

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048186**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

**2024.10.31**

(21) Номер заявки

**202091816**

(22) Дата подачи заявки

**2019.02.05**(51) Int. Cl. **C07K 19/00** (2006.01)**A61K 38/47** (2006.01)**A61K 47/68** (2017.01)**A61P 21/00** (2006.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C07K 16/46** (2006.01)**C12N 9/26** (2006.01)**C12N 9/40** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**C12N 15/56** (2006.01)**C12N 15/62** (2006.01)(54) **СПОСОБ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА В МЫШЦУ**(31) **2018-018652**(32) **2018.02.05**(33) **JP**(43) **2020.10.26**(86) **PCT/JP2019/004123**(87) **WO 2019/151539 2019.08.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

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

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**(56) **WO-A1-2016208695****WO-A2-2017100467**SCHNYDER, A. et al., "Targeting of skeletal muscle in vitro using biotinylated immunoliposomes", *BIOCHEM. J.*, 2004, vol. 377, p. 61-67, DOI: 10.1042/BJ20031034, in particular, abstract, fig. 1, 4-6SUGO, T. et al., "Development of antibody-siRNA conjugate targeted to cardiac and skeletal muscles", *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, 29 June 2016, vol. 237, p. 1-13, DOI: 10.1016/j.jconrel. 2016.06.036, in particular, abstract, fig. 1-4, 8**WO-A1-2014130723 (VALERION  
THERAPEUTICS, LLC)**, 28 August 2014, claims 1, 21-28 & **JP-A-2016-514096** & **US-A-20160108133** & **EP-A1-2981551**SUNG, C. et al., "Pharmacokinetic analysis of immunotoxin uptake in solid tumors: role of plasma kinetics, capillary permeability, and binding", *CANCER RESEARCH*, 15 November 1990, vol. 50, p. 7382-7392**WO-A1-2013118165****WO-A1-2018038243**

(57) Проблемы. Получение методики для эффективного введения агента, действующего в мышечной ткани, который недостаточно вводится в мышечную ткань при введении в тело, в мышечную ткань, в частности мышечную ткань, состоящую из скелетной мышцы или сердечной мышцы. Решение. Конъюгат трансферринового рецептора анти-человеческого антитела и агента, где агентом является биологически активный агент, который должен действовать в мышечной ткани, например лизосомный фермент, такой как кислая  $\alpha$ -глюкозидаза,  $\alpha$ -галактозидаза А.

**B1****048186****048186  
B1**

### Область техники

Данное изобретение относится к доставке фармацевтического агента в мышцу, этот агент должен проявлять свою физиологическую активность в мышцах, и более конкретно, к конъюгату, содержащему желаемый фармацевтический агент, связанный с анти-трансферриновым антителом, и способу введения конъюгата, который способствует проявлению желаемым агентом биоактивности в мышцах.

### Уровень техники

В последнее время была установлена ферментозамещающая терапия для лизосомной болезни, вызванной функциональным дефицитом лизосомных ферментов, и был улучшен жизненный прогноз и качество жизни (КЖ) пациента. Лекарственные средства, содержащие лизосомные ферменты в качестве активных ингредиентов, применяемые в ферментозамещающей терапии, включают лекарственное средство для гликогеноза 2 типа (болезни Помпе), содержащее человеческую кислоту  $\alpha$ -глюкозидазы (hGAA) в качестве основного агента, лекарственное средство для микополисахаридоза 2 типа (болезни Хантера), содержащее человеческую идуронат-2-сульфатазу (hI2S) в качестве основного агента, лекарственное средство для болезни Фабри, содержащее человеческую  $\alpha$ -галактозидазу A ( $h\alpha$ -GalA) в качестве основного агента, и лекарственное средство для болезни Гоше, содержащее человеческую глюкоцереброзидазу в качестве основного агента.

Лизосомные ферменты, вводимые пациентам при ферментозамещающей терапии, попадают в клетки и выполняют свои функции. Например, человеческая кислая  $\alpha$ -глюкозидаза (hGAA), человеческая идуронат-2-сульфатаза (hI2S) и человеческая  $\alpha$ -галактозидаза A ( $h\alpha$ -GalA), модифицированная сахарной цепью N-типа, содержащей маннозо-6-фосфат (M6P), попадают в клетки через связывание M6P с рецептором M6P. Человеческая глюкоцереброзидаза, лекарственное средство для болезни Гоше, также модифицирована сахарной цепью N-типа, восстанавливающим концом которой является манноза, и она попадает в клетки ретикулоэндотелиальной системы, такие как макрофаги, через связывание маннозы с рецепторами маннозы. Что касается поглощения клетками через связывание M6P и M6P рецепторов, сахарная цепь бисфосфатного типа, содержащая два M6Ps, имеет сродство с рецептором M6P в 100 раз выше, чем сахарная цепь монофосфатного типа, содержащая один M6P. M6P, содержащийся в сахарной цепи, сильно влияет на эффективность клеточного поглощения лизосомных ферментов.

Человеческим лизосомным ферментом, применяемым в ферментозамещающей терапии, является рекомбинантный белок, получаемый экспрессированием гена, кодирующего человеческий лизосомный фермент, гена, введенного в клетку хозяина, такую как клетку CHO, с применением методики рекомбинации генов. Рекомбинантные человеческие лизосомные ферменты, полученные как рекомбинантные белки, должны быть подходящим образом модифицированы сахарной цепью для того, чтобы оказывать свое фармацевтическое действие. Другими словами, важно, чтобы hGAA,  $h\alpha$ -GalA и hI2S были модифицированы сахарной цепью, содержащей маннозо-6-фосфат, и чтобы человеческая глюкоцереброзидаза была подходящим образом модифицирована сахарной цепью, восстанавливающим концом которой является манноза, для оказания их фармацевтического действия.

В случае рекомбинантной человеческой кислоты  $\alpha$ -глюкозидазы (rhGAA), основным целевым органом, на который следует оказать фармацевтическое действие, является мышца, в частности, скелетная мышца. Однако, количество M6P, содержащихся в сахарных цепях, составляет 1 или менее в среднем на молекулу в rhGAA, применяемой для ферментозамещающей терапии, так что большая часть сахарных цепей имеют монофосфатный тип, и модификация сахарной цепи M6P не является удовлетворительной (Не патентный документ 1). Поэтому, так как rhGAA не введена в целевой орган эффективно, доза для введения является слишком высокой, т.е. 20 мг/кг. В зависимости от симптомов пациента, доза может быть повышена до 40 мг/кг, но все равно вводимый фермент не считается полностью функциональным.

Способ с применением системы лиганд-рецептор, отличной от системы M6P-M6P рецептор, был разработан как способ для эффективного поглощения rhGAA в целевой орган. Например, известно, что слитый белок, полученный сливанием RAP (рецептор-ассоциированного белка), который является лигандом семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности (рецептора ЛПНП), и hGAA, помещают в клетки в M6P-независимой манере в экспериментах с применением культивированных клеток (Не патентный документ 2). Согласно этому способу, даже rhGAA, недостаточно модифицированный сахарной цепью, содержащей M6P, может быть помещен в клетки через связывание RAP и его рецептора.

### Список цитирования

Непатентная литература.

Непатентный документ 1: Zhu Y. et al., Biochem. J. 389, 619-28 (2005).

Непатентный документ 2: Prince WS. et al., J Biol. Chem. 279, 35037-46 (2004).

### Сущность изобретения

Проблемы, решаемые изобретением.

Целью данного изобретения является получение способа эффективного введения фармацевтического агента, который должен функционировать в мышцах, в мышцу при введении фармацевтического агента *in vivo*, и связанные с ним методы.

Средства решения проблем.

В исследовании, направленном на вышеуказанную цель, в результате интенсивного исследования авторы настоящего изобретения обнаружили, что рекомбинантная человеческая кислая  $\alpha$ -глюкозидаза, которая должна оказывать свое фармацевтическое действие на мышцу, но не транспортируется в достаточной мере в мышцу как таковая, эффективно поглощается мышцами путем конъюгации с античеловеческим трансферриновым рецептором, что и завершило настоящее изобретение. Таким образом, настоящее изобретение включает в себя следующее.

1. Конъюгат антитела против рецептора трансферрина человека и фармацевтического агента, где агент обладает физиологическим действием, проявляющимся в мышцах.

2. Конъюгат по 1, где антителом против рецептора трансферрина человека является Fab антитело,  $F(ab')_2$  антитело или  $F(ab')$  антитело.

3. Конъюгат по 1, где антителом против рецептора трансферрина человека является одноцепочечное антитело, выбранное из группы, состоящей из scFab, scF(ab'), scF(ab')<sub>2</sub> и scFv.

4. Конъюгат по 3, где в одноцепочечном антителе легкая цепь и тяжелая цепь антитела против рецептора трансферрина человека связаны через линкерную последовательность.

5. Конъюгат по 4 выше, где легкая цепь и тяжелая цепь антитела против рецептора трансферрина человека связаны на С-концевой стороне легкой цепи через линкерную последовательность.

6. Конъюгат по 4 выше, где легкая цепь и тяжелая цепь антитела против рецептора трансферрина человека связаны на С-концевой стороне тяжелой цепи через линкерную последовательность.

