,194,551, WO 99/51642, а також Idusogie, E.E. та ін., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184.

Антитіла з продовженим періодом напівжиття та покращеним зв'язуванням з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), який відповідає за перенесення материнських IgG до плоду (Guyer, R.L. та ін., J. Immunol. 117 (1976) 587-593, та Kim, J.K. та ін., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434), описані в US 2005/0014934. Ці антитіла включають Fc-ділянку з одним або більше заміщеннями, які покращують зв'язування Fc-ділянки з FcRn. Такі Fc-варіанти включають варіанти із заміщеннями одного або більше залишків Fc-ділянки: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, напр., заміщення залишку 434 Fc-ділянки (US 7,371,826).

Див. також Duncan, A.R. і Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; US 5,648,260; US 5,624,821; і WO 94/29351, які стосуються інших прикладів варіантів за Fc-ділянкою.

г) Цистеїн-сконструйовані варіанти антитіл

У певних варіантах виконання може бути необхідно створити цистеїн-сконструйовані варіанти антитіл, напр, "тіоMAB", в яких один або більше залишків антитіла заміщені цистеїновими залишками. В конкретних варіантах виконання заміщені залишки знаходяться на доступних сайтах антитіла. Завдяки заміщенню цих залишків цистеїном реакційноздатні тіольні групи розміщуються на доступних сайтах антитіла і можуть бути використані для приєднання антитіла до інших груп, таких як фрагменти ліків або фрагменти лінкер-ліки, з метою створення імунокон'югатів, як описано далі. У певних варіантах виконання цистеїном може бути заміщений будь-який один або більше з наступних залишків: V205 (нумерація Kabat) легкого ланцюга; A118 (нумерація EU) важкого ланцюга; та S400 (нумерація EU) важкого ланцюга Fc-ділянки. Цистеїн-сконструйовані антитіла можна утворити згідно опису, напр., в US 7,521,541.

г') Похідні антитіл

У певних варіантах виконання надане тут антитіло може бути додатково модифіковане з включенням додаткових небілкових груп, які відомі з рівня техніки і доступні. Групи, придатні для утворення похідних антитіла, включають, але не обмежуються ними, водорозчинні полімери. Необмежувальні приклади водорозчинних полімерів включають, але не обмежуються ними, поліетиленгліколь (ПЕГ), співполімери етиленгліколю/пропіленгліколю, карбоксиметилцелюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі-1,3-діоксолан, полі-1,3,6-триоксан, співполімер етилену/малеїнового ангідриду, поліамінокислоти (гомополімери або статистичні співполімери) та декстран або полі(н-вінілпіролідон)поліетиленгліколь, гомополімери пропропіленгліколю, співполімери проліпропіленоксиду/етиленоксиду, поліоксидетильовані полііоли (напр., гліцерин), полівініловий спирт та їх суміші. Переваги для виробництва завдяки своїй стабільності у воді може мати поліетиленгліколь-пропіональдегід. Полімер може мати будь-яку молекулярну масу і бути розгалуженим або нерозгалуженим. Кількість приєднаних до антитіла полімерів може різнитися, і в разі приєднання більш ніж одного полімеру вони можуть бути однаковими або різними молекулами. В цілому кількість і/або тип полімерів, які використовуються для отримання похідних, можна визначити з міркувань, які включають, але не обмежуються ними, конкретні властивості або функції антитіла, що підлягають покращенню, чи використовуватиметься похідне антитіла у лікуванні при певних умовах і т.д.

В іншому варіанті виконання надано кон'югати антитіла і небілкового фрагмента, який може бути вибірково нагрітий при піддаванні опроміненню. В одному з варіантів виконання небілковий фрагмент є вуглецевою нанотрубкою (Kam, N.W. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). Випромінювання може мати будь-яку довжину хвилі і включає, але не обмежується ними, довжини хвиль, що не ушкоджують звичайні клітини, але нагрівають небілковий фрагмент до температури, при якій клітини близько від антитіла з небілковим фрагментом гинуть.

Б. Транспортні модулі через гематоенцефалічний бар'єр

В одному з варіантів виконання всіх аспектів антитіло являє собою мультиспецифічне антитіло, що має принаймні одну зв'язувальну специфічність до рецептора трансферину і принаймні одну зв'язувальну специфічність до терапевтичної мішені. В одному з варіантів виконання антитіло включає перший антигензв'язувальний сайт, що зв'язується з рецептором трансферину, і другий антигензв'язувальний сайт, що зв'язується з мозковим антигеном. У подальшому варіанті виконання мозковий антиген вибраний із групи, що складається з Abeta, рецептора епідермального фактору росту (EGFR), людського рецептора епідермального фактору росту 2 (HER2), альфа-синуклеїну, CD20, глюкоцереброзидази або білка-попередника амілоїду (APP). В одному з варіантів виконання, якому віддають перевагу, мультиспецифічне антитіло зв'язується одночасно з

- I) рецептором трансферину та Abeta, або
- II) рецептором трансферину та CD20, або
- III) рецептором трансферину та альфа-синуклеїном, або
- IV) рецептором трансферину та фосфо-тау-білком, або
- V) рецептором трансферину та HER2, або
- VI) рецептором трансферину та глюкоцереброзидазою.

пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 7 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 34, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та принаймні одну пару з гуманізованого варіабельного домену важкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 85, та гуманізованого варіабельного домену легкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 86, які утворюють сайт зв'язування для людського альфа-синуклеїну.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 7 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 34, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та принаймні одну пару з гуманізованого варіабельного домену важкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 87, та гуманізованого варіабельного домену легкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 88, які утворюють сайт зв'язування для людського альфа-синуклеїну.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 7 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 34, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та принаймні одну пару з гуманізованого варіабельного домену важкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 89, та гуманізованого варіабельного домену легкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 90, які утворюють сайт зв'язування для людського альфа-синуклеїну.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 7 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 34, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та принаймні одну пару з гуманізованого варіабельного домену важкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 91, та гуманізованого варіабельного домену легкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 92, які утворюють сайт зв'язування для людського альфа-синуклеїну.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 7 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 34, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та принаймні одну пару з гуманізованого варіабельного домену важкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 93, та гуманізованого варіабельного домену легкого ланцюга, що походить від SEQ ID NO: 94, які утворюють сайт зв'язування для людського альфа-синуклеїну.

В одному із варіантів виконання антитіло є біспецифічним антитілом, що включає принаймні одну пару з варіабельного домену важкого ланцюга за SEQ ID NO: 7 та варіабельного домену легкого ланцюга за SEQ ID NO: 34, які утворюють сайт зв'язування для рецептора трансферину, та сайт зв'язування для

Одновалентні зв'язувальні об'єкти, що специфічно зв'язуються з рецептором гематоенцефалічного бар'єру, можна охарактеризувати залежно від їхніх властивостей зв'язування і трансцитозу:

- ефективне зв'язування з клітинами, що експресують PГЕБ, в якості одновалентного зв'язувального об'єкта,

- ефективний трансцитоз *in vitro* в якості одновалентного зв'язувального об'єкта,

- перехресна реактивність людина-яванська макака (напр., в експериментах BIAcore і FACS).

Скринінг трансцитозу можна виконати в аналізі на основі hCMEC/D3. Аналіз можна проводити з витісненням мітки. Ендотеліальні клітини мозку hCMEC/D3 інкубують з одновалентним зв'язувальним об'єктом протягом 1 години, після чого промивають і через 0 годин і 4 години після промивання визначають наступні параметри:

I) кількість одновалентного зв'язувального об'єкта, поглиненого клітинами під час фази навантаження,

II) базолатеральну кількість одновалентного зв'язувального об'єкта через 4 години після навантаження і промивання;

III) апікальну кількість одновалентного зв'язувального об'єкта через 4 години після навантаження і промивання;

IV) кількість одновалентного зв'язувального об'єкта у клітинах (шляхом лізису клітин) через 0 годин і 4 години після навантаження і промивання;

V) загальну кількість одновалентного зв'язувального об'єкта через 0 годин і 4 години після навантаження і промивання.

Щоб підходити на роль одновалентного зв'язувального об'єкта у транспортному модулі через гематоенцефалічний бар'єр згідно наданого тут опису, антитіло до рецептора трансферину (напр., як одновалентний зв'язувальний об'єкт) повинне I) поглинатися клітинами hCMEC/D3 (ендоцитоз), II) переноситися назовні клітин hCMEC/D3 (екзоцитоз) та III) бути стабільним всередині клітин hCMEC/D3 (не піддаватися або якнайменше піддаватися транспортуванню в ендосому для розщеплення).

Тому в одному з варіантів виконання одновалентний зв'язувальний об'єкт в аналізі на основі hCMEC/D3 характеризується I) (суттєвим) поглинанням клітинами hCMEC/D3 протягом одногодинного періоду навантаження, II) вивільненням в апікальну і/або базолатеральну камеру після періоду навантаження та етапу промивання в рамках 4 годин після промивання, та III) низькою

(внутрішньоклітинною) швидкістю розщеплення.

В одному з варіантів виконання навантаження здійснюють у концентрації приблизно 2,67 мкг/мл одновалентного зв'язувального об'єкта протягом однієї години.

Було виявлено, що щоб підходити на роль одновалентного зв'язувального об'єкта у транспортному модулі через гематоенцефалічний бар'єр згідно наданого тут опису, одновалентний зв'язувальний об'єкт повинен продемонструвати у вищеописаному аналізі на основі hCMC/D3 наступні порогові значення:

I) кількість одновалентного зв'язувального об'єкта, поглиненого клітинами під час фази навантаження – 400 пг або більше,

II) базолатеральна кількість одновалентного зв'язувального об'єкта через 4 години після навантаження і промивання – 100 пг або більше, та

III) апікальна кількість одновалентного зв'язувального об'єкта через 4 години після навантаження і промивання – 150 пг або більше.

Як еталон можна взяти мишаче антитіло 128.1 до людського рецептора трансферину (послідовності варіабельних ділянок див. у WO 93/10819 та SEQ ID NO: 64 і 65). В цьому випадку, щоб підходити на роль одновалентного зв'язувального об'єкта у транспортному модулі через гематоенцефалічний бар'єр згідно наданого тут опису, одновалентний зв'язувальний об'єкт повинен продемонструвати у вищеописаному аналізі на основі hCMC/D3 наступні порогові значення:

I) кількість одновалентного зв'язувального об'єкта, поглиненого клітинами під час фази навантаження – 60 % або більше від навантаження антитіла 128.1,

II) базолатеральна кількість одновалентного зв'язувального об'єкта через 4 години після навантаження і промивання – 60 % або більше від навантаження антитіла 128.1, та

III) апікальна кількість одновалентного зв'язувального об'єкта через 4 години після навантаження і промивання – 60 % або більше від апікальної кількості антитіла 128.1.

Аналіз на основі hCMC/D3 можна виконувати наступним чином (це один варіант виконання всіх описаних тут аспектів):

Середовище і доповнення для hCMC/D3 (див. WO 2006/056879 та Weksler, B.V., та ін., FASEB J. 19 (2005) 1872-1874) можна одержати від Lonza. Клітини hCMC/D3 (пересіви 26-29) культивують/можуть культивувати на вкритих колагеном покривних скельцях (мікроскопних) або у колбах на середовищі EBM2, що містять 2,5 % FBS, четверту частину доданих факторів росту та повністю укомплектоване доданим гідрокортизоном, гентаміцином і аскорбіновою кислотою.

У всіх трансцитозних тестах використовують/можуть використовувати фільтри-вставки (розмір пор 0,4 мкм, діаметр 12 мм) з ПЕТ-мембрани з високою густиною пор (1×10^8 пор/см²) на 12-лункових планшетах для культивування клітин. Розрахунковий об'єм середовища для апікальної та базолатеральної камер, відповідно, становить 400 мкл та 1600 мкл. Апікальні камери фільтрів-вставок вкриті/можуть бути вкриті колагеном I з хвоста щура (7,5 мкг/см²) і потім фібронектином (5 мкг/мл), за тривалості кожної інкубації одна година при КТ. Клітини hCMC/D3 вирощують/можуть вирощувати до злитих моношарів ($\sim 2 \times 10^5$ клітин/см²) протягом 10-12 днів на середовищі EBM2. Порожні фільтри блокують/можуть блокувати у ФСБ з 1 % БСА протягом 1 години або протягом ночі (п/н) до аналізу і потім калібрувати в EBM2 протягом принаймні години перед аналізом.

Аналіз (схему аналізу див. на Фігурі 1) виконували у безсироватковому середовищі EBM2, яке в іншому відтворювали згідно наданого тут опису. В день аналізу клітини піддавали сироватковому голодуванню протягом 60 хв з метою вичерпати природній ліганд досліджуваного рецептору гематоенцефалічного бар'єру. Фільтри-вставки з або без клітин (але заблоковані протягом ночі у повному середовищі) інкубували апікально з досліджуваними моноклональними антитілами (одновалентним зв'язувальним об'єктом) протягом 1 години при 37 °С. Моношари промивали при кімнатній температурі (КТ) безсироватковим середовищем апікально (400 мкл) і базолатерально (1600 мкл) тричі по 3-5 хв. До апікальної камери додавали попередньо підігріте середовище і переносили фільтри на свіжий 12-лунковий планшет (заблокований протягом ночі у ФСБ з 1 % БСА), який містив 1600 мкл попередньо підігрітого середовища. В цей момент фільтри з або без клітин лізували у 500 мкл буферу RIPA для визначення специфічного поглинання антитіла (одновалентного зв'язувального об'єкта). Фільтри, що залишились, інкубували при 37 °С або при 4 °С та в різні моменти часу відбирали зразки для визначення апікального і/або базолатерального вивільнення антитіла (одновалентного зв'язувального об'єкта). Вміст антитіла у зразках можна кількісно визначити за допомогою високочутливого IgG-ІФА (див. Приклад 9). Для кожного моменту часу дані слід знімати з двох порожніх фільтрів і трьох фільтрів з клітинними культурами.