7. Конъюгат по любому из 4-6 выше, где линкерная последовательность содержит 8-50 аминокислотных остатков.

8. Конъюгат по 7, где линкерная последовательность содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательности аминокислот (Gly Ser), последовательности аминокислот (Gly Gly Ser), последовательности аминокислот (Gly Gly Gly), последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 3 и последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 4.

9. Конъюгат по 8, где линкерная последовательность содержит 15 аминокислотных остатков, в котором последовательность аминокислот, описанная как SEQ ID NO: 4, последовательно повторяется три раза.

10. Конъюгат по любому из 1-9, где антитело против трансферринового рецептора человека содержит последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 22, в переменной области легкой цепи, и последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 23, в переменной области тяжелой цепи.

11. Конъюгат по 10, где последовательность аминокислот переменной области легкой цепи имеет идентичность не менее 80% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22, и последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи имеет идентичность не менее 80% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

12. Конъюгат по 10, где последовательность аминокислот переменной области легкой цепи имеет идентичность не менее 90% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22, и последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи имеет идентичность не менее 90% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

13. Конъюгат по 10, где 1-10 аминокислот, составляющих переменную область легкой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22.

14. Конъюгат по 10, где 1-3 аминокислоты, составляющих переменную область легкой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22.

15. Конъюгат по 10, где 1-10 аминокислот, составляющих переменную область тяжелой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

16. Конъюгат по 10, где 1-3 аминокислот, составляющих переменную область тяжелой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

17. Конъюгат по 10, где 1-10 аминокислот, составляющих переменную область легкой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22, и 1-10 аминокислот, составляющих переменную область тяжелой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

18. Конъюгат по 10, где 1-3 аминокислоты, составляющих переменную область легкой цепи, заме-

щены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 22, и 1-3 аминокислоты, составляющих переменную область тяжелой цепи, замещены другими аминокислотами в сравнении с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 23.

19. Конъюгат по 10, где анти-человеческое антитело трансферринового рецептора содержит легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 25.

20. Конъюгат по 19, где последовательность аминокислот переменной области легкой цепи имеет идентичность не менее 80% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 24, и последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи имеет идентичность не менее 80% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 25.

21. Конъюгат по 19, где последовательность аминокислот переменной области легкой цепи имеет идентичность не менее 90% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 24, и последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи имеет идентичность не менее 90% с последовательностью аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 25.

22. Конъюгат по любому из 1-21, где агентом является пептид или белок.

23. Конъюгат по 22, выбранный из группы, состоящей из (1)-(4) ниже:

(1) конъюгат, в котором белок связан с С-концевой стороной легкой цепи антитела против рецептора трансферрина человека пептидной связью,

(2) конъюгат, в котором белок связан с N- концевой стороной легкой цепи антитела против рецептора трансферрина человека пептидной связью,

(3) конъюгат, в котором белок связан с С- концевой стороной тяжелой цепи антитела против рецептора трансферрина человека пептидной связью, и

(4) конъюгат, в котором белок связан с N- концевой стороной легкой цепи антитела против рецептора трансферрина человека пептидной связью.

24. Конъюгат по 23, где белок связан с антителом против рецептора трансферрина человека через линкерную последовательность.

25. Конъюгат по 24, где линкерная последовательность состоит из 1-50 аминокислотных остатков.

26. Конъюгат по 25, где линкерная последовательность содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из отдельного глицина, отдельного серина, последовательности аминокислот (Gly Ser), последовательности аминокислот (Gly Gly Ser), последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 3, последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 4, и последовательности аминокислот, состоящей из 1-10 последовательностей аминокислот, который связаны последовательно.

27. Конъюгат по любому из 1-28, где антителом против рецептора трансферрина человека является гуманизованное антитело против трансферринового рецептора человека.

28. Конъюгат по любому из 22-27, где белком является лизосомный фермент.

29. Конъюгат по 28, где лизосомным ферментом является  $\alpha$ -галактозидаза А человека.

30. Конъюгат по 29, где легкая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела содержит последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и где тяжелая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела связана его С-концевой стороной с человеческой  $\alpha$ -галактозидазой А через линкерную последовательность (Gly Ser), и полная связанная тяжелая цепь имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 29.

31. Конъюгат по 28, где лизосомным ферментом является кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека.

32. Конъюгат по 31, где легкая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела содержит последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и где тяжелая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела связана его С-концевой стороной с человеческой кислотой  $\alpha$ -глюкозидазы через линкерную последовательность (Gly Ser), и полная связанная тяжелая цепь имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 27.

33. Фармацевтическая композиция для улучшения мышечной функции, содержащая конъюгат по любому из 1-32 выше.

34. Фармацевтическая композиция для облегчения мышечной дисфункции, связанной с лизосомной болезнью, содержащая конъюгат по 28 выше.

35. Фармацевтическая композиция для облегчения мышечной дисфункции, связанной с болезнью Фабри, содержащая конъюгат по 29 или 30 выше.

36. Фармацевтическая композиция для облегчения мышечной дисфункции, связанной с болезнью Помпе, содержащая конъюгат по 31 или 32 выше.

37. Фармацевтическая композиция по любому из 33-36, где мышцей является скелетная мышца, сердечная мышца или гладкая мышца.

38. Применение конъюгата по любому из 28-32 выше для производства фармацевтической композиции для облегчения мышечной дисфункции, связанной с лизосомной болезнью.

39. Применение конъюгата по 29 или 30 выше для производства фармацевтической композиции для

облегчения мышечной дисфункции, связанной с болезнью Фабри.

40. Применение конъюгата по 31 или 32 выше для производства фармацевтической композиции для облегчения мышечной дисфункции, связанной с болезнью Помпе.

41. Применение конъюгата по любому из 1-32 выше в качестве фармацевтической композиции для улучшения мышечной функции.

42. Способ доставки фармацевтического агента в мышцу, включающий стадию получения агента в виде конъюгата, в котором агент связан с антителом против рецептора трансферрина человека, и стадию введения конъюгата индивидууму.

43. Способ по 42, где конъюгатом является конъюгат по любому из 1-32 выше.

44. Способ по 42 или 43, дополнительно включающий стадию улучшения мышечной функции индивидуума введением конъюгата.

45. Способ по любому из 42-44, где индивидуум имеет мышечную дисфункцию.

46. Способ по любому из 42-44, где индивидуум имеет мышечную дисфункцию, связанную с лизосомной болезнью.

47. Способ по 46, где лизосомной болезнью является болезнь Фабри или болезнь Помпе.

Эффекты изобретения.

Согласно настоящему изобретению, фармацевтический агент, выполняющий свою функцию в мышце, в частности, пептид или белок, обладающий физиологической активностью, может быть эффективно доставлен в мышцу, когда агент вводят в организм, позволяя агенту конъюгироваться с античеловеческим трансферриновым рецептором. Другими словами, конъюгируя агент с человеческим трансферриновым рецептором, можно получить более эффективный терапевтический агент для заболеваний, связанных с мышечной дисфункцией.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1. На фигуре показаны количественные результаты гликогена, содержащегося в сердце. Количественные результаты контрольной группы дикого типа, (1) показывают количественные результаты контрольной группы дикого типа, КО-контрольной группы, группы введения hGAA и группы введения hGAA-анти-hTfR антитела показаны на (1), (2), (3) и (4) соответственно. Вертикальные столбики показывают значения CO. Вертикальные оси представляют концентрацию гликогена (мг/г массы влажной ткани).

Фиг. 2. На фигуре показаны количественные результаты гликогена, содержащегося в диафрагме. То же самое показано на (1)-(4), вертикальными столбиками и вертикальными осями, как и на фиг. 1.

Фиг. 3. На фигуре показаны количественные результаты гликогена, содержащегося в камбаловидной мышце. То же самое показано на (1)-(4), вертикальными столбиками и вертикальными осями, как и на фиг. 1.

Фиг. 4. На фигуре показаны количественные результаты гликогена, содержащегося в передней большеберцовой мышце. То же самое показано на (1)-(4), вертикальными столбиками и вертикальными осями, как и на фиг. 1.

Фиг. 5. На фигуре показаны количественные результаты гликогена, содержащегося в четырехглавой мышце бедра. То же самое показано на (1)-(4), вертикальными столбиками и вертикальными осями, как и на фиг. 1.

#### Варианты осуществления изобретения

В данном изобретении термин "мышца" означает ткань, в основном состоящую из скелетных мышц, сердечной мышцы или гладких мышц, и, в частности, ткань, состоящую в основном из скелетных мышц, или ткань, состоящую в основном из сердечной мышцы. И термин "мышечная ткань" понимается как синоним мышцы.