В. Рекомбінантні методи і композиції

Антитіла можна продукувати із застосуванням рекомбінантних методів і композицій, напр., як описано у US 4,816,567. В одному з варіантів виконання забезпечено ізольовану нуклеїнову кислоту, яка кодує описане тут антитіло до рецептора трансферину. Така нуклеїнова кислота може кодувати амінокислотну послідовність, що включає VL, і/або амінокислотну послідовність, що включає VH антитіла (напр., легкий і/або важкий ланцюги антитіла). У подальшому варіанті виконання забезпечено

один або більше векторів (напр., векторів експресії), що включають таку нуклеїнову кислоту. У подальшому варіанті виконання забезпечено клітину-хазяїн, що включає таку нуклеїнову кислоту. В одному з таких варіантів виконання клітина-хазяїн включає (напр., була трансформована за допомогою): (1) вектор, що включає нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що включає VL антитіла, і амінокислотну послідовність, що включає VH антитіла, або (2) перший вектор, що включає нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що включає VL антитіла, і другий вектор, що включає нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що включає VH антитіла. В одному з варіантів виконання клітина-хазяїн є еукаріотичною, напр., клітиною яєчників китайського хом'яка (CHO) або лімфоїдною клітиною (напр., клітиною Y0, NS0, Sp20). В одному з варіантів виконання запропоновано спосіб одержання антитіла до рецептора трансферину, де спосіб включає культивування клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло, як це було описано вище, в умовах, придатних для експресії антитіла, і, необов'язково, виділення антитіла з клітини-хазяїна (або культурального середовища клітини-хазяїна).

Для рекомбінантного продукування антитіла до рецептора трансферину нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло, напр., як описано вище, виділяють та вводять у один або більше векторів для подальшого клонування та/або експресії в клітині-хазяїні. Таку нуклеїнову кислоту можна легко ізолювати та секвенувати за допомогою звичайних процедур (напр., за допомогою олігонуклеотидних зондів, здатних специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіла).

Придатні клітини-хазяї для клонування або експресії векторів, що кодують антитіло, включають описані тут прокаріотичні або еукаріотичні клітини. Наприклад, антитіла можна продукувати в бактеріях, зокрема, коли глікозилювання та ефекторна функція Fc не потрібні. Для експресії фрагментів антитіл та поліпептидів у бактеріях див., напр., US 5,648,237, US 5,789,199 та US 5,840,523. (Див. також Charlton, K.A., у: *Methods in Molecular Biology*, Т. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Тотова, NJ (2003), с. 245-254, де описано експресію фрагментів антитіл у *E. coli*.) Після експресії антитіло можна виділити з бактеріальної клітинної маси в розчинній фракції і додатково очистити.

Крім прокаріотів, придатними хазяями клонування або експресії для векторів, що кодують антитіла, є еукаріотичні мікроорганізми, такі як нитчасті гриби або дріжджі, включаючи штами грибків та дріжджів, шляхи глікозилювання яких були "гуманізовані", в результаті чого вони продукують антитіло з частковим або повним профілем глікозилювання людини. Див. Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; та Li, H. та ін., *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215.

Придатні для експресії глікозилюваних антитіл клітини-хазяї також отримують з багатоклітинних організмів (безхребетних та хребетних). Прикладами клітин безхребетних є клітини рослин та комах. Ідентифіковано численні штами бакуловірусів, які можна використовувати разом із клітинами комах, зокрема для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*.

Як хазяї можуть бути використані і культури рослинних клітин. Див., напр., US 5,959,177, US 6,040,498, US 6,420,548, US 7,125,978 та US 6,417,429 (де описана технологія PLANTIBODIES™ для продукування антитіл на трансгенних рослинах).

Як хазяїв можна використати і клітини хребетних. Наприклад, корисними можуть бути лінії клітин ссавців, адаптовані до росту в суспензії. Інші приклади придатних ліній клітин-хазяїв ссавців представлені лінією CV1 нирок мавпи, трансформованою SV40 (COS-7); лінією нирок ембріона людини (293 або 293 клітини згідно опису, напр., у Graham, F.L. та ін., *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74); клітинами нирок новонародженого хом'яка (NHX); мишачими клітинами Сертолі (клітинами TM4, як описано, напр., у Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252); клітинами нирок мавпи (CV1); клітинами нирок африканської зеленої мавпи (VERO-76); клітинами карциноми шийки матки людини (HELA); клітинами нирки собаки (MDCK); клітинами печінки сірого щура (BRL 3A); клітинами легень людини (W138); клітинами печінки людини (Hep G2); пухлиною молочних залоз миші (MMT 060562); клітинами TRI, як описано, напр., у Mather, J.P. та ін., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68; клітинами MRC 5; та клітинами FS4. Інші придатні лінії клітин-хазяїв ссавців включають клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), включно з клітинами DHFR-CHO (Urlaub, G. та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220); а також мієломні клітинні лінії, такі як Y0, NS0 та Sp2/0. Для огляду деяких ліній клітин-хазяїв ссавців, що придатні для виробництва антитіл, див., напр., Yazaki, P. та Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Т. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Тотова, NJ (2004), с. 255-268.

Г. Аналізи

Забезпечені тут антитіла до рецептора трансферину можуть бути піддані ідентифікації, скринінгу або характеристиці своїх фізико-хімічних властивостей і/або біологічних властивостей за допомогою різних відомих в даній галузі аналізів.

1. Аналіз зв'язування

В одному аспекті антитіло згідно із винаходом перевіряють на антигензв'язувальну активність, напр., за допомогою відомих методів, таких як ІФА, alphaLISA, вестерн-блотинг, матриця антитіл або оберненої фази тощо.

У прикладі аналізу ІФА або alphaLISA рецептор трансферину в розчині (супернатант клітин, лізати

клітин або тканин, фізіологічні рідини тощо) зв'язується захоплювальним антитілом, яке специфічно зв'язується з першим епітопом на рецепторі трансферину або рецептором трансферину в певній конформації, та антитілом виявлення, приєднаним до групи детектування, яке специфічно зв'язується з другим епітопом або конформацією рецептора трансферину. Зчитування здійснюють залежно від групи детектування (хемілюмінесценція, флуоресценція, люмінесценція, індукована переносом енергії тощо).

У випадку матриці антитіл антитіла точково наносять на скло або нітроцелюлозні чіпи. Скельця блокують та інкубують з розчином, що містить рецептор трансферину, промивають для видалення незв'язаних антитіл, а зв'язані антитіла виявляють за допомогою відповідного флуоресцентно міченого вторинного антитіла. Сигнал флуоресценції вимірюється слайд-сканером флуоресценції. Аналогічно для обернено-фазових матриць рекомбінантний рецептор трансферину, супернатант клітин, лізати клітин або тканин, фізіологічні рідини тощо точково наносять на скляні або нітроцелюлозні чіпи. Скельця блокують та інкубують окремі матриці з антитілом до конкретного епітопу рецептора трансферину. Незв'язані антитіла відмивають, а зв'язані антитіла виявляють за допомогою відповідного флуоресцентно міченого вторинного антитіла. Сигнал флуоресценції вимірюється слайд-сканером флуоресценції (Dernick, G., та ін., J. Lipid Res. 52 (2011) 2323-2331).

Г. Способи та композиції для діагностики та виявлення

У певних варіантах виконання будь-яке з наданих тут антитіл до рецептора трансферину придатне для виявлення присутності рецептора трансферину людини в біологічному зразку. Термін "виявлення" тут і далі охоплює кількісне або якісне виявлення. У деяких варіантах виконання біологічний зразок містить клітину або тканину, таку як тканина мозку.

В одному з варіантів виконання надане антитіло до рецептора трансферину для застосування у способі діагностики або виявлення. В наступному аспекті надано спосіб виявлення присутності рецептора трансферину в біологічному зразку. У деяких варіантах виконання цей спосіб включає контактування біологічного зразка з описаним тут антитілом до рецептора трансферину в умовах, що допускають зв'язування антитіла до рецептора трансферину з рецептором трансферину, і виявлення утворення комплексу між антитілом до рецептора трансферину і рецептором трансферину. Такий спосіб може бути способом *in vitro* або *in vivo*. В одному з варіантів виконання антитіло до рецептора трансферину використовують для вибору суб'єктів, що можуть бути обрані для терапії антитілом до рецептора трансферину, напр., де рецептор трансферину є біомаркером для відбору пацієнтів.

Приклади розладів, які можуть бути діагностовані за допомогою антитіла згідно винаходу, включають нейродегенерацію з накопиченням у мозку заліза типу 1 (NBIA1), ідіопатичну ортостатичну гіпотензію, синдром Дауна, комплекс Гуама та кілька порушень з тільцями Леві, такі як хвороба дифузних тілець Леві (DLBD), варіант хвороби Альцгеймера з тільцями Леві (LBVAD), деякі форми хвороби Гоше та деменція при хворобі Паркінсона (PDD).

У певних варіантах виконання надано мічені антитіла до рецептора трансферину. Мітки включають, але не обмежуються ними, мітки або групи, які виявляються безпосередньо (наприклад, флуоресцентні, хромофорні, електронно-щільні, хемілюмінесцентні та радіоактивні мітки), а також групи, такі як ферменти або ліганди, які виявляються опосередковано, напр., через ферментативну реакцію або молекулярну взаємодію. Зразки міток включають, але не обмежуються ними, радіоізотопи ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H та ¹³¹I, флуорофори, такі як хелати рідкісноземельних елементів або флуоресцеїн та його похідні, родамін та його похідні, данзил, умбеліферон, люциферази, напр., люциферазу світляка і бактеріальну люциферазу (US 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофталазиндіони, пероксидазу хрину (HRP), лужну фосфатазу, β-галактозидазу, глюкоамілазу, лізоцим, сахаридоксидази, напр., глюкозооксидазу, галактозооксидазу та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу, гетероциклічні оксидази, такі як уриказа і ксантинооксидаза, в поєднанні з ферментом, який використовує пероксид водню для окиснення попередника барвника, таким як HRP, лактопероксидазу або мікропероксидазу, біотин/авідин, спінові мітки, мітки з бактеріофагами, стабільні вільні радикали і т.п.

Д. Фармацевтичні склади

Фармацевтичні склади описаного тут антитіла до рецептора трансферину готують шляхом змішування такого антитіла, що має бажану ступінь чистоти, з одним або декількома необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-те видання, Osol, A. (ed.) (1980)) у формі ліофілізованих композицій або водних розчинів. Фармацевтично прийнятні носії, як правило, є нетоксичними для реципієнтів в використовуваних дозах і концентраціях і включають, але не обмежуються ними: буфери, такі як фосфат, цитрат і інші органічні кислоти; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (такі як октадецил диметилбензиламонію хлорид; гексаметонію хлорид; бензалконію хлорид; бензетонію хлорид; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол і м-крезол); поліпептиди з низькою молекулярною масою (менш ніж приблизно 10 залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полі(вінілпіролідон); амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини;

хелатуючі агенти, такі як ЕДТА; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворюючі контр-іони, такі як натрій; металеві комплекси (напр., Zn-білкові комплекси); і/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі як поліетиленгліколь (ПЕГ). Приклади фармацевтично прийнятних носіїв також включають засоби диспергування ліків у міжклітинному просторі, такі як розчинні нейтрально активні глікопротеїни гіалуронідази (sHASEGP), наприклад, людські розчинні глікопротеїни гіалуронідази PH-20, такі як rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Деякі приклади sHASEGP та способи їх застосування, включаючи rhuPH20, описані в US 2005/0260186 та US 2006/0104968. В одному аспекті sHASEGP скомбіновані з однією або більше додатковими глікозаміногліканазами, такими як хондроїтинази.

Приклади ліофілізованих композицій антитіл описані в US 6,267,958. Водні композиції антитіл включають описані в US 6,171,586 та WO 2006/044908, де останні композиції містять гістидин-ацетатний буфер.

Описаний тут склад також може містити більше ніж одну діючу речовину, якщо це необхідно для конкретного показання, яке лікують, переважно речовини з комплементарним впливом, які не впливають негативно одна на одну. Такі активні інгредієнти, як правило, присутні в комбінації у кількостях, які є ефективними для поставленої мети.

Діючі речовини можуть міститися у мікрокапсулах, приготованих, наприклад, за допомогою методів коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад, гідроксиметилцелюлози або желатино-мікрокапсул та полі-(метилметакрилат) мікрокапсул, відповідно, у колоїдних системах доставки лікарських засобів (наприклад, ліпосомах, мікросферах альбуміну, мікроемульсіях, наночастинках та нанокапсулах) або в макроемульсіях. Такі техніки описані у Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-те видання, Osol, A. (ed.) (1980).

Можна приготувати препарати для тривалого вивільнення. Придатні приклади препаратів для тривалого вивільнення включають напівпроникні матриці твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, де зазначені матриці мають форму профільних виробів, напр., плівок або мікрокапсул.

Склади для введення *in vivo*, як правило, стерильні. Стерильності можна досягти, напр., шляхом фільтрації через стерилізуючі фільтраційні мембрани.