В данном изобретении, фармацевтическим агентом, который должен оказывать физиологическое действие в мышце, является агент, который не может оказывать достаточное физиологическое действие в мышце из-за недостаточного транспорта в мышцу при введении агента отдельно в кровь. Такими агентами могут быть низкомолекулярные соединения, пептиды или белки. Здесь, пептидом является такой, который потенциально способен оказывать физиологическое действие в мышце (биоактивный пептид), но отдельно не транспортируется эффективно в мышцу при введении в организм. Такой пептид предпочтительно состоит из 2-100 аминокислотных остатков, например, 2-50, 5-100 аминокислотных остатков. Дополнительно, такой белок потенциально способен оказывать физиологическое действие в мышце (биоактивный белок), но отдельно не транспортируется эффективно в мышцу при введении в организм, и включает лизосомные ферменты, такие как кислая  $\alpha$ -глюкозидаза (GAA) и  $\alpha$ -галактозидаза A ( $\alpha$ -GalA), и так далее. Такие пептиды и белки могут иметь искусственные последовательности аминокислот, или могут иметь последовательности аминокислот, кодированные животными генами. Здесь, виды животных, гены которых кодируют пептид или белок, особенно не ограничены, но предпочтительно включают млекопитающих, более предпочтительно, человека, обезьяну, мышшь, домашних животных (лошадей, свиней, овец и т.д.) или домашних питомцев (кошек, собак и т.д.), и более предпочтительно, человека.

В дополнение к GAA и GalA, лизосомные ферменты, которые должны демонстрировать функции лекарственных средств для улучшения дисфункции мышц, связанной с лизосомными болезнями, вклю-

чают  $\alpha$ -L-идуронидазу (IDUA), идуронат-2-сульфатазу (IDS), глюкоцереброзидазу (GBA),  $\beta$ -галактозидазу, GM2 активирующий белок,  $\beta$ -гексосаминидазу А,  $\beta$ -гексосаминидазу В, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу,  $\alpha$ -маннозидазу (LAMAN),  $\beta$ -маннозидазу, галактозилцерамидазу (GALC), Сапосин С, арилсульфатазу А (ARSA),  $\alpha$ -L-фукозидазу (FUCA1), аспартилглюкозаминидазу,  $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминидазу, кислоту сфингомиелиназы (ASM),  $\beta$ -глюкуронидазу (GUSB), гепаран N-сульфатазу (SGSH),  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидазу (NAGLU), ацетил-СоА:  $\alpha$ -глюкозаминид N-ацетилтрансферазы, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат сульфатазы, кислоту церамидазы (AC), амило-1,6-глюкозидазу, сиалидазу, аспартилглюкозаминидазу, пальмитоилпротеинтиоэстеразу-1 (PPT-1), трипептидилпептидазу-1 (TPP-1), гиалуронидазу-1, CLN1, CLN2 и подобные. Эти ферменты могут быть более эффективно доставлены в мышцу при введении в организм в форме конъюгата с антителом против рецептора трансферрина человека. Таким образом, эти конъюгаты могут применяться в качестве лекарственного средства для облегчения мышечной дисфункции, связанной с лизосомной болезнью.

Идуронат-2-сульфатаза (IDS), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при синдроме Хантера,  $\alpha$ -галактозидаза А, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Фабри,  $\alpha$ -L-идуронидаза (IDUA), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Гурлера или болезни Гурлера-Шейе, глюкоцереброзидаза (GBA), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Гоше,  $\beta$ -галактозидаза, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при GM1-ганглиозидозе типов 1-3, GM2 активирующий белок, конденсированный с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при GM2-ганглиозидозе, варианте АВ,  $\beta$ -гексозаминидаза А, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Сандхоффа и болезни Тея-Сакса,  $\beta$ -гексозаминидаза В, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Сандхоффа, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансфераза, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни клеточных включений,  $\alpha$ -маннозидаза (LAMAN), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при  $\alpha$ -маннозидозе, галактозилцерамидаза (GALC), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Краббе, сапозин С, конденсированный с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни типа болезни Гоше, и арилсульфатаза А, (ARSA) конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при метахроматической лейкодистрофии,  $\alpha$ -L-фукозидаза (FUCA1), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при фукозидозе, аспартилглюкозаминидаза, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при аспартилглюкозамиирии,  $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминидаза, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Шиндлера и болезни Канзаки, кислая сфингомиелиназа (ASM) конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Ниманна-Пика,  $\beta$ -глюкуронидаза (GUSB), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при синдроме Слая, гепаран N-сульфатаза (SGSH),  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидаза (NAGLU), ацетил-СоА:  $\alpha$ -глюкозаминид N-ацетилтрансфераза и N-ацетилглюкозамин-6-сульфат сульфатазы, конденсированные с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтических агентов при мышечной дисфункции при синдроме Санфилиппо, кислая церамидаза (AC), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Фарбера, амило-1,6-глюкозидаза, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Кори (болезни Форбса/Кори), сиалидаза, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при дефиците сиалидазы, пальмитоилпротеинтиоэстераза-1 (PPT-1), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при нейроцериоидном липофусцинозе или болезни Сантавуори-Халтия, трипептидилпептидаза-1 (TPP-1), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при нейроцериоидном липофусцинозе или болезни Янски-Бельповски, гиалуронидаза-1, конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве терапевтического агента при мышечной дисфункции при дефиците гиалуронидазы, кислая  $\alpha$ -глюкозидаза (GAA), конденсированная с анти-hTfR антителом, может применяться в качестве

терапевтического агента при мышечной дисфункции при болезни Помпе, и CLN1 и CLN2, конденсированные с анти-hTfR антителом, могут применяться в качестве терапевтических агентов при мышечной дисфункции при болезни Баттена. В частности, ожидается, что анти-hTfR антитело в соответствии с данным изобретением достигает церебральной паренхимы, гиппокампальных нервно-подобных клеток, мозжечковых клеток Паркинне и т.д. после прохождения через гематоэнцефалический барьер, а также достигает нервно-подобных клеток мозгового полосатого тела и черной субстанции среднего мозга так, что фармацевтическая эффективность белка может быть улучшена сливанием с белком для реализации своей функции в этих тканях или клетках. Однако фармацевтическое применение не ограничено применением при этих болезнях.

В данном изобретении термин "лизосомный фермент" или термин, обозначающий индивидуальный лизосомный фермент, означает, в частности, что имеет природную последовательность аминокислот, но не ограничен ей, и поскольку он имеет лизосомный фермент, лизосомные ферменты, в которых мутации, такие как замещения, делеции, добавления и подобные, введены в последовательность аминокислот природного лизосомного фермента, также включены в лизосомный фермент. Если аминокислоты последовательности аминокислот лизосомного фермента замещены другими аминокислотами, количество замещенных аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно, от 1 до 5, даже более предпочтительно, от 1 до 3, и еще более предпочтительно, от 1 до 2. Если аминокислоты последовательности аминокислот лизосомного фермента удалены, количество удаленных аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно, от 1 до 5, даже более предпочтительно, от 1 до 3, и еще более предпочтительно, от 1 до 2. Мутация, объединяющая такое замещение и делецию аминокислот, также может быть введена в лизосомный фермент. Если аминокислоты добавляют к аминокислоте, предпочтительно, 1-10, более предпочтительно, 1-5, даже более предпочтительно, 1-3, и еще более предпочтительно, 1-2 аминокислоты добавляют к последовательности аминокислоты лизосомного фермента или к N-концевой или C-концевой стороне лизосомного фермента. Мутация, объединяющая такое добавление, замещение и делецию аминокислот, также может быть введена в лизосомный фермент. Последовательность аминокислот мутированного лизосомного фермента предпочтительно идентична на не менее 80%, более предпочтительно, 90%, и даже более предпочтительно, 95%, последовательности аминокислот исходного лизосомного фермента. То же самое применяется к белкам и пептидам, отличным от лизосомных ферментов.

Здесь, фраза "лизосомный фермент имеет активность лизосомного фермента" означает, что лизосомный фермент имеет активность не менее 3% от активности, присущей лизосомному ферменту дикого типа при конъюгации с анти-hTfR антителом. Однако активность предпочтительно составляет не менее 10%, более предпочтительно, не менее 20%, даже более предпочтительно, не менее 50%, и еще более предпочтительно, не менее 80% от активности, присущей лизосомному ферменту дикого типа. То же самое применяется, если лизосомные ферменты, конъюгированные с анти-hTfR антителом, мутированы. То же самое применяется к белкам и пептидам, отличным от лизосомных ферментов.

Замещения аминокислот в последовательности аминокислот пептидов или белков (включая лизосомные ферменты и антитела) другими аминокислотами включают, например, замещения между аминокислотами в одной группе, такой как ароматические аминокислоты (Phe, Trp, Tyr), алифатические аминокислоты (Gly, Ala, Leu, Ile, Val), аминокислоты амидного типа (Gln, Asn), основные аминокислоты (Lys, Arg, His), кислые аминокислоты (Glu, Asp), аминокислоты с гидроксильными группами (Ser, Thr), разветвленные аминокислоты (Val, Leu, Ile), аминокислоты с небольшими боковыми цепями (Gly, Ala, Ser, Thr, Met) и аминокислоты с не полярными боковыми цепями (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met). Прогнозируют, что замещения такими подобными аминокислотами не приведут к изменениям в фенотипе белка (т.е. консервативные замещения аминокислот). Примеры консервативных замещений аминокислот хорошо известны в данной области техники и описаны в различных ссылках (см., например, Bowie et al., Science, 247:1306-1310 (1990)).

В данном изобретении, "гомология" или "идентичность" означает отношение (%) гомологичных аминокислотных остатков к общему количеству аминокислотных остатков в оптимальном размещении, когда две последовательности аминокислот сравнивают с применением алгоритма расчета гомологии. Сравнение двух последовательностей аминокислот на гомологичность (идентичность), показанную таким отношением, хорошо известно в данной области техники и может быть легко понято специалистом в данной области техники. В данном изобретении, в качестве алгоритма расчета гомологии между последовательностью аминокислот исходного белка (включая антитело) и последовательностью аминокислот мутированного белка, BLAST (Altschul SF. J Mol. Biol. 215. 403-10 (1990)), способ поиска сходства Пирсона и Липмана (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85. 2444 (1988)), алгоритм локальной гомологии Смита и Ватермана (Adv. Appl. Math. 2. 482-9 (1981)) и так далее хорошо известны. Дополнительно, blastp, одна из программ BLAST, представленная в интернете Национальным институтом здоровья, хорошо известна в качестве средства расчета гомологии двух последовательностей аминокислот.

Лизосомные ферменты описаны подробно, принимая в качестве примера кислую  $\alpha$ -глюкозидазу и  $\alpha$ -галактозидазу А, как подробно описано ниже.

Кислая  $\alpha$ -глюкозидаза (GAA) является лизосомным ферментом, который обладает действием разложения гликогена. Болезнь Помпе (болезнь накопления гликогена II типа) является болезнью, при которой гликоген аккумулируется в больших количествах в лизосоме клеток вследствие генетического отсутствия большинства или всей активности кислой  $\alpha$ -глюкозидазы, и дисфункция сердечной мышцы и скелетной мышцы является основным симптомом. Болезнь Помпе классифицируется на младенческую форму, детскую форму и взрослую форму. Младенческая форма развивается в основном в раннем младенческом возрасте и показывает сердечно-сосудистые симптомы из-за концентрической сердечной гипертрофии, мышечную слабость из-за инвазии скелетной мышцы и гипотонию из-за аккумуляции гликогена в миокарде, и характеризуется врожденными миопатическими симптомами. При детской форме, преобладают симптомы скелетной мышцы, и они показывают задержку двигательного развития и прогрессирующую мышечную слабость, начиная с позднего младенчества. Мышечная слабость является основным симптомом при взрослой форме.

$\alpha$ -Галактозидаза А ( $\alpha$ -GalA) является лизосомным ферментом, который обладает действием гидролиза концевых  $\alpha$ -галактозидных связей гликолипидов и гликопротеинов. Тригексозилцерамид является одним из субстратов для  $\alpha$ -галактозидазы А и гидролизуется ферментом на концевой гексозной группе. Болезнь Фабри является болезнью, вызванной генетической потерей большинства или всей активности  $\alpha$ -GalA. Клиническими признаками болезни Фабри является почечная недостаточность, ангиоцератома и сердечно-сосудистые аномалии, такие как вентрикулярная гипертрофия и недостаточность митрального клапана. Атипичный тип болезни Фабри, в котором в первую очередь ухудшается сердце, может быть выделен, в частности, как сердечная болезнь Фабри.

В качестве терапии лизосомной болезни пациента, не имеющего лизосомный фермент, ферментозамещающую терапию, в которой лизосомный фермент, полученный с применением метода рекомбинации гена, вводят пациенту в виде лекарственного средства. Например, ферментозамещающую терапию с применением Муозуме (зарегистрированная торговая марка), рекомбинантной человеческой кислой  $\alpha$ -глюкозидазы, полученной методом рекомбинации генов, проводят у пациентов с болезнью Помпе. Кроме того, ферментозамещающая терапия с применением Fabrazyme или Ripregal (зарегистрированные торговые марки), рекомбинантной человеческой  $\alpha$ -галактозидазы А, полученной методом рекомбинации генов, проводят у пациентов с болезнью Фабри. Одна из тканей, в которых лизосомные ферменты, применяемые в качестве лекарственных средств в этих ферментозамещающих терапиях, должны оказывать действие в мышцах. Таким образом, при повышении подачи лизосомных ферментов в мышцу, может быть возможно дополнительно облегчать мышечную дисфункцию, связанную с лизосомной болезнью.

В данном изобретении термин "человеческая кислая  $\alpha$ -глюкозидаза" или "hGAA", в частности, означает hGAA, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 1, которая является такой же, как последовательность природной hGAA, но данное изобретение не ограничено ей, и до тех пор, пока она имеет активность hGAA, hGAA включает hGAA, в которой мутации, такие как замещения, делеции и добавления и подобные, введены в последовательность аминокислот природной hGAA. Если аминокислоты последовательности аминокислот hGAA замещены другими аминокислотами, количество замещенных аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно, от 1 до 5, даже более предпочтительно, от 1 до 3, и еще более предпочтительно, от 1 до 2. Если аминокислоты последовательности аминокислот hGAA, количество удаляемых аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно, от 1 до 5, даже более предпочтительно, от 1 до 3, и еще более предпочтительно, от 1 до 2. Мутация с объединением такого замещения и делеции аминокислот также может быть введена в hGAA. Если аминокислоты добавляют к hGAA, предпочтительно, 1-10, более предпочтительно, 1-5, даже более предпочтительно, 1-3, и еще более предпочтительно, 1-2 аминокислоты добавляют в последовательность аминокислот hGAA или на N-концевую или C-концевую сторону. Мутация, объединяющая такое добавление, замещение и делецию аминокислот, также может быть введена в hGAA. Последовательность аминокислот мутированной hGAA предпочтительно имеет 80% или большую идентичность, более предпочтительно, 90% или более идентичность и даже более предпочтительно, 95% или более идентичность к последовательности аминокислот исходной hGAA.

Здесь термин "hGAA имеет активность hGAA" означает, что она имеет активность не менее 3% относительно активности, присущей природному типу hGAA при конъюгировании с анти-hTfR антителом. Однако активность предпочтительно составляет не менее 10%, более предпочтительно, 20% или более, даже более предпочтительно, не менее 50%, и еще более предпочтительно, не менее 80% относительно активности, присущей природному типу hGAA. То же самое применяется, когда hGAA, конъюгированная анти-hTfR антителом, мутирована.

В данном изобретении термин "человеческая  $\alpha$ -галактозидаза А" или "h $\alpha$ -GalA" означает, в частности, h $\alpha$ -GalA, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 2, которая является такой же, как последовательность природной h $\alpha$ -GalA, но не ограничена ей, и пока h $\alpha$ -GalA имеет активность h $\alpha$ -GalA, h $\alpha$ -GalA также включает мутации, такие как замещения, делеции, добавления и т.д. в последовательности аминокислот природной h $\alpha$ -GalA. Если аминокислоты последовательности аминокислот h $\alpha$ -GalA замещены другими аминокислотами, количество замещенных аминокислот предпочти-

тельно составляет от 1 до 10, более предпочтительно, от 1 до 5, даже более предпочтительно, от 1 до 3, и еще более предпочтительно, от 1 до 2. Если аминокислоты в последовательности аминокислот  $\alpha$ -GalA удалены, количество удаленных аминокислот предпочтительно составляет от 1 до 10, более предпочтительно, от 1 до 5, даже более предпочтительно, от 1 до 3, и еще более предпочтительно, от 1 до 2. Мутация с объединением такого замещения и делеции аминокислот также может быть введена в  $\alpha$ -GalA. Когда аминокислоты добавляют к  $\alpha$ -GalA, предпочтительно, 1-10, более предпочтительно, 1-5, даже более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1-2 аминокислот добавляют в последовательность аминокислот  $\alpha$ -GalA или на N-концевой или C-концевой стороне. Мутация, объединяющая такое добавление, замещение и делецию аминокислот, также может быть введена в  $\alpha$ -GalA. Последовательность аминокислот мутированной  $\alpha$ -GalA предпочтительно имеет 80% или большую идентичность, более предпочтительно, 90% или более идентичность и даже более предпочтительно, 95% или более идентичность к последовательности аминокислот исходной  $\alpha$ -GalA.

Здесь термин " $\alpha$ -GalA имеет активность  $\alpha$ -GalA" означает, что она имеет активность не менее 3% относительно активности, присущей природному типу  $\alpha$ -GalA при конъюгировании с анти-hTfR антителом. Однако активность предпочтительно составляет не менее 10%, более предпочтительно, 20% или более, даже более предпочтительно, не менее 50%, и еще более предпочтительно, не менее 80% относительно активности, присущей природному типу  $\alpha$ -GalA. То же самое применяется, когда  $\alpha$ -GalA, конъюгированная анти-hTfR антителом, мутирована.

В данном изобретении термин "антитело" относится преимущественно к человеческому антителу, мышинному антителу, гуманизированному антителу, химерному антителу или человеческому антителу и другим антителам млекопитающих, и химерному антителу мышинного антитела и антитела другого млекопитающего, но пока они обладают свойством специфического связывания с конкретным антигеном, они не ограничены, и не существует конкретных ограничений животных видов антител.