Е. Терапевтичні способи та композиції

Будь-яке із наданих тут антитіл до TfR можна застосовувати у лікарських способах. В одному з аспектів надане антитіло до TfR для застосування як лікарського засобу. Наприклад, винаходом забезпечено спосіб транспортування лікарської сполуки через гематоенцефалічний бар'єр, що включає експонування антитіла до TfR, сполученого з лікарською сполукою (напр., мультиспецифічного антитіла, що зв'язує як TfR, так і мозковий антиген), у ГЕБ таким чином, щоб антитіло переносило приєднану лікарську сполуку через ГЕБ. В іншому прикладі винаходом забезпечено спосіб транспортування ліків від неврологічного порушення через гематоенцефалічний бар'єр, що включає експонування антитіла до TfR згідно винаходу, сполученого з ліками від порушення головного мозку (напр., мультиспецифічного антитіла, що зв'язує як TfR, так і мозковий антиген), у ГЕБ таким чином, щоб антитіло переносило приєднані ліки від неврологічного порушення через ГЕБ. В одному з варіантів виконання ГЕБ знаходиться у ссавця (напр., людини), напр. у такого, який має неврологічне порушення в тому числі, без обмежень: хворобу Альцгеймера (AD), інсульт, деменцію, м'язову дистрофію (MD), розсіяний склероз (MS), аміотрофний бічний склероз (ALS), муковісцидоз, синдром Ангельмана, синдром Лідла, хворобу Паркінсона, хворобу Піка, хворобу Педжета, рак, травму головного мозку тощо. В одному з варіантів виконання неврологічне порушення вибрано з: невротії, амілоїдозу, раку (напр., із залученням ЦНС або головного мозку), захворювання або розладу очей, вірусної чи мікробної інфекції, запалення (напр., ЦНС або головного мозку), ішемії, нейродегенеративного захворювання, судоми, поведінкового розладу, хвороби лізосомного накопичення та ін. Антитіла згідно винаходу особливо підходять для лікування таких неврологічних порушень завдяки їх здатності переносити один або декілька пов'язаних активних інгредієнтів/приєднаних терапевтичних сполук через ГЕБ в ЦНС/мозок, де знаходиться молекулярне, клітинне або вірусне/мікробне підґрунтя таких порушень. Невротичні розлади – це захворювання або аномалії нервової системи, що характеризуються невідповідним або неконтрольованим сигналом нервів або його відсутністю, і включають, але не обмежуються ними, хронічні болі (в тому числі ноцицептивний біль), біль, спричинений пошкодженням тканин організму, включаючи біль, пов'язаний з раком, невротичні болі (біль, викликаний аномаліями нервів, спинного мозку чи головного мозку) та психогенні болі (цілком або в основному пов'язані з психологічним розладом), головний біль, мігрень, невротію та симптоми і синдроми, які часто супроводжують подібні невротичні розлади, такі як запаморочення або нудота.

Для невротичного розладу може бути вибраний неврологічний препарат-анальгетик, який охоплює, але не обмежується ними, наркотичний/опіоїдний анальгетик (тобто морфін, фентаніл, гідрокодон, меперидин, метадон, оксиморфон, пентазоцин, пропоксифен, трамадол, кодеїн та оксикодон), нестероїдний протизапальний препарат (НПЗП) (тобто ібупрофен, напроксен, диклофенак, дифлунісал, етодолак, фенпрофен, флурбіпрофен, індометацин, кеторолак,

мефенамова кислота, мелоксикам, набуметон, оксапрозін, піроксикам, суліндак та толметин), кортикостероїд (тобто кортизон, преднізон, преднізолон, дексаметазон, метилпреднізолон і тріамцинолон), антимігренозний агент (тобто суматриптин, алмотриптан, фроватриптан, суматриптан, різатриптан, елетриптан, золмітриптан, дигідроерготамін, елетриптан та ерготамін), ацетамінофен, саліцилат (тобто аспірін, холіну саліцилат, магнію саліцилат, дифлунісал і сальсалат), протисудомний засіб (тобто карбамазепін, клоназепам, габапентин, ламотриджин, прегабалін, тіагабін і топірамат), анестетик (тобто ізофлуран, трихлоретилен, галотан, севофлуран, бензокаїн, хлоропрокаїн, кокаїн, циклометикаїн, диметоккаїн, пропоксікаїн, прокаїн, новокаїн, пропаракаїн, тетракаїн, артикаїн, бупівакаїн, картікаїн, цинхокаїн, етидокаїн, левобупівакаїн, лідокаїн, мелівакаїн, піперокаїн, прілокаїн, ропівакаїн, тримекаїн, сакситоксин та тетродотоксин) та сох-2-інгібітор (тобто целекоксиб, рофекоксиб та валдекоксиб). Для невропатичного розладу із запамороченням може бути вибраний неврологічний препарат проти запаморочень, включаючи, але не обмежуючись ними, меклізин, дифенгідраміні, прометазин та діазепам. Для невропатичного розладу із нудотою може бути вибраний неврологічний препарат проти нудоти, включаючи, але не обмежуючись ними, прометазин, хлорпромазин, прохлорперазин, триметобензамід та метоклопрамід.

Амілоїдози - це група захворювань та розладів, пов'язаних з позаклітинними білковими відкладеннями в ЦНС, включаючи, але не обмежуючись ними, вторинний амілоїдоз, віковий амілоїдоз, хворобу Альцгеймера (AD), легке когнітивне порушення (MCI), деменцію з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий мозковий крововилив з амілоїдозом (голландський тип); комплекс паркінсонічної діменції Гуама, церебральну амілоїдну ангіопатію, хворобу Гантінгтона, прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хворобу Крейцфельдта-Якоба, хворобу Паркінсона, трансмісивну губчасту енцефалопатію, ВІЛ-пов'язану деменцію, аміотрофічний бічний склероз (ALS), міозит-зі включеннями (IBM) та очні захворювання, пов'язані з відкладенням бета-амілоїду (тобто дегенерація жовтої плями, пов'язана з друзами оптична невропатія та катаракта).

Для амілоїдозу може бути вибраний неврологічний препарат, який охоплює, але не обмежується цим, антитіло чи іншу зв'язувальну молекулу (включаючи, але не обмежуючись ними, малу молекулу, пептид, аптамер або інший білковий зв'язувач), який специфічно зв'язується з мішенню, вибраною з: бета-секретази, тау-білка, пресеніліну, білка-попередника амілоїду або його частин, бета-амілоїдного пептиду або його олігомерів або фібрил, рецептора смерті 6 (DR6), рецептора кінцевих продуктів посиленого глікозилювання (RAGE), паркіну і гантініну; інгібітор холінергестери (тобто галантамін, донепезил, ривастигмін і такрин); антагоніст рецептора NMDA (тобто, мемантин), деплетор моноаміну (тобто тетрабеназин); ерголоїду мезилат; антихолінергічний агент проти паркінсонізму (тобто проциклідін, дифенгідраміні, тригексилфенідил, бензтропін, біпериден та тригексифенідил); дофамінергічний агент проти паркінсонізму (тобто ентакапон, селегілін, праміпексол, бромкриптин, ротиготин, селегілін, ропінірол, разагілін, апоморфін, карбідопа, леводопа, перголід, толкапон та амантадин); тетрабеназин; протизапальний засіб (включаючи, але не обмежуючись ним, нестероїдний протизапальний препарат (тобто індометацин та інші сполуки, перелічені вище), гормон (тобто естроген, прогестерон і лейпролід), вітамін (тобто фолат і нікотинамід), димеболін, гомотаурин (тобто 3-амінопропансульфонова кислота, ЗАПС), модулятор активності серотонінових рецепторів (тобто ксаліпроден); інтерферон та глюкокортикоїд.

Рак ЦНС характеризується аберантною проліферацією однієї або кількох клітин ЦНС (тобто нервової клітини) і включає, але не обмежується ними, гліому, мультиформну гліобластому, менингіому, астроцитому, акустичну неврому, хондрому, олігодендрогліому, медулобластому, гангліогліому, шванному, нейрофіброму, нейробластому та екстрадуральну, інтрамедулярну, інтрадуральну пухлину або метастази в ЦНС периферичних пухлин, таких як CD20- або HER2-позитивні пухлини.

Для раку може бути обраний неврологічний препарат, який є хіміотерапевтичним агентом.

Приклади хіміотерапевтичних агентів включають алкілювальні агенти, такі як тіотепа та циклофосфамід CYTOXAN®; алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азириди, такі як бензодопа, карбоквон, метуредопа та уредопа; етиленіміни та метиламеламіни, включаючи альтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід та триметилломеламін; ацетогеніни (особливо булатацин і булатацінон); дельта-9-тетрагідроканабінол (дронабінол, MARINOL®); бета-лапазон; лапахол; колхіцини; бетулінову кислоту; камптотецин (включаючи синтетичний аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (іринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин і 9-амінокамптотецин); бріостатин; калістатин; CC-1065 (включаючи його синтетичні аналоги адозелезин, карцелезин та бізелезин); подофілотоксин; подофілінову кислоту; теніпозид; криптофіцини (особливо криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги, KW-2189 і CB1-TM1); елеутеробін; панкратістатин; саркодиктин; спонгістатин; азотисті іприти, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, мехлоретамін оксиду гідрохлорид, мелфалан, новембічін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урамустин; нітрозосечовини, такі як кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, німустин та ранімустин; антибіотики, такі як ендійнові антибіотики (наприклад,

каліхеаміцин, особливо каліхеаміцин гамма II та каліхеаміцин омега II (див., напр., Angew.Chem.Intl. Ed. Engl., 33 (1994) 183-186); динеміцин, включаючи динеміцин А; еспераміцин; а також хромофори неокарциностатину та хромофори споріднених хромопротеїнових ендінових антибіотиків), аклациноміцини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцини, карабіцин, карміноміцин, карциномілін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-*L*-норлейцін, ADRIAMYCIN® доксорубіцин (у тому числі морфоліно-доксорубіцин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, 2-піроліно-доксорубіцин та дезоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, мітоміцини, такі як мітоміцин С, мікофенольну кислоту, ноғаламіцин, олівоміцини, пеппоміцин, потфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зіностатин, зорубіцин; анти-метаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурину, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; аналоги піримідину, такі як анцитабін, азацитидин, 6-25 азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксиуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, дромостанолон пропіонат, епітіостанол, мепітіостан, тестолактон; засоби, що пригнічують наднирники, такі як аміноглутетимід, мітотан, трилостан; замінник фолієвої кислоти, такий як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфамід глікозид; амінолевулінову кислоту; енілурацил; амсакрин; бестрабуцил; бісантрен; едатраксат; дефофамін; демеколцин; діазиквон; ельфортнітин; еліптінію ацетат; епотилон; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовина; лентинан; лонідаїнін; майтанзиноїди, такі як майтанзин та анзамітоцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітраерин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лозоксантрон; 2-етилгідразид; прокарбазин; полісахаридний комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; шизофіран; спірогерманій; тенуазонову кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриетиламін, трихотецени (особливо Т-2 токсин, верракурин А, роридин А та ангуїдин), уретан, віндезин (ELDISINE®, FILDESIN®), дакарбазин, маномустин, мітобронітол, мітолактол, 5-піпоброман, гацитозин, арабінозид ("Ara-C"), тіотепа, таксоїди, наприклад, TAXOL® паклітаксел (Bristol-Myers-Squibb Oncology, Принстон, NJ), ABRAXANETM, наночастинковий склад паклітакселу на основі альбуміну без кремофору (American Pharmaceutical Partners, Шаумберг, Іллінойс) і TAXOTERE® доцетаксел (Rhône-Poulenc Roger, Antony, Франція), хлоранбуцил, гемцитабін (GEMZAR®), 6-тіогуанін, меркаптопурин, метотрексат, платинові аналоги, такі як цисплатин і карбоплатин, вінбластин (VELBAN®), платина, етопозид (VP-16), іфосфамід, мітоксантрон, вінкристин (ONCOVIN®), оксаліплатин, лейковоїн, вінорелбін (NAVELBINE®), новантрон, едатрексат, дауноміцин, аміноптерин, ібандронат, інгібітор топоізомерази RFS 2000, дифформетилорнітин (ДФМО), ретиноїди, такі як ретиноєва кислота; капецитабін (XELODA®); фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-чого з вищеперерахованих; а також комбінації двох або більше вищезгаданих засобів, такі як СНОР, аббревіатура для комбінованої терапії циклофосфамідом, доксорубіцином, вінкристином та преднізолоном, а також FOLFOX, скорочення для протоколу лікування оксаліплатином (ELOXATINTM) у поєднанні з 5-ФУ і лейковоїном.

Також під це визначення хіміотерапевтичних агентів підпадають антигормональні агенти, які чинять регулювання, зменшення, блокування або інгібування ефектів гормонів, що можуть сприяти росту раку, і часто вводяться у вигляді системного або цільнотільного лікування. Вони й самі можуть бути гормонами. Приклади включають антиестрогенні та селективні модулятори рецепторів естрогену (SERM), включаючи, наприклад, тамоксифен (включаючи NOLVADEX® тамоксифен), EVISTA® ралоксифен, дролоксифен, 4-гідрокситамоксифен, тріоксифен, кеоксифен, LY117018, онапрістон та ФАРЕСТОН® тореміфен; антипрогестерони; пригнічувачі рецепторів естрогенів (ERD); агенти, які функціонують для придушення або зупинки яєчників, наприклад, агоністи гормону, що вивільняє лютеїнізуючий гормон (LHRH), такі як LUPRON® та ELIGARD® лейпролід ацетат, гoserеліну ацетат, бусереліну ацетат і триптерелін; інші антиандрогенні засоби, такі як флутамід, нілутамід та бікалутамід; і інгібітори ароматази, які інгібують фермент ароматазу, що регулює вироблення естрогену в наднирниках, такі як, наприклад, 4(5)-імідазоли, аміноглутетимід, MEGASE® мегестролу ацетат, AROMASIN® екземестан, форместан, фадрозол, RIVISOR® ворозол, FEMARA® летрозол та ARIMIDEX® анастрозол. Крім того, таке визначення хіміотерапевтичних агентів включає бісфосфонати, такі як клодронат (наприклад, BONEFOS® або OSTAC®), DIDROCAL® етидронат, NE-58095, ZOMETAX® золедроновна кислота/золедронат, FOSAMAX® алендронат, AREDIA® памідронат, 5 SKELID® тілудронат або ризедронат ACTONEL®; а також троксацитабін (1,3-діоксолановий аналог нуклеозиду цитозину); антисенс-олігонуклеотиди, зокрема ті, які інгібують експресію генів у сигнальних шляхах, пов'язаних з аберантною проліферацією клітин, таких як, наприклад, PKC-альфа, Raf, H-Ras та рецептор епідермального фактора росту (EGF-R); вакцини, такі як вакцина THERATOPE® та вакцини генної терапії, наприклад, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® та вакцина VAXID®; LURTOTECAN® інгібітор топоізомерази 1; ABARELIX® gmRH; лапатиніб дітозилат (низькомолекулярний інгібітор подвійної тирозинкінази ErbB-2 та EGFR, також відомий як GW572016); і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-чого з вищеперерахованих.