В данном изобретении термин "человеческое антитело" относится к антителу, целый белок которого кодирован геном, происходящим от человека. Термин "человеческое антитело", однако, также включает антитело, кодированное геном, полученным введением мутации в исходный человеческий ген с целью улучшения эффективности экспрессии гена, например, без модификации исходной последовательности аминокислот. Термин "человеческое антитело" также включает антитело, в котором определенная часть человеческого антитела замещена частью другого человеческого антитела через объединение двух или более генов, кодирующих человеческие антитела. Человеческое антитело включает три определяющие комплементарности области (ОКО: аббревиатура определяющей комплементарности области) в легкой цепи иммуноглобулина, и три определяющие комплементарности области (ОКО) в тяжелой цепи иммуноглобулина. Три ОКО в легкой цепи иммуноглобулина называют, с N-концевой стороны, ОКО1, ОКО2 и ОКО3 соответственно. Три ОКО в тяжелой цепи иммуноглобулина также называют, с N-концевой стороны, ОКО1, ОКО2 и ОКО3 соответственно. Термин "человеческое антитело" также включает человеческое антитело, полученное замещением ОКО человеческого антитела на ОКО другого человеческого антитела для модификации таких свойств, как специфичность к антигену и сродство с оригинальными человеческими антителами, и т.д.

В данном изобретении термин "человеческое антитело" также включает антитело, которое получают модификацией гена исходного человеческого антитела введением мутации, такой как замещение, делеция, добавление, в последовательность аминокислот исходного антитела. При замещении одной или более аминокислот последовательности аминокислот исходного антитела другими аминокислотами, количество замещенных аминокислот предпочтительно может составлять 1-20, более предпочтительно, 1-5, и еще более предпочтительно, 1-3. При удалении одной или более аминокислот последовательности аминокислот исходного антитела, количество удаляемых аминокислот предпочтительно может составлять 1-20, более предпочтительно, 1-5, и еще более предпочтительно, 1-3. Антитело, полученное объединенной мутацией такого замещения и делеции аминокислот, также является "человеческим антителом". В некоторых случаях, одна или более аминокислот, предпочтительно, 1-20, более предпочтительно, 1-5, и еще более предпочтительно, 1-3 аминокислоты могут быть добавлены внутрь последовательности аминокислот исходного антитела на N- или C-концевой стороне. Антитело, полученное объединенной мутацией добавления, замещения и делеции аминокислот, также является "человеческим антителом". Последовательность аминокислот такого мутированного антитела имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, еще более предпочтительно, не менее 95%, и даже более предпочтительно, не менее 98%, последовательности аминокислот исходного антитела. Таким образом, в данном изобретении термин "ген, происходящий от человека" включает не только не мутированный ген, происходящий от человека, но также ген, полученный его модификацией.

Термин "мышинное антитело" относится к антителу, целый белок которого состоит из последовательности аминокислот, такой же, как для антитела, кодированного геном, происходящим от мыши. Поэтому термин "мышинное антитело" также включает антитело, которое кодировано геном, полученным введением мутации в оригинальный мышинный ген не вызывая изменений в его последовательности аминокислот, но для, например, улучшения эффективности экспрессии гена. Дополнительно, термин "мы-

шиное антитело" также включает антитело, полученное через объединение двух или более генов, кодирующих мышинные антитела через замену части мышинового антитела частью другого мышинового антитела. Мышиное антитело имеет три определяющих комплементарность области (ОКО) в легкой цепи иммуноглобулина и три определяющие комплементарность области (ОКО) в тяжелой цепи иммуноглобулина. Три ОКО в легкой цепи иммуноглобулина называют, с N-концевой стороны, ОКО1, ОКО2 и ОКО3 соответственно. Три ОКО в тяжелой цепи иммуноглобулина также называют, с N-концевой стороны, ОКО1, ОКО2 и ОКО3 соответственно. Например, термин "мышинное антитело" также включает антитело, полученное замещение ОКО мышинового антитела на ОКО другого мышинового антитела для модификации специфичности и сродства к оригинальным мышинным антителам.

В данном изобретении термин "мышинное антитело" также включает антитело, которое получают модификацией гена исходного мышинового антитела введением мутации, такой как замещение, делеция, добавление, в последовательность аминокислот исходного антитела. При замене одной или более аминокислот последовательности аминокислот исходного антитела другими аминокислотами, количество замещенных аминокислот может составлять 1-20, более предпочтительно, 1-5, и еще более предпочтительно, 1-3. При удалении одной или более аминокислот последовательности аминокислот исходного антитела, количество удаленных аминокислот может, предпочтительно, составлять 1-20, более предпочтительно, 1-5, и еще более предпочтительно, 1-3. Антитело, полученное объединенной мутацией этих замещений и делеций аминокислот, также включено в "мышинное антитело". При добавлении одной или более аминокислот, они могут быть добавлены внутрь последовательности аминокислот исходного антитела или его N- или C-концевой стороны, предпочтительно, 1-20, более предпочтительно, 1-5, и еще более предпочтительно, 1-3, по количеству. Антитело, полученное объединенной мутацией добавления, замещения и делеций аминокислот, также включено в "мышинное антитело". Последовательность аминокислот такого мутированного антитела имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, еще более предпочтительно, не менее 95%, и даже более предпочтительно, не менее 98%, с последовательностью аминокислот исходного антитела. Таким образом, в данном изобретении термин "нег, происходящий от мыши" включает не только не мутированный ген, происходящий от мыши, но также ген, полученный его модификацией.

В данном изобретении термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, в котором часть последовательности аминокислот его переменной области (например, особенно целой или части его ОКО) происходит от нечеловекоподобного животного, а оставшаяся часть происходит от человека. Примером гуманизированного антитела является антитело, полученное замещением трех определяющих комплементарность областей (ОКО) легкой цепи иммуноглобулина и трех определяющих комплементарность областей (ОКО) тяжелой цепи иммуноглобулина, составляющих человеческое антитело, на ОКО от нечеловекоподобного животного. Не существует особых ограничений в отношении биологических видов, из которых эти ОКО прививают в правильное положение человеческого антитела, если они происходят от нечеловекоподобного млекопитающего. Хотя виды включают, предпочтительно, мышь, крысу, кролика, лошадь или нечеловекоподобного примата, и более предпочтительно, мышь или крысу, например мышь.

В данном изобретении термин "химерное антитело" относится к антителу, полученному соединением фрагментов двух или более разных антител, происходящих от двух или более разных видов.

Химерным антителом, содержащим человеческое антитело и антитело нечеловекоподобного млекопитающего, является антитело, полученное замещение части человеческого антитела частью антитела нечеловекоподобного млекопитающего. Антитело получают из Fc области, Fab области и шарнирной области. Конкретным примером таких химерных антител является химерное антитело, Fc область которого происходит от человеческого антитела, а Fab область которого происходит от антитела нечеловекоподобного млекопитающего. Шарнирная область происходит либо от человеческого антитела, либо от антитела нечеловекоподобного млекопитающего. Наоборот, термин химерное антитело также включает такое, где Fc область происходит от антитела нечеловекоподобного млекопитающего, а Fab область происходит от человеческого антитела. В этом случае также, шарнирная область происходит либо от человеческого антитела, либо от антитела нечеловекоподобного млекопитающего.

Антитело может рассматриваться как состоящее из переменной области и постоянной области. Дополнительные примеры химерных антител включают антитело, в котором тяжелая цепь постоянной области ( $C_H$ ) и легкая цепь постоянной области ( $C_L$ ) происходят от человеческого антитела, а тяжелая цепь переменной области ( $V_H$ ) и легкая цепь переменной области ( $V_L$ ) происходят от антитела нечеловекоподобного млекопитающего, и наоборот, антитело, в котором тяжелая цепь постоянной области ( $C_H$ ) и легкая цепь постоянной области ( $C_L$ ) происходят от антитела нечеловекоподобного млекопитающего, в тяжелая цепь переменной области ( $V_H$ ) и легкая цепь переменной области ( $V_L$ ) происходят от человеческого антитела. В них не существует особых ограничений в отношении биологических видов нечеловекоподобного млекопитающего, хотя виды включают, предпочтительно, мышь, крысу, кролика, лошадь или нечеловекоподобного примата и более предпочтительно мышь.

Химерным антителом мышинового антитела и другого млекопитающего антитела является антитело, в котором часть мышинового антитела замещена частью антитела млекопитающего, отличного от мыши.

Пример такого химерного антитела включают химерное антитело, в котором Fc область получают из мышинового антитела, а Fab область получают из антитела другого млекопитающего, и наоборот, химерное антитело, в котором Fc область получают от другого млекопитающего, а Fab область получают из мышинового антитела. Здесь виды другого млекопитающего особенно не ограничены, пока они являются млекопитающими, отличными от мыши, но, предпочтительно, они включают крысу, кролика, лошадь или нечеловекоподобного примата.

Химерное антитело, содержащее человеческое антитело и мышиноое антитело, обозначено, в частности, "человеческое/мышинное химерное антитело". Примеры человеческих/мышинных химерных антител включают химерное антитело, в котором Fc область происходит от человеческого антитела, а Fab область происходит от мышинового антитела, и наоборот, химерное антитело, в котором Fc область происходит от мышинового антитела, а Fab область происходит от человеческого антитела. Шарнирная область происходит либо от человеческого антитела, либо от мышинового антитела. Дополнительные конкретные примеры человеческих/мышинных химерных антител включают такие, где тяжелая цепь постоянной области ( $C_H$ ) и легкая цепь постоянной области ( $C_L$ ) происходит от человеческого антитела, а его тяжелая цепь переменной области ( $V_H$ ) и легкая цепь переменной области ( $V_L$ ) происходит от мышинового антитела, и наоборот, такие, где тяжелая цепь постоянной области ( $C_H$ ) и легкая цепь постоянной области ( $C_L$ ) происходит от мышинового антитела, а тяжелая цепь переменной области ( $V_H$ ) и легкая цепь переменной области ( $V_L$ ) происходит от человеческого антитела.