Інша група сполук, які можуть бути обрані як неврологічні лікарські засоби для лікування або

профілактики раку, являє собою протиракові імуноглобуліни (включаючи, але не обмежуючись ними, трастузумаб, пертузумаб, бевацизумаб, алемтузумаб, цетуксимаб, гемтузумаб озогаміцин, ібрітумомаб тіуксетан, панітумомаб та ритуксимаб). У деяких випадках антитіла у поєднанні з токсичною міткою або кон'югатом можуть бути використані для націлювання та вбивання потрібних клітин (тобто ракових клітин), включаючи, але не обмежуючись ними, тозитумомаб з 131I-радіоактивною міткою або трастузумаб емтанзин.

Очні захворювання або розлади - це захворювання або розлади ока, яке для цілей даної заявки розглядається як орган ЦНС, відокремлений ГЕБ. Очні захворювання або розлади включають, але не обмежуються ними, розлади склери, рогівки, райдужної оболонки та циліарного тіла (тобто склерит, кератит, виразка рогівки, зношування рогівки, снігова сліпота, травма ока електричною дугою, кератит Тайджесона, неоваскуляризацію рогівки, дистрофію Фукса, кератоконус, сухий кератокон'юнктивіт, ірит і увеїт), порушення кришталика (тобто катаракту), порушення судинної оболонки та сітківки ока (наприклад, відшарування сітківки, ретиноскозіс, гіпертонічна ретинопатія, діабетична ретинопатія, ретинопатія, ретинопатія недоношених, пов'язана з віком макулярна дегенерація, макулярна дегенерація (мокра або суха), епіретинальна мембрана, пігментний ретиніт та макулярний набряк), глаукома, мушки перед очима, порушення зорового нерва та візуальних шляхів (тобто спадкова оптична нейропатія Лебера та друзи диска зорового нерва), розлади очних м'язів / акомодатії бінокулярного руху / рефракції (тобто косоокість, офтальмопарез, прогресуюча зовнішня офтальмоплегія, езотропія, екзотропія, гіперметропія, міопія, астигматизм, анізетропія, пресбіопія та офтальмоплегія), порушення зору та сліпота (тобто амбліопія, вроджений амавроз Левера, скатома, колірна сліпота, ахроматопсія, куряча сліпота, сліпота, річкова сліпота та мікроофтальмія/колобома), ефект червоних очей, зіниця Аргайла-Робертсона, кератомікоз, ксерофтальмія та анданіридія.

Для очної хвороби або розладу може бути вибраний неврологічний препарат, який є антиангіогенним офтальмологічним агентом (наприклад, бевацизумаб, ранібізумаб і пегаптаніб), офтальмологічним глаукомічним агентом (тобто карбахол, епінефрин, демекарію бромід, апраклонідин, бримонідин, брінзоламід, левобунолол, тімолол, бетаксол, дорзоламід, біматопрост, картеолол, метипранолол, дипівефрін, травопрост та латанопрост), інгібітором карбоангідази (тобто метазоламід та ацетазоламід), офтальмологічним антигістамінним (тобто нафазолін, фенілефрін і тетрагідрозолін), очним лубрикантом, офтальмологічним стероїдом (тобто фторметолон, преднізолон, лотепреднол, дексаметазон, дифлупреднат, римексолон, флуоцинолон, медризон і триамцинолон), офтальмоанестетичним препаратом (тобто лідокаїн, пропаракаїн і тетракаїн), офтальмологічним антиінфекційним препаратом (тобто левофлоксацин, гатіфлоксацин, ципрофлоксацин, моксифлоксацин, хлорамфенікол, бацитрацин / поліміксин В, сульфациламід, тобраміцин, азитроміцин, безифлоксацин, норфлоксацин, сульфізоксазол, гентаміцин, ідоксуридин, еритроміцин, натаміцин, граміцидин, неоміцин, офлоксацин, трифлуридин, ганцикловір, відарабін), офтальмологічним протизапальним засобом (тобто непафенак, кеторолак, флурбіпрофен, супрофен, циклоспорин, триамцинолон, диклофенак та бромфенак) і офтальмологічним антигістамінним або протизапальним (наприклад, кетотіфен, олопатадин, епінастин, нафазолін, кромолін, тетрагідрозолін, пеміроласт, бепотастин, нафазолін, фенілефрін, недокроміл, лодоксамід, фенілефрин, емедастин та азеластин).

Вірусні або мікробні інфекції ЦНС включають, але не обмежуються ними, інфекції вірусами (наприклад, грипом, ВІЛ, поліовірусом, краснухою), бактеріями (наприклад, *Neisseria sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, *E. coli*, *S. aureus*, *Pneumococcus sp.*, *Meningococcus sp.*, *Haemophilus sp.* та *Mycobacterium tuberculosis*) та іншими мікроорганізмами, такими як грибки (тобто дріжджі, *Cryptococcus neoformans*), паразити (тобто *Toxoplasma gondii*) або амебами, що призводять до патологічних ЦНС, включаючи, але не обмежуючись цим, менінгіт, енцефаліт, мієліт, васкуліт та абсцес, які можуть бути гострими або хронічними.

Для вірусного або мікробного захворювання може бути вибраний неврологічний препарат, який включає, але не обмежується ними, противірусну сполуку (включаючи, але не обмежуючись цим, адамантанові противірусні препарати (тобто, римантадин та амантадин), антивірусний інтерферон (тобто пег-інтерферон альфа-2b), антагоніст хемокінових рецепторів (тобто маравірок), інгібітор переносу інтегразної нитки (тобто, ралтегравір), інгібітор нейрамідіази (тобто осельтамівір і занамівір), нуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази (тобто ефавіренц, етравірін, делавірдин і невірапін), нуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази (тенофовір, абакавір, ламівудин, зидовудин, ставудін, ентекавір, емтрицитабін, адефовір, зальцитабін, тельбівудін і діданозин), інгібітор протеази (тобто дарунавір, атазанавір, фосампренавір, тіпранавір, ритонавір, нельфінавір, ампренавір, індінавір і саквінавір), пуриновий нуклеозид (тобто валацикловір, фамцикловір, ацикловір, рибавірін, ганцикловір, валганцикловір і цидофовір), та різні противірусні препарати (тобто енфувіриді, форкарнет, палвізумаб та фомівірсен), антибіотик (включаючи, але не обмежуючись цим, амінопеніцилін (тобто амоксицилін, ампіцилін, оксацилін, нафцилін, клоксацилін, диклоксацилін, флюоксацилін, темоцилін, азлоцилін, карбеніцилін, тикарцилін, мезлоцилін, піперацилін і

бакампіцилін), цефалоспорин (тобто цефазолін, цефалексин, цефалотін, цефамондол, цефтриаксон, цефотаксим, цефподоксим, цефтазидим, цефадроксил, цефрадин, лоракарбеф, цефотетан, цефуроксим, цефпрозіл, цефаклор і цефокситин), карбапенем/пенем (тобто іміпенем, меропенем, ертапенем, фаропенем та доріпенем), монобактам (тобто азтреонам, тигемонам, норкардицин А і табтоксинін-бета-лактамі), інгібітор бета-лактамази (тобто клавуланова кислота, тазобактам і сульбактам) у поєднанні з іншим бета-лактамним антибіотиком, аміноглікозид (тобто амікацин, гентаміцин, канаміцин, неоміцин, нетилміцин, стрептоміцин, тобраміцин і паромоміцин), анзаміцин (наприклад, гелданаміцин та гербіміцин), карбацефем (тобто лоракарбеф), глікопептиди (тобто тікопланін і ванкоміцин), макролід (тобто азитроміцин, кларитроміцин, диритроміцин, еритроміцин, рокситроміцин, тролеандоміцин, телітроміцин та спектіноміцин), монобактам (тобто, азтреонам), хінолон (тобто, цiproфлоксацин, еноксацин, гатифлоксацин, левофлоксацин, ломефлоксацин, моксифлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, тровафлоксацин, грепафлоксацин, спарфлоксацин і темафлоксацин), сульфонаміди (тобто мафенід, сульфонамідохризоїдин, сульфацетамід, сульфадіазин, сульфаметізол, сульфаніламід, сульфасалазин, сульфізоксазол, триметоприм, триметоприм і сульфаметоксазол), тетрациклін (тобто, тетрациклін, демеклоциклін, доксициклін, міноциклін і окситетрациклін), протипухлинний або цитотоксичний антибіотик (тобто, доксорубіцин, мітоксантрон, блеоміцин, даунорубіцин, дактіноміцин, епірубіцин, ідарубіцин, плікаміцин, мітоміцин, пентастатин та валрубіцин) та різні антибактеріальні сполуки (тобто бацитрацин, колістин та поліміксин В)), протигрибкові (тобто метронідазол, нітазоксанід, тинідазол, хлороквін, йодхінол та паромоміцин) і антипаразитарні (включаючи, але не обмежуючись ними, хінін, хлороквін, амодіакін, пріметамін, сульфадоксин, прогуаніл, мефлоквін, атоваквон, примаквін, артемезинін, галофантрин, доксициклін, кліндаміцин, мебендазол, пірантелу памоат, тіабендазол, діетилкарбамазин, івермектин, рифампін, амфотерицин В, меларсопрол, ефорнітин і альбендазол).

Запалення ЦНС включає, але не обмежується ними, запалення, спричинене пошкодженням ЦНС, яке може бути фізичною травмою (наприклад, унаслідок аварії, хірургії, травми головного мозку, пошкодження спинного мозку, струсу мозку) та пошкодженням через або пов'язаним з одним або декількома іншими захворюваннями або порушеннями ЦНС (наприклад, абсцесом, раком, вірусними або мікробними інфекціями).

Для запалення ЦНС може бути вибраний неврологічний препарат, спрямований на саме запалення (тобто нестероїдний протизапальний засіб, такий як ібупрофен або напроксен), або ж такий, що лікує основну причину запалення (тобто агент антивірусної чи протиракової дії).

Ішемія ЦНС тут і далі стосується групи розладів, що стосуються аберантного кровотоку або судинної поведінки в мозку або їх причин, і включає, але не обмежується ними: місцеву ішемію мозку, глобальну ішемію мозку, інсульт (тобто субарахноїдальний крововилив та внутрішньомозковий крововилив), а також аневризму.

Для ішемії може бути вибраний неврологічний препарат, що включає, але не обмежується ними, тромболітики (тобто урокіназа, альтеплаза, ретеплаза та тенектеплаза), інгібітори агрегації тромбоцитів (тобто аспірин, цилостазол, клопідогрел, прасугрел та дипіридамоп), статини (наприклад, ловастатин, правастатин, флувастатин, росувастатин, аторвастатин, симвастатин, церивастатин і пітавастатин), а також сполуки для поліпшення кровотоку або еластичності судин, включаючи, наприклад, препарати для лікування артеріального тиску.

Нейродегенеративні захворювання - це група захворювань та розладів, пов'язаних із втратою функції або смертю нервових клітин у ЦНС, яка включає але не обмежується наступними: аденолейкодистрофія, хвороба Александра, хвороба Альпера, аміотрофічний бічний склероз, атаксія телангіектазія, хвороба Баттен, синдром Кокейна, кортикобазальна дегенерація, дегенерація, спричинена або пов'язана з амілоїдозом, атаксія Фрідріха, лобно-скронева дегенерація долей, хвороба Кеннеді, множинна системна атрофія, розсіяний склероз, первинний бічний склероз, прогресуючий над'ядерний параліч, спінальна м'язова атрофія, поперечний мієліт, хвороба Рефсума та спінально-церебелярна атаксія.

Для нейродегенеративних захворювань може бути вибраний неврологічний препарат, який є гормоном росту або нейротрофним чинником; приклади включають, але не обмежуються, нейротрофний фактор з мозку (BDNF), фактор росту нервів (NGF), нейротрофін-4/5, фактор росту фібробластів (FGF)-2 та інші FGF, нейротрофін (NT)-3, еритропоєтин (EPO), фактор росту гепатоцитів (HGF), епідермальний фактор росту (EGF), трансформувальний фактор росту (TGF)-альфа, TGF-бета, фактор росту ендотелію судин (VEGF), антагоніст рецептора інтерлейкіну-1 (IL-1ra), циліарний нейротрофний фактор (CNTF), гліальний нейротрофний фактор (GDNF), нейротурин, тромбоцитарний фактор росту (PDGF), герегулін, нейрегулін, артемін, персефін, інтерлейкіни, нейротрофний фактор, одержаний з лінії гліальних клітин (GFR), гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (CSF), гранулоцитарний макрофагальний-CSF, нетрини, кардіотропін-1, їжаки, фактор-інгібітор лейкемії (LIF), мідкін, плейотрофін, кісткові морфогенетичні білки (BMP), нетрини, сапозини, семафорини та фактор стовбурових клітин (SCF).