Изначально, антитело имеет основную структуру, имеющую всего четыре полипептидные цепи, состоящие из двух иммуноглобулиновых легких цепей и двух иммуноглобулиновых тяжелых цепей. Однако в данном изобретении термин "антитело" относится, кроме антитела, имеющего такую основную структуру, также к:

- (1) антителу, состоящему из двух полипептидных цепей, содержащих одну иммуноглобулиновую легкую цепь и одну иммуноглобулиновую тяжелую цепь, и, как объясняется ниже,
- (2) одноцепочечному антителу, состоящему из иммуноглобулиновой легкой цепи, которая связана, на его С-концевой стороне, с линкерной последовательностью которая, в свою очередь, связана на ее С-концевой стороне, с иммуноглобулиновой тяжелой цепью,
- (3) одноцепочечным антителам, состоящим из иммуноглобулиновой тяжелой цепи, которая связана, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью которая, в свою очередь, связана на ее С-концевой стороне, с иммуноглобулиновой легкой цепью, и
- (4) антителом, состоящим из Fab области, т.е. структуры, оставленной после удаления Fc области из антитела, имеющего основную структуру в исходном понимании, и антителом, состоящим из Fab области и целой или части шарнирной области (включая Fab, F(ab') и F(ab')<sub>2</sub>).

Здесь термин "Fab" относится к молекуле, состоящей из одной легкой цепи, содержащей переменную область и  $C_L$  область (легкую цепь постоянной области) и одной тяжелой цепи, содержащей переменную область и  $C_{H1}$  область (часть 1 тяжелой цепи постоянной области), которые объединены дисульфидной связью между их соответствующими цистеиновыми остатками. Хотя тяжелая цепь в Fab может включать часть шарнирной области в дополнение к переменной области и  $C_{H1}$  области (части 1 тяжелой цепи постоянной области), шарнирная область в таком случае не имеет цистеинового остатка, которые в другом случае присутствует в шарнирной области и служит для связывания двух тяжелых цепей антитела вместе. В Fab, легкая цепь и тяжелая цепь соединены дисульфидной связью, образованной между цистеиновым остатком, присутствующим в легкой цепи постоянной области ( $C_L$  области) и цистеиновым остатком, расположенным в тяжелой цепи постоянной области ( $C_{H1}$  области) или шарнирной области. Так как она не имеет цистеинового остатка в шарнирной области, который служит для связи двух тяжелых цепей антитела, Fab состоит из одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Легкая цепь Fab включает переменную область и  $C_L$  область. Тяжелая цепь в качестве компонента Fab может состоять либо из переменной области и  $C_{H1}$  области, либо также части шарнирной области в дополнение к переменной области и  $C_{H1}$  области. Однако, в таком случае, шарнирная область выбирается таким образом, чтобы она не включала цистеиновый остаток, который может связывать две тяжелые цепи, для того, чтобы избежать образования дисульфидной связи между двух тяжелых цепей в их шарнирных областях. В F(ab'), тяжелая цепь включает, в дополнение к переменной области и  $C_{H1}$  области, всю или часть шарнирной области, содержащую цистеиновый остаток, который может связывать две тяжелые цепи. F(ab')<sub>2</sub> является молекулой, состоящей из двух F(ab'), связанных вместе через дисульфидную связь, образованную между цистеиновыми остатками, присутствующими в соответствующих шарнирных областях. Дополнительно, полимер, такой как димер и тример, который состоит из двух или более антител, соединенных друг с другом, прямо или через линкер, также включен в термин "антитело". Более того, в дополнение к вышесказанному, любая молекула, которая включает часть молекулы иммуноглобулина и имеет свойство специфического связывания с антигеном, также включена в термин "антитело" в соответствии с данным изобретением. Таким образом, в данном изобретении термин "иммуноглобулиновая легкая цепь" включает молекулу, которая получена из исходной иммуноглобулиновой легкой цепи и имеет последовательность аминокислот целой или части ее переменной области. Также, термин "иммуноглобулиновая тяжелая цепь" включает молекулу, которая получена из исходной иммуноглобулиновой тяжелой цепи и

имеет последовательность аминокислот целой или части его переменной области. Поэтому независимо от наличия целой или части последовательности аминокислот переменной области, молекула включена в термин "иммуноглобулиновая тяжелая цепь", даже если она не содержит Fc область, например.

Также, как сказано выше, Fc или Fc область относится к области, включающей фрагменты, состоящие из C<sub>H</sub>2 области (части 2 постоянной области тяжелой цепи) и C<sub>H</sub>3 области (части 3 постоянной области тяжелой цепи) в молекуле антитела.

Более того, в данном изобретении термин "антитело" также включает:

(5) scFab, scF(ab') и scF(ab')<sub>2</sub>, которые являются одноцепочечными антителами, полученными связыванием легкой цепи с тяжелой цепью, которые образуют, соответственно, Fab, F(ab') и F(ab')<sub>2</sub>, указанные в (4) выше, через линкерную последовательность. Такие scFab, scF(ab') и scF(ab')<sub>2</sub> могут быть молекулой, в которой либо легкая цепь связана, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана, на своей С-концевой стороне, с тяжелой цепью, либо тяжелая цепь связана, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана, на ее С-концевой стороне, с легкой цепью. Более того, scFv, который является одноцепочечным антителом, полученным связыванием легкой цепи переменной области с тяжелой цепью переменной области, через линкерную последовательность между ними, также включено в термин "антитело" в соответствии с данным изобретением. Такие scFv могут быть молекулой, в котором либо легкая цепь переменной области связана, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана, на своей С-концевой стороне, с тяжелой цепью переменной области, либо тяжелая цепь переменной области связана, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана, на ее С-концевой стороне, с легкой цепью переменной области.

В данном изобретении термин "одноцепочечное антитело" относится к белку, в котором последовательность аминокислот, содержащая целую или часть иммуноглобулиновой легкой цепи переменной области, связана, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, связана, на ее С-концевой стороне, с последовательностью аминокислот целой или части иммуноглобулиновой тяжелой цепи переменной области, и который обладает способностью специфически связываться с определенным антигеном. Например, такие, которые показаны в (2), (3) и (5) выше, включены в одноцепочечное антитело. Дополнительно, белок, в котором последовательность аминокислот, содержащая целую или часть иммуноглобулиновой тяжелой цепи переменной области, связана, на ее С-концевой стороне, с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, дополнительно связана, на ее С-концевой стороне, с последовательностью аминокислот целой или части иммуноглобулиновой легкой цепи переменной области, и который обладает способностью специфически связываться с определенным антигеном, также включен в термин "одноцепочечное антитело" в соответствии с данным изобретением. В одноцепочечном антителе, в котором иммуноглобулиновая тяжелая цепь связана, на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность, с иммуноглобулиновой легкой цепью, иммуноглобулиновая тяжелая цепь обычно не имеет Fc область. Иммуноглобулиновая легкая цепь переменной области имеет три определяющие комплементарности области (ОКО), которые участвуют в определении антигенной специфичности антитела. Так же, иммуноглобулиновая тяжелая цепь переменной области также имеет три ОКО. Эти ОКО являются первичными областями, которые определяют антигенную специфичность антитела. Поэтому одноцепочечное антитело предпочтительно, содержит все три ОКО иммуноглобулиновой тяжелой цепи и все три ОКО иммуноглобулиновой легкой цепи. Однако также возможно получить одноцепочечное антитело, в котором одна или более ОКО удалены, поскольку антиген-специфическое сродство антитела сохраняется.

В одноцепочечном антителе, линкерная последовательность, расположенная между легкой цепью и тяжелой цепью иммуноглобулина, является пептидной цепью, состоящей из, предпочтительно, 2-50, более предпочтительно, 8-50, еще более предпочтительно, 10-30, даже более предпочтительно, 12-18, или 15-25, например, 15 или 25 аминокислотных остатков. Хотя не существует конкретного ограничения определенной последовательности аминокислот такой линкерной последовательности, пока анти-hTfR антитело, содержащее обе цепи, связанные между собой, сохраняет сродство к hTfR, предпочтительно, его получают только из глицина или из глицина и серина. Например, существует последовательность аминокислот Gly-Ser, последовательность аминокислот Gly-Gly-Ser, последовательность аминокислот Gly-Gly-Gly, последовательность аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), последовательность аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), последовательность аминокислот Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 21) или последовательность, которая включает последовательность, соответствующую 2-10 или 2-5 из любых этих последовательностей аминокислот, связанных последовательно. Например, при связывании последовательности аминокислот всей иммуноглобулиновой тяжелой цепи переменной области на ее С-концевой стороне и через линкерную последовательность, с иммуноглобулиновой легкой цепью переменной области, предпочтительной линкерной последовательностью, состоящей из всего 15 аминокислот, соответствующих трем из последовательностей аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), связанных последовательно.