Захворювання та розлади ЦНС, пов'язані із судомами, включають неналежну і/або ненормальну

електропровідність в ЦНС і включають, але не обмежуються ними, епілепсію (тобто відсутність судом, атонічні судоми, доброякісну роландичну епілепсію, дитячі абсанси, клонічні судоми, складні часткові судоми, епілепсію лобної частки, фебрильні судоми, спазми немовлят, ювенільну міоклонічну епілепсію, ювенільну абсансну епілепсію, синдром Леннокса-Гасто, синдром Ландау-Клеффнера, синдром Драве, синдром Отахара, Західний синдром, міоклонічні судоми, мітохондріальні розлади, прогресуючі міоклонічні епілепсії, психомоторні судоми, рефлекторну епілепсію, синдром Расмуссена, прості часткові судоми, вторинні генералізовані судоми, епілепсію скроневої частки, тоніко-клонічні судоми, тонічні судоми, психомоторні напади, лімбічну епілепсію, парціальні напади, генералізовані напади судом, епілептичний статус, абдомінальну епілепсію, акінетичні судоми, вегетативні судоми, масивний двосторонній міоклонус, катаменіальну епілепсію, крапельні судоми, емоційні судоми, фокальні судоми, геластичні напади, Джексонівський марш, хвороба Лафори, моторні судоми, мультифокальні судоми, нічні судоми, світлочутливі судоми, псевдосудоми, органолептичні судоми, приховані судоми, судомні випадки, судомні напади та зорові рефлекторні судоми). Для пов'язаного з судомами захворювання може бути обраний неврологічний препарат, який є протисудомним або протиепілептичним, у тому числі, але не обмежуючись ними, барбітуратні антиконвульсанти (тобто примідон, метарбітал, мефобарбітал, аллобарбітал, амобарбітал, апробарбітал, альфенал, барбітал, бралобарбітал та фенобарбітал), бензодіазепінові антиконвульсанти (тобто діазепам, клоназепам і лоразепам), карбаматні антиконвульсанти (тобто фельбамат), антиконвульсанти-інгібітори карбоангідрази (тобто ацетазоламід, топірамат і зонізамід), дибензазепінові антиконвульсанти (тобто, руфінамід, карбамазепін і окскарбазепін), похідні жирної кислоти (тобто дивальпроекс та вальпроєва кислота), аналоги гамма-аміномасляної кислоти (тобто прегабалін, габапентин і вігабатрин), інгібітори зворотного захоплення гамма-аміномасляної кислоти (тобто тіагабін), інгібітори трансаміназ гамма-аміномасляної кислоти (наприклад, вігабатрин), гідантоїни (тобто фенітоїн, етотолін, фосфенітоїн та мефенітоїн), різні антиконвульсанти (тобто, лакозамід та сульфат магнію), прогестини (тобто прогестерон), оксазолідиндіонові антиконвульсанти (наприклад, параметадіон та триметадіон), піролідінові антиконвульсанти (тобто леветірацетам), сукцинімідні антиконвульсанти (тобто, етосукцимід і метсукцимід), триазінові антиконвульсанти (тобто ламотриджін) і сечовинні антиконвульсанти (тобто фенацемід і фенетурид).

Поведінкові розлади - це порушення ЦНС, що характеризуються аберантною поведінкою хворого і включають, але не обмежуються ними: розлади сну (тобто безсоння, парасомнії, нічні жахи, порушення циркадних ритмів та нарколепсія), розлади настрою (депресія, суїцидальна депресія, тривога, хронічні афективні розлади, фобії, панічні атаки, obsесивно-компульсивні розлади, дефіцит гіперактивності та уваги (СДУГ), дефіцит уваги (ДУ), синдром хронічної втоми, агорафобія, посттравматичний стресовий розлад, біполярний розлад), розлади харчування (тобто анорексія або булімія), психози, розлади розвитку (наприклад, аутизм, синдром Ретта, синдром Аспергера), розлади особистості та психотичні розлади (тобто шизофренія, марення та інше).

Для поведінкового розладу неврологічний лікарський засіб може бути вибраний зі сполук, які модифікують поведінку, які включають, але не обмежуються ними, атипичний антипсихотик (тобто, рисперідон, оланзапін, априпіразол, кветіапін, паліперидон, азенапін, клозапін, ілоперидон і зіпразидон), фенотіазінові антипсихотики (тобто прохлорперазин, хлорпромазин, флуфеназин, перфеназин, трифлуоперазин, тіорідазин і мезорідазин), тіоксантен (тобто тіотіксен), різні антипсихотичні засоби (наприклад, пімозид, літій, моліндон, галоперидол і локсапін), селективний інгібітор зворотного захоплення серотоніну (наприклад, циталопрам, есциталопрам, пароксетин, флуоксетин і сертралін), інгібітор зворотного захоплення серотоніну-норадреналіну (тобто, дулоксетин, венлафаксин, десвенлафаксин, трициклічний антидепресант (тобто докsepін, кломіпрамін, амоксапін, нортриптилін, амітриптилін, триміпрамін, іміпрамін, протриптилін і десіпрамін), тетрациклічний антидепресант (тобто міртазапін і мапротилін), фенілпіперазиновий антидепресант (тобто тразодон і нефазодон), інгібітор моноаміноксидази (тобто ізокарбоксазид, фенелзин, селегілін і транілципромін) бензодіазепін (тобто, альпразолам, естазолам, флуразептам, клоназепам, лоразепам та діазепам), інгібітор зворотного захоплення норадреналіну і допаміну (тобто бупропіон), стимулятор ЦНС (тобто фентермін, діетилпропіон, метамфетамін, декстроамфетамін, амфетамін, метилфенідат, дексметилфенідат, лісдексамфетамін, модафініл, пемолін, фендіметразин, бензфетамін, фендіметразин, армодафініл, діетилпропіон, кофеїн, атомоксетин, доксапрам і мазіндол), анксиолітичний / седативний / гіпнотичний засіб (включаючи, але не обмежуючись ними, барбітурат (тобто, секобарбітал, фенобарбітал та мефобарбітал), бензодіазепін (як описано вище) та різні анксиолітичні / седативні / гіпнотичні засоби (тобто дифенгідрамін, оксібат натрію, залеплон, гідроксизин, хлоралгідрат, аолпідем, буспірон, докsepін, есзопіклон, рамелтеон, мепробамат та етрокловінол)), секретин (див., напр., Ratliff-Schaub та ін., *Autism* 9 (2005) 256-265), опіоїдний пептид (див., напр., Cowen та ін., *J. Neurochem*, 89 (2004) 273-285) та нейропептид (див., напр., Hethwa та ін., *Am. J. Physiol.*, 289 (2005) E301-305).

Розлади лізосомного накопичення - це порушення метаболізму, які в деяких випадках пов'язані з ЦНС або мають симптоми, специфічні для ЦНС; такі захворювання включають, але не обмежуються

ними: хворобу Тея-Сакса, хворобу Гоше, хворобу Фабрі, мукополісахаридоз (типи I, II, III, IV, V, VI та VII), хворобу накопичення глікогену, GM1-гангліозидоз, метакроматичну лейкодистрофію, хворобу Фарбера, лейкодистрофію Канавана та нейрональні цероїдні ліпофуцинози типів 1 і 2, хворобу Німанна-Піка, хворобу Помпе та хворобу Краббе.

Для захворювання лізосомного накопичення може бути обраний неврологічний препарат, який сам по собі є ферментом, який порушено у захворюванні, або імітує його активність іншим чином. Приклади рекомбінантних ферментів для лікування розладів лізосомного накопичення включають, але не обмежуються ними, викладені, наприклад, в публікації патентної заявки США № 2005/0142141 (тобто альфа-L20-ідуронідаза, ідуронат-2-сульфатаза, N-сульфатаза, альфа-N-ацетилглюкозамінідаза, N-ацетилгалактозамін-6-сульфатаза, бета-галактозидаза, арилсульфатаза B, бета-глюкуронідаза, кислотна альфа-глюкозидаза, глюкоцереброзидаза, альфа-галактозидаза A, гексозамінідаза A, кислотна сфінгомієліназа, бета-галактоцереброзидаза, бета-галактозидаза, арилсульфатаза A, кислотна керамідаза, аспартацилаза, тіоестераза 1 пальмітоїл-білка і трипептидиламінопептидаза 1).

В одному аспекті антитіло згідно винаходу використовують для виявлення неврологічного розладу до початку симптомів та/або для оцінки тяжкості або тривалості захворювання або порушення. В одному аспекті антитіло дозволяє виявити та/або візуалізувати неврологічний розлад, включаючи візуалізацію методом рентгенографії, томографії або магнітно-резонансної томографії (МРТ).

В одному з аспектів надане низькоафінне антитіло до TfR згідно винаходу для застосування як лікарського засобу. У подальших аспектах надане низькоафінне антитіло до TfR для застосування у лікуванні неврологічного захворювання або розладу (напр., хвороби Альцгеймера) без виснаження червоних кров'яних клітин (тобто ретикулоцитів). У деяких варіантах виконання надане низькоафінне антитіло до TfR для застосування у способі лікування, описаному в даному описі. У деяких варіантах виконання винахід забезпечує низькоафінне антитіло до TfR, модифіковане з метою підвищення його безпечності для використання в способі лікування індивідуума, який має неврологічне захворювання або розлад, що включає введення ефективної кількості антитіла до TfR (необов'язково приєднаного до ліків від неврологічного порушення). В одному з таких варіантів виконання спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента. У подальших варіантах здійснення винахід забезпечує антитіло проти TfR, модифіковане для підвищення безпечності його використання з метою зменшення або інгібування утворення амілоїдної бляшки у пацієнта, який перебуває в групі ризику або страждає на неврологічне захворювання або розлад (напр., на хворобу Альцгеймера). "Індивідуум" згідно з будь-яким з наведених вище варіантів виконання необов'язково є людиною. У певних аспектах антитіло до TfR згідно винаходу для застосування у способах даного винаходу покращує поглинання препарату від неврологічного порушення, з яким воно сполучене.

У подальшому аспекті винахід передбачає застосування низькоафінного антитіла до TfR за винаходом у виробництві або приготуванні лікарського засобу. В одному з варіантів виконання лікарський засіб призначений для лікування неврологічних захворювань або розладів. У подальшому варіанті виконання лікарський засіб призначений для застосування в способі лікування неврологічних захворювань або розладів, який включає введення індивідууму, що має неврологічне захворювання або розлад, ефективної кількості лікарського засобу. В одному з таких варіантів виконання спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента.

У подальшому аспекті винахід надає спосіб лікування хвороби Альцгеймера. В одному з варіантів виконання спосіб включає введення індивідууму, що має хворобу Альцгеймера, ефективної кількості мультиспецифічного антитіла згідно винаходу, яке зв'язує як BACE1, так і TfR, або як Abeta, так і TfR. В одному з таких варіантів виконання спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента. "Індивідуум" згідно з будь-яким з наведених вище варіантів виконання може бути людиною.

Антитіла до TfR згідно винаходу можуть бути використані в лікуванні як окремо, так і в комбінації з іншими агентами. Наприклад, антитіло до TfR згідно винаходу можна спільно вводити принаймні з одним додатковим терапевтичним агентом. У деяких варіантах виконання додатковий терапевтичний агент є терапевтичним агентом, ефективним для лікування того ж самого неврологічного порушення, для лікування якого використовується антитіло до TfR, або іншого порушення. Приклади додаткових терапевтичних агентів включають, але не обмежуються ними: різні неврологічні лікарські засоби, описані вище, інгібітори холінерастери (такі як донепезил, галантамін, ровастигмін і такрін), антагоністи NMDA-рецепторів (такі як мемантин), інгібітори агрегації пептиду бета-амілоїду, антиоксиданти, γ -секретазні модулятори, імітатори фактора росту нервів (NGF) або генна терапія NGF, агоністи PPAR γ , інгібітори HMS-CoA-редуктази (статини), ампакіни, блокатори кальцієвих каналів, антагоністи рецепторів ГАМК, інгібітори глікогенсинтазної кінази, внутрішньовенні імуноглобуліни, агоністи мускаринового рецептора, модулятори нікотинічних рецепторів, активна або пасивна імунізація пептиду бета-амілоїду, інгібітори фосфодіестерази, антагоністи серотонінового

рецептора та антитіла до пептиду амілоїду-бета. У деяких варіантах виконання принаймні один додатковий терапевтичний агент вибраний завдяки його здатності пом'якшити один або більше побічних ефектів неврологічного препарату.

У певних інших таких варіантах виконання принаймні один додатковий терапевтичний агент вибраний завдяки його здатності інгібувати або запобігати активації шляху комплементу при введенні антитіла до TfR. Приклади таких терапевтичних агентів включають, але не обмежуються ними, агенти, які перешкоджають здатності антитіла до TfR зв'язуватись з або активувати шлях комплементу, та агенти, які інгібують одну або декілька молекулярних взаємодій у шляху комплементу, і в загальному описані у Mollnes і Kirschfink (Molec. Immunol. 43 (2006) 107-121), причому вміст цього документа включений в дану заявку шляхом посилання.

Така вищезазначена комбінована терапія охоплює комбіноване введення (де два або більше терапевтичних агентів включені в одні й ті самі або окремі рецептури), а також окреме введення, і в цьому випадку введення антитіла за винаходом може відбуватися до, одночасно з і/або після введення додаткового терапевтичного агента та/або ад'юванта. В одному з варіантів виконання введення антитіла до TfR та введення додаткового терапевтичного агента відбувається в межах приблизно одного місяця, або в межах приблизно одного, двох або трьох тижнів, або в межах приблизно одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти або шести днів одне від одного. Антитіла даного винаходу також можуть бути використані в комбінації з іншими інтервенційними терапіями, такими як, але не обмежуючись ними, променева терапія, поведінкова терапія або інша терапія, відома в даній галузі і придатна для неврологічного розладу, що підлягає лікуванню або запобіганню.

Антитіло до TfR згідно винаходу (і будь-який додатковий терапевтичний агент) може вводиться будь-яким підходящим способом, включаючи парентеральний, внутрішньолегеневий та інтраназальний, і, якщо це необхідно для місцевого лікування, введення у місце ураження. Парентеральні інфузії включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревне або підшкірне введення. Дозування може здійснюватися будь-яким підходящим маршрутом, напр., ін'єкціями, такими як внутрішньовенна або підшкірна ін'єкція, залежно від того, чи є введення короткочасним або тривалим. Передбачено різноманітні графіки дозування, що включають, крім іншого, однократне або багаторазове введення в різних часових точках, болусне введення та пульсуючу інфузію.

Антитіла згідно винаходу рецептують, дозують та вводять у спосіб, який відповідає належній медичній практиці. Фактори для розгляду в цьому контексті включають конкретний розлад, який лікують, конкретний ссавець, котрого лікують, клінічний стан конкретного пацієнта, причину розладу, місце доставки агента, спосіб введення, графік введення та інші відомі лікарям фактори.

Антитіло не повинне, але необов'язково рецептується з одним або декількома агентами, які в даний час використовуються для запобігання або лікування цього порушення або для запобігання, пом'якшення або полегшення одного або декількох побічних ефектів введення антитіл. Ефективна кількість таких інших агентів залежить від кількості антитіл у складі препарату, типу розладу або лікування та інших факторів, описаних вище. Вони, як правило, застосовуються в тих самих дозах та тими самими шляхами введення, як описано в даному документі, або від приблизно 1 до 99 % дозувань, описаних у даному документі, або в будь-яких дозуваннях та будь-яким шляхом, який емпірично/клінічно визначається належним.

Для профілактики або лікування хвороби відповідна доза антитіла за винаходом (при застосуванні окремо або в комбінації з одним або декількома іншими додатковими терапевтичними агентами) буде залежати від типу хвороби, що підлягає лікуванню, типу антитіла, ступеня тяжкості та перебігу захворювання, чи антитіло вводять для профілактичних або терапевтичних цілей, попередньої терапії, клінічної історії пацієнта та відповіді на антитіло, і від розсуду лікуючого лікаря. Антитіло вводять пацієнтові одномоментно або протягом ряду процедур. Залежно від типу та тяжкості захворювання, кандидатом на початкову дозу введення пацієнтові може бути приблизно від 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, 0,1 мг/кг-10 мг/кг) антитіла, чи то за допомогою одного або декількох окремих прийомів, чи то безперервною інфузією. Одна типова добова доза може варіювати від приблизно 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше залежно від факторів, згаданих вище. Для повторних прийомів протягом декількох днів або довше, залежно від стану, лікування загалом буде продовжуватися, доки не буде бажаного пригнічення ознак захворювання. Один із прикладів дозування антитіла буде в діапазоні від приблизно 0,05 мг/кг до приблизно 40 мг/кг. Таким чином, пацієнтові можуть вводити одну або більше доз приблизно по 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг, 5,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 35 мг/кг або 40 мг/кг (або будь-яку їх комбінацію). Такі дози можуть вводити періодично, напр., кожен тиждень або кожні три тижні (напр., так, щоб пацієнт отримав від приблизно двох до приблизно двадцяти, або, напр., приблизно шість доз антитіла). Можна вводити початкову підвищену навантажувальну дозу, а потім одну або декілька нижчих доз. Проте корисними можуть виявитись і інші режими дозування. Слід розуміти, що один зі способів зменшення впливу на популяції ретикулоцитів шляхом введення антитіл до TfR полягає в тому, щоб змінити кількість або час введення таких доз, щоб у крові були присутні і взаємодіяли з ретикулоцитами в загальному менші

кількості циркулюючих антитіл. У одному необмежувальному прикладі менша доза антитіл проти TfR може бути введена з більшою частотою, ніж більш висока доза. Використовувана доза може бути збалансованою між кількістю антитіла, необхідного для доставки до ЦНС (яка пов'язана з афінністю антиген-специфічної частини антитіла до ЦНС), афінністю цього антитіла до TfR, і чи вводять разом або по черзі з антитілом сполуки, що захищають, стимулюють ріст і розвиток червоних клітин крові (тобто, ретикулоцитів), або сполуки, що інгібують шлях комплементу. Прогрес цієї терапії легко відслідкувати традиційними способами та аналізами, як описано в даному документі і як відомо в даній галузі.

Зрозуміло, що будь-який з вищенаведених складів або терапевтичних способів замість або додатково до антитіла до TfR може бути виконаний з використанням імунокон'югата згідно винаходу.

III. Промислові вироби

В іншому аспекті винаходу надано промисловий виріб, який містить матеріали, придатні для лікування, попередження і/або діагностики вищеописаних порушень. Промисловий виріб містить контейнер і етикетку або листок-вкладку на контейнері або пов'язані з ним. Придатні контейнери включають, наприклад, пляшечки, ампули, шприци, пакети з ВВ-розчином тощо. Контейнери можуть бути виготовлені з різних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер вміщує композицію, саму по собі або поєднану з іншою композицією, ефективною для лікування, запобігання та/або діагностики стану, і може мати стерильний порт доступу (наприклад, контейнер може бути пакетом для внутрішньовенного розчину або флаконом з пробкою, яку можна пробити підшкірною ін'єкційною голкою). Принаймні однією діючою речовиною в композиції є антитіло згідно винаходу. В етикетці або листку-вкладці вказується, що композиція використовується для лікування стану за вибором. Крім того, промисловий виріб може містити (а) перший контейнер із композицією, що міститься в ньому, де композиція містить антитіло за винаходом; і (б) другий контейнер з композицією, що міститься в ньому, де композиція містить додатковий цитотоксичний чи інший терапевтичний агент. Промисловий виріб у цьому варіанті виконання винаходу може додатково містити листок-вкладку, в якому зазначено, що композиції можуть бути використані для лікування конкретного стану. Альтернативно або додатково промисловий виріб може також містити другий (або третій) контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (БВДІ), фосфатно-сольовий буфер, розчин Рінгера та розчин декстрози. Він може додатково включати інші матеріали, бажані з комерційної та користувальницької точки зору, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки та шприци.

Зрозуміло, що будь-який з вищенаведених промислових виробів замість або додатково до антитіла до рецептора трансферину може включати імунокон'югат згідно винаходу.

IV. ПРИКЛАДИ

Далі викладено приклади способів та композицій згідно винаходу. Зрозуміло, що можуть практикуватися різні інші варіанти здійснення, з огляду на загальний опис, наведений вище.

Матеріали і методи

Технології рекомбінантної ДНК

Для маніпуляцій з ДНК використовували стандартні методи, описані у Sambrook, J. та ін., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Молекулярно-біологічні реактиви застосовували відповідно до інструкцій виробника.

Синтез генів та олігонуклеотидів

Бажані сегменти генів виготовляли хімічним синтезом у Geneart GmbH (Регенсбург, Німеччина). Синтезовані фрагменти генів клонували в плазміді E. coli для розмноження/ампліфікації. Послідовності ДНК субклонуваних фрагментів генів підтверджували секвенуванням ДНК. Альтернативно короткі синтетичні фрагменти ДНК збирали відпалом хімічно синтезованих олігонуклеотидів або за допомогою ПЛР. Відповідні олігонуклеотиди готували у metabion GmbH (Планегг-Мартінсрід, Німеччина).

Реактиви

Усі комерційні реактиви, антитіла та набори використовували відповідно до протоколу виробника, якщо не вказано інше.

Приклад 1

Імунізація кролів та мишей

Імунізація мишей

Мишей NMRI імунізували генетично з використанням плазмідного вектору експресії, що кодує повнорозмірний TfR людини або яванської макаки, шляхом внутрішньошкірного введення 100 мкг ДНК вектору з наступною електропорацією (2 прямокутних імпульси по 1000 В/см, тривалість 0,1 мс, інтервал 0,125 с; потім 4 прямокутних імпульси по 287,5 В/см, тривалість 10 мс, інтервал 0,125 с). Миші отримували 6 або 7 послідовних імунізацій у дні 0, 14, 28, 42, 56, 70 і 84. Четверту і шосту імунізації проводили з вектором, що кодує TfR яванської макаки; для всіх інших імунізацій застосовували вектор, що кодує TfR людини. У дні 36, 78 і 92 відбирали кров і готували сироватку, яку використовували для визначення титра за ІФА (див. нижче). Тварини з найвищими титрами були

відібрані для посилення на 96-й день шляхом внутрішньовенного введення 10^6 клітин TF-1 людини або 50 мкг рекомбінантного людського розчинного TfR, позбавленого спірального домену (позаклітинний домен TfR людини, починаючи з Leu122, закінчуючи Asp608, експресується в клітинах HEK293F як N-кінцеве злиття з Fc-ділянкою людини) та очищеного афінною хроматографією з білком А і хроматографією з витісненням за розміром, і виділяли моноклональні антитіла за допомогою гібридомної технології, виходячи з їх здатності зв'язувати рецептор трансферину людини та яванської макаки, експресованих на поверхні стабільно трансфєкованих клітин CHO-K1 (див. Приклад 3).

Імунізація кролів

Новозеландських білих кроликів або трансгенних кроликів, що експресують гуманізований рецептуар антитіл, імунізували генетично з використанням плазмідного вектору експресії, що кодує повнорозмірний TfR людини або яванської макаки, шляхом внутрішньошкірного введення 400 мкг ДНК вектору з наступною електропорацією (5 прямокутних імпульси по 750 В/см, тривалість 10 мс, інтервал 1 с. Кролі отримували 6 послідовних імунізацій у дні 0, 14, 28, 56, 84 та 112. Четверту і шосту імунізації проводили з вектором, що кодує TfR яванської макаки; для всіх інших імунізацій застосовували вектор, що кодує TfR людини. Кров (10 % від загального оцінюваного об'єму крові) відбирали на 35, 63, 91 і 119 дні. Готували сироватку, яку використовували для визначення титру за ІФА (див. нижче), і виділяли периферичні одноядерні клітини, які використовувались як джерело антиген-специфічних В-клітин у процесі клонування В-клітин (див. Приклад 2).

Визначення титрів у сироватці (ІФА)

Людський рекомбінантний розчинний TfR (R&D Systems, кат.№ 2474-TR) іммобілізували на 96-лунковому планшеті NUNC Maxisorb концентрації 3 мкг/мл, 100 мкл/лунку, у ФСБ, з наступним: блокуванням планшету 2 % CroteinC у ФСБ, 200 мкл/лунку; додавання серійних розведень антисироватки, по два дублікати в 0,5 % CroteinC у ФСБ, 100 мкл/лунку; детектування з (1) HRP-скон'югованим козячим антитілом до мишачого (Jackson ImmunoResearch/Dianova 115-036-071; 1/16 000) для всіх мишачих сироваток, (2) HRP-скон'югованим осячим антитілом до кролячого IgG (Jackson ImmunoResearch/Dianova 711-036-152; 1/16 000) для всіх кролячих сироваток, (3) кролячим антитілом до людського IgG (Pierce/Thermo Scientific 31423; 1/5000) для сироваток від трансгенних кролів, (4) біотинільованим козячим каппа-антитілом до людського (Southern Biotech/Biozol 2063-08, 1/5 000) та стрептавідином-HRP для сироваток від трансгенних кролів; розводили у 0,5 % CroteinC у ФСБ, 100 мкл/лунку. Для всіх етапів планшети інкубували протягом 1 год. при 37 °C. Між всіма етапами планшети промивали трічі 0,05 % Tween 20 у ФСБ. Сигнал отримували додаванням BM Blue POD розчинного субстрату (Roche), 100 мкл/лунку; і припиняли додаванням 1M HCl, 100 мкл/лунку. Поглинання зчитували при 450 нм проти еталонних 690 нм. Титр визначався як розведення антисироватки, в якому відзначали напівмаксимальний сигнал.

Приклад 2

Клонування В-клітин кролів

Ізолювання кролячих одноядерних клітин периферичної крові (ОКПК)

Зразки крові взяли в загальному у 6 тварин (2 кролі дикого типу (дт) і 4 трансгенних (тг) кролі). Ці кролики отримані з двох різних кампаній імунізації: перша кампанія з 2 дт і 2 тг кроликами та друга кампанія з 2 тг кроликами (див. також приклад "Імунізація кроликів"). ЕДТА, що містила цільну кров, розбавили вдвічі 1x ФСБ (РАА, Пашинг, Австрія) перед центрифугуванням за густиною з використанням лімфоліту для ссавців (Cedarlane Laboratories, Берлінгтон, Онтаріо, Канада) згідно інструкцій виробника. ОКПК двічі промивали 1xФСБ.

Середовище EL-4 B5

RPMI 1640 (Pan Biotech, Айденбах, Німеччина) з додаванням 10 % FCS (Hyclone, Логан, УТ, США), 2 мМ глутаміну, 1 % розчину пеніциліну/стрептоміцину (РАА, Пашинг, Австрія), 2 мМ пірувату натрію, 10 мМ HEPES (PAN Biotech, Айденбах, Німеччина) і 0,05 мМ β -меркаптоетанолу (Gibco, Пейслі, Шотландія)

Виснаження клітин

Перша кампанія імунізації: Для виснаження макрофагів/моноцитів через неспецифічну адгезію, а також лімфоцитів з неспецифічним зв'язуванням використовували стерильні 6-лункові планшети (гатунку клітинної культури), вкриті злитим моношаром клітин CHO.

Друга кампанія імунізації: Крок вичерпання з використанням лунок, вкритих клітинами CHO, був пропущений, оскільки ми не могли виключити вичерпання В-клітин, що продукують антитіла, які перехресно реагують з антитілами до рецептора трансферину хом'яка. Тому чисті 6-лункові планшети (гатунку клітинної культури) використовували для вичерпання макрофагів та моноцитів через неспецифічну адгезію, що дозволило потенційним В-лімфоцитам, які продукують поверхневі антитіла, які перехресно реагують за хом'яком (і, можливо, за мишами) досягти наступного етапу робочого процесу.