В данном изобретении термин "человеческий трансферриновый рецептор" или "hTfR" относится к мембранному белку, имеющему последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 5. Анти-

hTfR антителом в соответствии с данным изобретением является, в одном из вариантов, такое, которое связывается с областью цистеинового остатка в положении 89 от N-конца с фенилаланином на C-конце в последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 5 (внеклеточная область hTfR), хотя и не ограничено этим вариантом. Далее в данном изобретении термин "обезьяний трансферриновый рецептор" или "обезьяний TfR" относится к, в частности, мембранному белку, имеющему последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 6, полученную от яванского макака (*Macaca fascicularis*). Анти-hTfR антитело одного варианта данного изобретения также связывается с областью от цистеинового остатка в положении 89 от N-конца с фенилаланином на C-конце в последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 6 (внеклеточная область обезьяньего TfR).

В качестве способа получения антитела против hTfR обычно применяют создание рекомбинантного человеческого трансферринового рецептора (rhTfR) с применением клеток, трансдуцированных с векторами экспрессии, включающими hTfR гены и иммунизация животного, такого как мышь, этим rhTfR. Клетки гибридомы, способные образовывать антитело, могут быть получены сбором производящих антитело клеток против hTfR от животного после иммунизации и слияния клеток с клетками миеломы.

Кроме того, клетки, вырабатывающие антитело к hTfR, также могут быть получены сбором иммуноцитов от животного, такого как мышь, и иммунизацией их rhTfR через *in vitro* иммунизацию. При проведении иммунизации *in vitro* иммунизацией нет конкретных ограничений по видам животных, от которых получают иммуноциты, хотя предпочтительными являются мышь, крыса, кролик, морская свинка, собака, кошка, лошадь и приматы, включая человека, и более предпочтительными являются мышь, крыса и человек, и еще более предпочтительно, мышь и человек. В качестве мышиных иммуноцитов могут применяться клетки селезенки, полученные из мышины селезенки, например. В качестве человеческих иммуноцитов могут применяться такие клетки, которые получают из человеческой периферической крови, костного мозга, селезенки и подобных. Иммунизацией человеческих иммуноцитов через *in vitro* иммунизацию может быть получено человеческое антитело к hTfR.

После иммунизации клеток иммунной системы через *in vitro* иммунизацию, клетки сливают с клетками миеломы с получением клеток гибридомы, способных образовывать антитела. Кроме того, также возможно экстрагировать мРНК из клеток после иммунизации для синтеза кДНК, амплифицируя фрагменты ДНК, содержащие гены, кодирующие легкую и тяжелую цепь иммуноглобулина, ПЦР реакцией с применением этой кДНК в качестве шаблона, и искусственно воссоздавать гены антитела с применением амплифицированных фрагментов ДНК.

Клетки гибридомы, полученные указанным выше способом, также включают клетки, вырабатывающие антитела, которые распознают белки, отличные от hTfR, как антигены. Также все клетки гибридомы, образующие анти-hTfR антитела, не обязательно вырабатывают анти-hTfR антитела, которые демонстрируют желаемое средство к hTfR.

Также искусственно восстановленные гены антитела включают такие гены, которые кодируют антитела, распознающие другие белки, отличные от hTfR, в качестве антигенов. Более того, не все гены, кодирующие анти-hTfR антитела, обязательно имеют желаемые свойства, такие как кодирование анти-hTfR антитела, демонстрирующего высокое средство к hTfR.

Поэтому стадия выбора обязательна для выбора клеток гибридомы, вырабатывающих антитело, имеющее желаемые свойства (такие как высокое средство к hTfR), из свежее полученных клеток гибридомы, как описано выше. Кроме того, в случае, когда гены антитела искусственно реконструированы, стадия выбора необходима для выбора из генов антитела, кодирующих антитело, имеющее желаемые свойства (такие как высокое средство к hTfR).

Например, для выбора клеток гибридомы, которые вырабатывают высокоаффинные антитела к анти-hTfR антителу, применяется способ, в котором рекомбинантный hTfR добавляют в планшет и выдерживают в нем, затем добавляют надосадочную жидкость культуры клеток гибридомы, и после удаления антител, не связанных с рекомбинантным hTfR из планшета, измеряют количество антител, оставшееся в планшете. Согласно этого способа, чем выше средство к hTfR антитела, содержащегося в надосадочной жидкости культуры клеток гибридомы, добавленной в планшет, тем выше становится количество антител, содержащихся в планшете. Поэтому измерение количества антител, содержащихся в планшете, позволяет выбрать такие клетки гибридомы, которые соответствуют планшетам, в которых антитела хранятся в большем количестве в виде колоний клеток, вырабатывающих анти-hTfR антитела, имеющие относительно высокое средство к hTfR. Также возможно выделять ген, кодирующий антитело с высоким средством, через экстрагирование мРНК из каждой колонии клеток, выбранных таким образом, синтезируя кДНК, и амплификацию фрагмента ДНК, содержащего ген, кодирующий анти-hTfR антитело через ПЦР с применением кДНК в качестве шаблона.

Для выбора гена, кодирующего высокоаффинное анти-hTfR антитело, из искусственно реконструированных выше генов антитела, искусственно реконструированные гены антитела один раз встраивают в вектор экспрессии, и вектор экспрессии затем встраивают в клетки хозяина. Хотя нет конкретных ограничений для клеток, применяемых в качестве клеток хозяина, даже если они являются прокариотами, эукариотами, поскольку они могут экспрессировать ген антитела после введения вектора экспрессии, имеющего встроенный искусственно реконструированный ген антитела, предпочтительными являются

клетки, происходящие от млекопитающих, таких как человек, мышь, китайский хомяк и подобные, и особенно предпочтительными являются клетки CHO, происходящие из клеток яичника китайского хомяка, или клетки NS/0, происходящие из миеломы мыши. Кроме того, не существует конкретных ограничений вектора экспрессии, применяемого для встраивания гена, кодирующего антитело, и его экспрессии, и может применяться любой вектор экспрессии, пока он может экспрессировать ген, будучи встроенным в клетки млекопитающего. Ген, встроенный в вектор экспрессии, расположен ниже последовательность ДНК, которая может регулировать частоту транскрипции гена в клетках млекопитающего (регуляторный участок экспрессии гена). Примеры регуляторных участков экспрессии гена, которые могут применяться в соответствии с данным изобретением, включают промотор, полученный из цитомегаловируса, ранний промотор SV40, промотор человеческого фактора элонгации-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), промотор человеческого убиквитина С.

Клетки млекопитающих, имеющие такой встроенный вектор экспрессии, предназначены для экспрессии антител, кодированных искусственно реконструированным геном выше, встроены в вектор экспрессии. Для выбора таких клеток, которые вырабатывают высокоаффинные антитела к анти-hTfR антителу из полученных выше клеток, экспрессирующих искусственно реконструированное антитело, применяют способ, в котором рекомбинантный hTfR добавляют в планшет и выдерживают в нем, затем рекомбинантный hTfR подвергают контакту с надосадочной жидкостью культуры клеток, и после удаления антител, не связанных с рекомбинантным hTfR из планшета, измеряют количество антител, оставшихся в планшете. Согласно этому способу, чем выше сродство к hTfR антител, содержащихся в надосадочной жидкости клеточной культуры, тем больше становится количество антител, оставшихся в планшете. Поэтому через измерение количества антител, оставшихся в планшете, можно выбрать такие клетки, которые соответствуют планшету, где антитело содержится в большем количестве, в качестве колонии клеток, вырабатывающих анти-hTfR антитело, имеющее относительно высокое сродство к анти-hTfR антителу, и в перспективе можно выбрать ген, кодирующий анти-hTfR антитело, имеющее высокое сродство анти-hTfR антитела к hTfR. При применении колонии клеток, выбранных таким образом, можно провести ПЦР для амплификации ДНК фрагмента, содержащего ген, кодирующий анти-hTfR антитело для выделения гена, кодирующего антитело с высоким сродством.

Выбор гена, кодирующего анти-hTfR антитело с высоким сродством из искусственно реконструированных выше генов антител, также может проводиться встраиванием искусственно реконструированных генов антител в вектор экспрессии, встраивая вектор экспрессии в клетки *E. coli*, культивируя клетки *E. coli* и выбирая клетки *E. coli*, имеющие желаемый ген, таким же образом, как при описанном выше выборе клеток гибридомы, с применением надосадочной жидкости культуры клеток *E. coli* или раствора, содержащего антитело, полученного лизированием клеток *E. coli*. Выбранные таким образом клетки *E. coli* экспрессируют ген, кодирующий анти-hTfR антитело, имеющее относительно высокое сродство к hTfR. Из этой колонии клеток может быть выделен ген, кодирующий анти-hTfR антитело, имеющее относительно высокое сродство анти-hTfR антитела к hTfR. Для того, чтобы позволить секрецию антитела в культуральную надосадочную жидкость *E. coli*, ген антитела может быть встроен в вектор экспрессии так, что последовательность сигнала секреции присоединена на N-концевой стороне гена.