Для кожної кампанії імунізації: кожен лунку наповнювали максимально 4 мл середовища і до 6×10^6 ОКПК від імунізованого кроля і дозволяли зв'язатися протягом 1 год. при 37 °C в інкубаторі. Клітини з супернатанту (лімфоцити периферичної крові (ЛПК) використовували для етапу пеннінгу

антитіл.

Збагачення В-клітин на рецептор трансферину людини

6-лункові планшети для культивування тканин, вкриті моношаром позитивних за людським рецептором трансферину клітин CHO, засіяли до 6×10^6 ЛПК на 4 мл середовища та дозволили зв'язатися протягом 1 год. при 37°C в інкубаторі. Неадгезуючі клітини видалили обережним промиванням лунок 1-2 рази 1хФСБ. Залишок липких клітин відокремили трипсином протягом 10 хв при 37°C в інкубаторі. Трипсинізацію зупинили середовищем EL-4 B5. Клітини тримали на льоду до імуофлуоресцентного фарбування.

Імуофлуоресцентне фарбування і проточна цитометрія

Для сортування окремих клітин застосовували анти-IgG FITC (AbD Serotec, Дюссельдорф, Німеччина). Для поверхневого фарбування клітини з етапу виснаження і збагачення інкубували з антитілом анти-IgG FITC у ФСБ протягом 45 хв у темряві при 4°C . Після фарбування ОКПК двчі промивали льодяним ФСБ. Зрештою ОКПК ресуспендували у льодяному ФСБ і негайно піддавали аналізу FACS. Перед аналізом FACS додавали пропідію йодид у концентрації 5 мкг/мл (BD Pharmingen, Сан-Дієго, CA, США) для розрізнення мертвих і живих клітин.

Для сортування окремих клітин використовували Becton Dickinson FACSAria, обладнану комп'ютером і програмним забезпеченням FACSDiva (BD Biosciences, США).

Культивування В-клітин

Культивування В-клітин кроля готували подібно до методу, описаного Zubler та ін. (1985). Коротко, окремі відсортовані кролячі В-клітини інкубували на 96-лункових планшетах з 200 мкл/лунку середовища EL-4 B5, що містило клітини пансорбіну (1:100000) (Calbiochem (Merck), Дармштадт, Німеччина), 5 % супернатанту кролячих тимоцитів (номер TSN-M13 (10242), MicroCoat, Бернрід, Німеччина) та гамма-опромінених клітин мишачої тимоми EL-4-B5 ($2,5 \times 10^4$ /лунку) протягом 7 днів при 37°C в атмосфері 5 % CO_2 в інкубаторі. Супернатанти від культивування В-клітин були вилучені для скринінгу, а залишкові клітини негайно збирали і заморожували при -80°C в 100 мкл буфера RLT (Qiagen, Хільден, Німеччина).

Приклад 3

Ідентифікація антитіл людини і яванської макаки, що зв'язуються з TfR, за допомогою клітинного ІФА

Для скринінгу супернатантів кролячих В-клітин або мишачих гібридом на антитіла, що розпізнають TfR людини та яванської макаки, використовували клітинний ІФА зі стабільно трансфектованими клітинами CHO-K1. Стабільні трансфектанти одержували шляхом трансфекції клітин CHO-K1 експресійними плазмідами, що містять експресійні касети для TfR людини або яванської макаки, а також для неоміцин-фосфотрансферази. Після трансфекції клітини розбавляли в середовищі вирощування, яке містило 500 мкг/мл G418 (Life Technologies). Після появи зростаючих клонів клітини відокремлювали, фарбували MEM-75 (Abcam) або 13E4 (Life Technologies) та вторинними PE-міченими антитілами до TfR людини або яванської макаки, і високофлуоресцентні клітини відсортовували як окремі клітини в лунки 96-лункового планшета (FACS Aria). Після 7-денного вирощування клони знову перевіряли на експресію TfR, і клони з найкращою експресією відбирали для дослідів по клітинному ІФА.

Коротко, на лунку 384-лункового планшета засівали 15 000 клітин і інкубували протягом 18 год. при 37°C , 5 % CO_2 . Супернатант видаляли, використовуючи автоматичний промивач (BIOTEK), і до кожної лунки додавали 30 мкл супернатанту, що містив антитіла, а потім 24 мкл середовища вирощування. Через 2 години інкубації лунки спорожняли і додавали 30 мкл 0,05 % глутаральдегіду в ФСБ протягом 45 хв при КТ. Після 3-х промивань ФСБ/0,025 % Tween20 (ФСБТ) додавали 30 мкл HRP-антитіла до кролячих або HRP-антитіла до мишачих (Southern Biotech), розведеного 1:5000 у блокувальному буфері, та інкубували планшети протягом 1 год. при КТ. Лунки 6 разів промивали ФСБТ і генерували сигнал за допомогою 30 мкл ТМБ на лунку та вимірювали поглинання при 450 нм.

Приклад 4

Клонування і експресія антитіл до TfR

Технології рекомбінантної ДНК

Для маніпуляцій з ДНК використовували стандартні методи, описані у Sambrook, J. та ін., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Молекулярно-біологічні реактиви застосовували відповідно до інструкцій виробника.

Синтез генів та олігонуклеотидів

Бажані сегменти генів виготовляли хімічним синтезом у Geneart GmbH (Регенсбург, Німеччина). Синтезовані фрагменти генів клонували в плазміді E. coli для розмноження/ампліфікації. Послідовності ДНК субклонуваних фрагментів генів підтверджували секвенуванням ДНК. Альтернативно короткі синтетичні фрагменти ДНК збирали відпалом хімічно синтезованих олігонуклеотидів або за допомогою ПЛР. Відповідні олігонуклеотиди готували у metabion GmbH (Планегг-Мартінсрід, Німеччина).

ПЛР-ампліфікація V-доменів

3 лізату В-клітин готували загальну РНК (ресуспендовану в буфері RLT-Qiagen - кат. № 79216), користуючись РНК-набором NucleoSpin 8/96 (Macherey&Nagel; 740709.4, 740698) згідно протоколу виробника. РНК елюювали 60 мкл води без рибонуклеаз. 6 мкл РНК використовували для створення кДНК в реакції зворотної транскриптази, користуючись Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen 18080-400) та оліго-dT-праймером згідно інструкції виробника. Усі етапи виконували на системі Hamilton ML Star. 4 мкл кДНК використовували для ампліфікації варіабельних доменів важкого і легкого ланцюгів імуноглобулінів (VH та VL) з AccuPrime SuperMix (Invitrogen 12344-040) у кінцевому об'ємі 50 мкл, використавши праймери rbHC.up та rbHC.do для важкого ланцюга, rbLC.up та rbLC.do для легкого ланцюга дикотипних В-клітин кроля, а також BcPCR_FHLC_leader.fw і BcPCR_huCkappa.rev для легкого ланцюга В-клітин трансгенного кроля (див. Таблицю нижче). Усі прямі праймери були специфічні по сигнальному пептиду (відповідно у VH та VL), тоді як усі зворотні праймери були специфічні по константним ділянкам (відповідно у VH та VL). Умови ПЛР для RbVH+RbVL були наступними: Гарячий старт при 94 °С протягом 5 хв; 35 циклів по 20 с при 94 °С, 20 с при 70 °С, 45 с при 68 °С, і фінальна добудова при 68 °С протягом 7 хв. Умови ПЛР для HuVL були наступними: Гарячий старт при 94 °С протягом 5 хв; 40 циклів по 20 с при 94 °С, 20 с при 52 °С, 45 с при 68 °С, і фінальна добудова при 68 °С протягом 7 хв.

rbHC.up (SEQ ID NO: 103)	AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC
rbHCf.do (SEQ ID NO: 104)	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG
rbLC.up (SEQ ID NO: 105)	AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC
rbLC.do (SEQ ID NO: 106)	CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC
BcPCR_FHLC_leader.fw (SEQ ID NO: 107)	ATGGACATGAGGGTCCCCGC
BcPCR_huCkappa.rev (SEQ ID NO: 108)	GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC

8 мкл з 50 мкл розчину ПЛР навантажували на 48 E-Gel 2 % (Invitrogen G8008-02). Позитивні реакції ПЛР відчищали із застосуванням набору NucleoSpin Extract II (Macherey&Nagel; 740609250) згідно інструкцій виробника і елюювали у 50 мкл елюювального буферу. Усі етапи очищення виконували на системі Hamilton ML Starlet.

Рекомбінантна експресія кролячих моноклональних бівалентних антитіл

Для рекомбінантної експресії кролячих моноклональних бівалентних антитіл продукти ПЛР, що кодували VH чи VL, клонували як кДНК у вектори експресії методом клонування "липких кінців" (RS Haun та ін., BioTechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li та ін., Nature Methods (2007) 4, 251-256). Вектори експресії містили касету експресії, яка складалася з 5' CMV-промотора включно з інтроном А, а також 3' BGH послідовності поліаденілювання. Крім касети експресії плазміді містили точку початку реплікації, отриману з рUC18, а також ген бета-лактамази, що надавав резистентності до ампіциліну задля ампліфікації плазмід у E.coli. Використовували три варіанти основної плазміді: одна плазміді містила константну ділянку IgG кролика, призначену для приймання VH-ділянок, тоді як дві додаткові плазміді містили константну ділянку каппа LC кролика або людини для приймання VL-ділянок.

Приведені до лінійного вигляду плазміді, що кодували каппа- або гамма-константну ділянку та вставки VL /VH, ампліфікували у ПЛР із застосуванням праймерів, що перекриваються.

Очищені продукти ПЛР інкубували з T4 ДНК-полімеразою, яка утворювала однострункові "липкі кінці". Реакцію зупиняли додаванням дЦТФ.

На наступному етапі плазміді і вставку комбінували та інкубували з gesA, який індукував сайт-специфічну рекомбінацію. Рекомбінованими плазмідіами трансформували E.coli. На наступний день вирости колонії збирали і перевіряли на правильність рекомбінації плазміді приготуванням препарата плазмід, рестрикційним аналізом і секвенуванням ДНК.

Для експресії антитіла ізольовані плазміді HC і LC тимчасово співтрансфекували у клітини HEK293 і за тиждень відбирали супернатанти.

Створення векторів для експресії кролячих моноклональних моновалентних антитіл

Для рекомбінантної експресії відібраних кандидатів як моноклональних моновалентних антитіл кролячі константні ділянки всіх VH-ланцюгів були перетворені на константні ділянки людини, що містили "виступну" мутацію в сегменті CH3. Для VL-ланцюгів, одержаних з В-клітин дикотипних кролів, на людські перетворювали С-каппа константні ділянки. 4 мкл кДНК відібраних кандидатів використовували для ампліфікації варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів імуноглобулінів з AccuPrime SuperMix (Invitrogen 12344-040) у кінцевому об'ємі 50 мкл, при цьому прямі праймери були

специфічні по сигнальному пептиду, а зворотні праймери були специфічні по ділянці CDR3-J з послідовністю, що перекривається (на 3'-кінці) (20 bp), гомологічною до людських константних ділянок (відповідно VH та VL). Умови ПЛР для ампліфікації ланцюгів VH та VL були наступними: Гарячий старт при 94 °C протягом 5 хв; 35 циклів по 20 с при 94 °C, 20 с при 68 °C, 45 с при 68 °C, і фінальна добудова при 68 °C протягом 7 хв.

Продукти ПЛР, що кодували VH чи VL, клонували як кДНК у вектори експресії методом клонування "липких кінців" (RS Haup та ін., BioTechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li та ін., Nature Methods (2007) 4, 251-256). Вектори експресії містили касету експресії, яка складалася з 5' CMV-промотора включно з інтроном А, а також 3' BGH послідовності поліаденілювання. Крім касети експресії плазміди містили точку початку реплікації, отриману з pUC18, а також ген бета-лактамази, що надавав резистентності до ампіциліну задля ампліфікації плазмід у *E.coli*. Використовували два варіанти основної плазміди: одна плазміда містила константну ділянку IgG людини, призначену для приймання нового ампліфікованого VH-ланцюга, тоді як друга плазміда містила константну ділянку каппа LC людини для приймання VL-ланцюга.

Приведені до лінійного вигляду плазміди, що кодували каппа- або гамма-константну ділянку та вставки VL /VH, ампліфікували у ПЛР із застосуванням праймерів, що перекриваються.

Очищені продукти ПЛР інкубували з T4 ДНК-полімеразою, яка утворювала односторонні "липкі кінці". Реакцію зупиняли додаванням дЦТФ.

На наступному етапі плазміду і вставку комбінували та інкубували з *gcsA*, який індукував сайт-специфічну рекомбінацію. Рекомбінованими плазмідами трансформували *E.coli*. На наступний день вирости колонії збирали і перевіряли на правильність рекомбінації плазміди приготуванням препарату плазмід, рестрикційним аналізом і секвенуванням ДНК.

Приклад 5

Тимчасова експресія одновалентних антитіл до TfR

Антитіла генерували *in vivo* у тимчасово трансфектованих клітинах HEK293 (похідна лінії людських ембріональних ниркових клітин 293), які культивували у середовищі F17 (Invitrogen Corp.). Для трансфекції використовували трансфекційний реагент "без 293" (Novagen). Антитіла та модифіковані молекули на основі антитіл, як описано вище, експресували з індивідуальних експресійних плазмід. Трансфекції виконували, як зазначено у інструкціях виробника. Супернатанти клітинних культур, що містять рекомбінантні білки, збирали через три-сім днів після трансфекції. Супернатанти зберігали при зниженій температурі (напр., -80 °C) до очищення.

Загальна інформація, що стосується рекомбінантної експресії людських імуноглобулінів у, напр., клітинах HEK293, подана у: Meissner, P. та ін., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

Приклад 6

Високошвидкісне очищення неповних антитіл до рецептора трансферину

50 мл прояснених супернатантів, що містили неповні антитіла, на 96-глибоколункових планшетах завантажували у колонки MabSelectSuRe на 200 мкл. Після етапів промивання ФСБ при pH 7,4 білки елюювали 2,5 мМ HCl на системі Tescan/Atoll, одержуючи 0,5 мл елюату. Елюат нейтралізували 2 М Tris pH 8. Очищені білки кількісно визначали, використовуючи спектрофотометр Nanodrop, і аналізували методом CE-SDS в умовах денатурації та редукування, а також аналітичною SEC. Для отримання високочистого протеїну (> 95 %) більша частина антитіл повинна бути додатково очищена хроматографією з витісненням за розміром, щоб відокремити половини антитіл, антитіла "виступ-виступ" та вищі агрегати. Тому потім 500 мкл зразків інжектували у Superdex200 10/300GL у 20 мМ гістидину, що містить 140 мМ NaCl pH 6,0, користуючись Dionex UltiMate 3000. Цей метод дозволяє фракціонувати 25-30 зразків на день і тому уможливорює обробку великої кількості скринінгових співпадінь у неповному форматі. Фракції накопичували і знову аналізували вищеописаним методом.

Приклад 7

Культура клітин hCMC/D3 для трансцитозного тесту

Середовище і доповнення для hCMC/D3 (Weksler, B.B., та ін., FASEB J. 19 (2005) 1872-1874) одержували від Lonza. Клітини hCMC/D3 (пересіви 26-29) культивували на вкритих колагеном покривних скельцях (мікроскопних) або у колбах на середовищі EBM2, що містить 2,5 % FBS, четверту частину доданих факторів росту та повністю укомплектоване доданим гідрокортизоном, гентаміцином і аскорбіновою кислотою.

У всіх трансцитозних тестах використовували фільтри-вставки (0,4 мкм, діаметр 12 мм) з ПЕТ-мембрани з високою густиною пор (1×10⁸ пор/см²) на 12-лункових планшетах для культивування клітин. Оптимальний розрахунковий об'єм середовища для апікальної та базолатеральної камер, відповідно, становив 400 мкл та 1600 мкл. Апікальні камери фільтрів-вставок були вкриті колагеном I з хвоста щура (7,5 мкг/см²) і потім фібронектином (5 мкг/мл), за тривалості кожної інкубації 1 година при КТ. Клітини hCMC/D3 вирощували до злитих моношарів (прибл. 2×10⁵ клітин/см²) протягом 10-12 днів на середовищі EMB2.

Приклад 8

Трансцитозний тест одновалентних антитіл

Весь аналіз виконували у безсироватковому середовищі EBM2, яке в іншому відтворювали згідно Прикладу 1. Фільтри-вставки з клітинами інкубували апікально з одновалентними антитілами (концентрація: 2,67 мкг/мл) протягом 1 години при 37 °С, після чого збирали все апікальне та базолатеральне середовище. З цих значень обраховували параклітинний потік. Моношари промивали при КТ безсироватковим середовищем апікально (400 мкл) і базолатерально (1600 мкл) 3 × 3-5 хв кожен. Усі змиви збирали для моніторингу ефективності видалення нез'язаного антитіла. До апікальної камери додавали попередньо підігріте середовище і переносили фільтри на свіжий 12-лунковий планшет (заблокований протягом ночі у ФСБ з 1 % БСА), який містив 1600 мкл попередньо підігрітого середовища. В цей момент клітини на фільтрах лізували у 500 мкл буферу RIPA для визначення специфічного поглинання антитіла. Фільтри, що залишились, інкубували при 37 °С та в різні моменти часу відбирали зразки для визначення апікального і/або базолатерального вивільнення антитіла. Вміст антитіла у зразках кількісно визначали за допомогою високочутливого IgG-ІФА (див. Приклад 3). Для кожного моменту часу дані знімали з трьох фільтрів з клітинними культурами.

Приклад 9

Чутливий IgG-ІФА після трансцитозного тесту

Процедуру виконували при КТ, використовуючи автоматичний промивач для етапів промивання. Планшет на 384 лунки покривали 30 мкл/лунку 1 мкг/мл антитіла до людського/мишачого IgG, Fc γ -специфічного, у ФСБ протягом 2 год. з наступною інкубацією у блокувальному буфері ФСБ з 1 % БСА або 1 % CroteinC для аналізів людського і мишачого IgG, відповідно. Серійно розведені зразки з трансцитозного тесту та стандартні концентрації антитіла, використані в трансцитозному тесті, додавали до планшета та інкубували протягом 2 годин. Після чотирьох промивань додавали 30 мкл/лунку 50 нг/мл анти-людина/миша-F(ab)2-біотину в блокувальному буфері та інкубували протягом подальших 2 год. Після 6 промивань додавали 30 мкл/лунку 50 нг/мл (аналіз hulgG) або 100 нг/мл (аналіз mIgG) полі-HRP40-стрептавідину (Fitzgerald; у ФСБ з 1 % БСА та 0,05 % Tween-20) та інкубували протягом 30 хв. Після 4 промивань детектували імунні комплекси шляхом додавання 30 мкл/лунку BM Chemiluminescence Substrate (Roche). Сигнал люмінесценції вимірювали, використовуючи планшетний рідер люмінесценції та концентрацію, розраховану з використанням підігнаної калібрувальної кривої. Чутливість аналізу варіювала від 10 пг/мл до 10 нг/мл.

Приклад 10

Картування епітопів клітинним ІФА клітин CHO, трансфектованих мутантними hTfR

Щоб визначити ділянки епітопів на рецепторі трансферину людини (hTfR), в послідовність hTfR вводили мутації у місцях, де кластер амінокислот, що виходять на поверхню, мав відмінні амінокислоти у вирівняній послідовності TfR миші (див. Таблицю нижче), дотримуючись того логічного обґрунтування, що, незважаючи на значну гомологію між TfR людини і миші (77 % ідентичності), не відомо антитіл, спрямованих на позаклітинну частину, які демонструють хорошу перехресну реактивність між обома ортологами. Клонування плазмід з відповідними мутаціями описане вище. Для картування зв'язування зв'язувачів людського TfR з цими епітопами клітини CHO-K1 тимчасово трансфектували описними плазмідами і виміряли зв'язування антитіл у клітинному ІФА. Коротко, за день до експерименту на 96-лунковий планшет засівали 10⁴ клітин на лунку в нормальне ростове середовище (RPMI/10 % FCS). На наступний день середовище міняли на середовище з меншим вмістом сироватки OPTI-MEM (Gibco), і після 30 хв преінкубації додавали в лунки 10 мкл суміші 1200 мкл OPTI-MEM, 12 мкг плазмідної ДНК та 12 мкл трансфекційного реагенту XtremeGENE (Roche). Клітини інкубували протягом 2 днів при 37 °С/7,5 % CO₂, тоді забирали середовище і додавали антитіла до TfR у концентраціях від 1 нМ та 100 нМ у ростовому середовищі, з наступною інкубацією при 4 °С. Після цього розчини антитіл заміняли на 0,05 % глутаральдегід у ФСБ і фіксували клітини протягом 15 хв при КТ, тоді двічі промивали ФСБ і інкубували з вторинним антитілом до людського Fc, скон'югованим з HRP (BioRad; 1:2000 у блокувальному реагенті для ІФА (Roche)) протягом 1,5 год. при КТ. Сигнал генерували після 3 промивань ФСБ за допомогою 50 мкл ТМБ на лунку та вимірювали поглинання при 450 нм.

Плазмід #	мутації в hTfR
10188	-
18909	Thr518Asp/Gln520Lys/Phe521Ser/Gln524Arg
18910	Arg325Gln
18911	Ser355Ala/Asp356Arg/Lys358Asn/Thr359Ile

Плазмід #	мутації в hTfR
1891 2	Asp204Gln/Lys205Ser/Arg208Asn
1891 3	Lys574Gly/Glu575Ala/Ile577Thr/Glu578Gln
1891 4	Ala196Ile/Gln197Gly/Asn198Gln/Ser199Asn/Val200Met/Ile201Val/Ile202Thr/Val203Ile/Asp204Val/Lys205Gln/Asn206Ser/Gly207Asn/Arg208Gly/Leu209Asn/Val210Leu/Tyr211Asp/Leu212Pro
1897 4	Asp245Glu/Tyr247Ser/Thr248Tyr/Pro249Ser

Приклад 11

Аналіз зв'язування на основі поверхневого плазмонного резонансу для взаємодії TfR людини - антитіло

Експеримент із зв'язування проводили на BIAcore B 4000 (GE Healthcare), оснащеному сенсорним чіпом C1 (GE Healthcare, кат. № BR1005-35), попередньо обробленим антитілом до людського Fab (GE Healthcare, кат. № 28-9583-25), використовуючи стандартну хімічну процедуру амінного сполучення відповідно до керівництва постачальника.

Для кінетичних вимірювань антитіло зразка іммобілізували, застосовуючи час контакту 60 секунд і швидкість потоку 10 мкл/хв у фосфатно-сольовому буфері pH 7,4, 0,05 % Tween 20 при 25 °C. Рекombінантний His6-мічений рецептор трансферину людини (R&D systems, кат. № 2474-TR-050) застосовували у зростаючих концентраціях, а сигнал моніторили протягом часу. Зафіксовано середній час асоціації 150 секунд та дисоціації 600 секунд при швидкості потоку 30 мкл/хв. Дані допасовували, користуючись моделлю зв'язування 1:1 (ізотерма Ленгмюра).

Приклад 12

Гуманізація доменів VH та VL мишачих та кролячих антитіл до рецептора трансферину

Антитіла до рецептора трансферину, що походили не від людини, гуманізували наступним чином: Грунтуючись на характеристиці кодуєчих послідовностей та амінокислотних послідовностей, які містять VH та VL домени антитіл до рецептора трансферину, що походять не від людини, класу IgG1 з легким ланцюгом каппа, створили відповідне гуманізоване антитіло до рецептора трансферину шляхом пересадки CDR і зворотних/прямих мутацій на основі каркасної ділянки людської зародкової лінії VH4_3 та комбінації VK1_10 для клону 299.

Приклад 13

Спосіб визначення афінності до рецептора TfR людини/яванської макаки

У цьому прикладі наведено спосіб визначення афінності до рецепторів трансферину людини для порівняння поведінки дисоціації.

Для всіх аналізів використовували набір Biotin CAPture Kit від GE Healthcare (інструкція 28-9242-34 AB). Спочатку чіп регідратували шляхом вставлення його у прилад BIAcore T200. Після цього чіп залишили в режимі очікування під проточним буфером на ніч. Для підготовки поверхні Biotin CAPture Reagent розводили 1:100 у проточному буфері (1xФСБ з додаванням 0,25 M NaCl). Цей розчин інжектували на потокові комірки 1-4 протягом 360 с на швидкості потоку 2 мкл/хв. Далі поверхню сенсора кондиціонували трьома однохвилинними інжектуваннями розчину регенерації з набору Biotin CAPture Kit. Це слід виконувати для процедури вставлення або вперше або після зберігання. В потокову комірку 2 інжектують 100 нМ розчину монобіотинільованого рецептору трансферину людини або яванської макаки, відповідно, протягом 30 с на швидкості потоку 10 мкл/хв. Для визначення афінності застосовували інжекції в шести концентраціях (500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 та 0 нМ). Їх інжектували на "потоківу комірку hu-TfR" (напр., потоківу комірку 2, підготовлену як описано вище) з часом інжекції 180 с (асоціація) та швидкістю потоку 10 мкл/хв. Після 600 секунд фази дисоціації поверхню регенерували згідно з інструкціями виробника розчином регенерації з набору Biotin CAPture Kit і проводили наступний цикл.

Для оцінки кінетичних даних використовували програмне забезпечення BIAcore T200 Evaluation Software. Особливо константи швидкості дисоціації різних зв'язувачів рецепторів трансферину людини були враховані після застосування моделі зв'язування Ленгмюра 1:1.

Приклад 14

Відносне ранжування B4000 дисоціації рецептора трансферину людини/яванської макаки

Сенсорний чіп CAP (наданий в комплекті Biotin CAPture Kit, серія S #28-9202-34 GE) встановили в систему BIAcore B4000, нормалізували і адресували гідродинамічним способом, відповідно до інструкцій виробника. У першому циклі реагент CAP (як передбачено в комплекті) був адресований на точки 1, 2, 4 і 5 зі швидкістю потоку 10 мкл/хв протягом 300 с. Захоплення рецепторів трансферину людини відбувалося у точці 1 (рецептор трансферину людини-біотинільований) та точці 5 (рецептор

трансферину яванської макаки-біотинільований) зі швидкістю потоку 10 мкл/хв та тривалістю контакту 30 с. Рецептори розбавляли до концентрації 50 нМ проточним буфером (1хФСБ #28995084, GE Healthscare, доповнений 0,25 М NaCl). Антитіла інжектували у всі потокові комірки як ряд серійних розведень 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ та 0 нМ протягом 180 с на швидкості потоку 30 мкл/хв. Час дисоціації встановили на 300 с. Увесь комплекс регенерували з чіпа CAP розчином регенерації з набору Biotin CAPture Kit (120 с на швидкості потоку 10 мкл/хв). Для контролю активної концентрації білка другий цикл провели у точці 5 з використанням біотинільованого білка А (№ Р2165-2МG, Sigma) зі швидкістю потоку 10 мкл/хв та тривалістю контакту 30 с. Точка 1 у цьому контрольному циклі залишалася порожньою. Антитіла і регенерацію проводили так само, як і в циклі 1. Для обрахунку релевантних кінетичних даних використовували програмне забезпечення BIAcore B4000 Evaluation Software. Дисоціацію з рецептора трансферину людини визначали із застосуванням згладжування дисоціації 1:1.