Другим способом выбора гена, кодирующего анти-hTfR антитело с высоким сродством, является способ, в котором антитело, кодированное искусственно воспроизведенным выше геном антитела, экспрессируется и остается в фаговых частицах. Для этого ген антитела воспроизводят в виде гена, кодирующего одноцепочечное антитело. Способ сохранения фаговых частиц для удержания антитела на их поверхности описан в международных публикациях WO1997/09436 и WO1995/11317 и подобных, и, следовательно, хорошо известен. Для выбора фагов, удерживающих антитело с высоким сродством к анти-hTfR антителу, из фагов, удерживающих антитело, кодированные искусственно воспроизведенными генами антитела, применяется способ, в котором рекомбинантный hTfR из планшета добавляют в планшет и выдерживают там, позволяя контактировать с фагами, и после удаления фагов, не связанных с рекомбинантным hTfR, измеряют количество фагов, оставшихся в планшете. Согласно этому способу, чем выше сродство с hTfR антитела, удержанного на фаговых частицах, тем больше становится количество фага, оставшегося в планшете. Поэтому через измерение количества фагов, оставшихся в планшете, можно выбрать фаговые частицы, соответствующие планшету, где фаги остались в большем количестве, в качестве фаговых частиц, вырабатывающих анти-hTfR антитело, имеющее анти-hTfR антитело с относительно высоким сродством к hTfR, и затем можно выбрать ген, кодирующий анти-hTfR антитело с высоким сродством к hTfR. Применяя выбранные таким образом фаговые частицы проводят ПЦР для амплификации ДНК фрагмента, содержащего ген, кодирующий анти-hTfR антитело, и выделяют ген, кодирующий антитело с высоким сродством.

Возможно получить кДНК или фаговую ДНК из полученных выше клеток, таких как клетки гибридомы, вырабатывающих антитело с высоким сродством к анти-hTfR, или из полученных выше фаговых частиц, удерживающих антитело с высоким сродством к анти-hTfR, и провести ПЦР или подобную реакцию с применением их в качестве шаблона для амплификации и выделения ДНК фрагмента, содержащего ген, кодирующий всю или часть легкой цепи анти-hTfR антитела, тяжелой цепи анти-hTfR антитела или одноцепочечного антитела в качестве анти-hTfR антитела. Таким же образом возможно провести

ПЦР или подобную реакцию для амплификации и выделения ДНК фрагмента, содержащего ген, кодирующий всю или часть легкой цепи переменной области анти-hTfR антитела, или ДНК фрагмента, содержащего ген, кодирующий всю или часть тяжелой цепи переменной области анти-hTfR антитела.

Анти-hTfR антитело с высоким сродством может быть получено встраиванием целого или части гена, кодирующего легкую цепь и тяжелую цепь этого анти-hTfR антитела с высоким сродством в вектор экспрессии, трансформируя клетки хозяина, такие как клетки млекопитающего, таким вектором экспрессии, и культивированием полученных трансформированных клеток. Применяя нуклеотидную последовательность выделенного гена, кодирующего анти-hTfR антитело, также возможно транслировать последовательность аминокислот анти-hTfR антитела и искусственно синтезировать фрагмент ДНК, кодирующий ту же последовательность аминокислот. При искусственном синтезе фрагмента ДНК, уровень экспрессии анти-hTfR антитела в клетках хозяина может быть улучшен правильным выбором кодонов.

Для встраивания мутации, такой как замещение, делеция, добавление и подобное, в последовательность аминокислот исходного анти-hTfR антитела, мутация может быть встроена желательным образом в ген, кодирующий анти-hTfR антитело, содержащееся в выделенном фрагменте ДНК. Хотя ген, кодирующий мутированное анти-hTfR антитело, имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, с исходным геном, не существует конкретного ограничения уровня гомологии, пока сродство к hTfR не потеряно. При встраивании мутации в последовательность аминокислот для модификации количества или типа сахарных цепей, связанных с анти-hTfR антителом, возможно улучшить стабильность анти-hTfR антитела в теле.

При введении мутации в ген, кодирующий всю или часть легкой цепи переменной области анти-hTfR антитела, мутированный таким образом ген имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, с исходным геном, хотя не существует конкретного ограничения уровня гомологии, пока сродство к hTfR не потеряно. При замещении одной или более аминокислот последовательности аминокислот легкой цепи переменной области другими аминокислотами, количество замещаемых аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно, 1-5, еще более предпочтительно, 1-3, и даже более предпочтительно, 1 или 2. При удалении одной или более аминокислот из последовательности аминокислот легкой цепи переменной области, количество удаляемых аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно, 1-5, еще более предпочтительно, 1-3, даже более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких замещений и делеций. При добавлении одной или более аминокислот к легкой цепи переменной области, они могут быть добавлены внутри или на N-концевой стороне или C-концевой стороне последовательности аминокислот легкой цепи переменной области, и количество добавленных аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно, 1-5, еще более предпочтительно, 1-3, и даже более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких добавлений, замещений и делеций. Мутированная таким образом последовательность аминокислот легкой цепи переменной области имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, еще более предпочтительно, не менее 95% с последовательностью аминокислот исходной легкой цепи переменной области. В частности, при замещении одной или более аминокислот последовательности аминокислот ОКО другими аминокислотами, количество замещаемых аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1 или 2. При удалении одной или более аминокислот последовательности аминокислот ОКО, количество удаляемых аминокислот предпочтительно составляет, 1-5, более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких замещений и делеций аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот, они могут быть добавлены внутри или на N-концевой стороне или C-концевой стороне последовательности аминокислот, и количество добавленных аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких добавлений, замещений и делеций аминокислот. Последовательность аминокислот соответствующего мутированного ОКО имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, еще более предпочтительно, не менее 95% с последовательностью аминокислот исходного ОКО.

При введении мутации в ген, кодирующий всю или часть тяжелой цепи переменной области анти-hTfR антитела, мутированный таким образом ген имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, с исходным геном, хотя не существует конкретного ограничения уровня гомологии, пока сродство к hTfR не потеряно. При замещении одной или более аминокислот последовательности аминокислот тяжелой цепи переменной области другими аминокислотами, количество замещаемых аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно, 1-5, еще более предпочтительно, 1-3, и даже более предпочтительно, 1 или 2. При удалении одной или более аминокислот из последовательности аминокислот тяжелой цепи переменной области, количество удаляемых аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно, 1-5, еще более предпочтительно, 1-3, даже более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких замещений и делеций. При добавлении одной или более аминокислот к тяжелой цепи переменной области, они могут быть добавлены внутри или на N-концевой стороне или C-концевой стороне последовательности

аминокислот тяжелой цепи переменной области, и количество добавленных аминокислот предпочтительно составляет 1-10, более предпочтительно, 1-5, еще более предпочтительно, 1-3, и даже более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких добавлений, замещений и делеций. Мутированная таким образом последовательность аминокислот тяжелой цепи переменной области имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, еще более предпочтительно, не менее 95% с последовательностью аминокислот исходной тяжелой цепи переменной области. В частности, при замещении одной или более аминокислот последовательности аминокислот ОКО другими аминокислотами, количество замещаемых аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1 или 2. При удалении одной или более аминокислот последовательности аминокислот ОКО, количество удаляемых аминокислот предпочтительно составляет, 1-5, более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких замещений и делеций аминокислот. При добавлении одной или более аминокислот, они могут быть добавлены внутри или на N-концевой стороне или C-концевой стороне последовательности аминокислот, и количество добавленных аминокислот предпочтительно составляет 1-5, более предпочтительно, 1-3, еще более предпочтительно, 1 или 2. Также может проводиться объединенная мутация таких добавлений, замещений и делеций аминокислот. Последовательность аминокислот соответствующего мутированного ОКО имеет гомологию, предпочтительно, не менее 80%, более предпочтительно, не менее 90%, еще более предпочтительно, не менее 95% с последовательностью аминокислот исходного ОКО.

Мутация может быть встроена в обе переменные области легкой цепи и тяжелой цепи анти-hTfR антитела объединение описанной выше мутации в легкой цепи переменной области анти-hTfR антитела и указанной выше мутации в тяжелой цепи переменной области анти-hTfR антитела.

Замещения аминокислот в последовательности аминокислот легкой и тяжелой цепей указанного выше анти-hTfR антитела другими аминокислотами включают замещение между аминокислотами, классифицированными в те же группы, как и ароматические аминокислоты (Phe, Trp, Tyr), алифатические аминокислоты (Gly, Ala, Leu, Ile, Val), аминокислоты амидного типа (Gln, Asn), основные аминокислоты (Lys, Arg, His), кислые аминокислоты (Glu, Asp), аминокислоты с гидроксильными группами (Ser, Thr), разветвленные аминокислоты (Val, Leu, Ile), аминокислоты с меньшими боковыми цепями (Gly, Ala, Ser, Thr, Met), аминокислоты с не полярными боковыми цепями (Ala, Val, Leu, Leu, Ile, Pro, Phe, Met). Ожидается, что замещение между такими аналогичными аминокислотами не вызывает никаких изменений в фенотипе белка (т.е. оно является консервативным замещением аминокислот). Примеры консервативных замещений аминокислот хорошо известны в данной области техники и описаны в разных ссылках (см., например, Bowie et al., Science, 247:1306-1310 (1990)).

При добавлении аминокислот к C-концевой или N-концевой стороне анти-hTfR антитела мутацией и связывание анти-hTfR антитела и лекарственного средства (включая физиологически активный белок), оказывающего свой действие в мышце, через аминокислоты, аминокислоты должны составлять часть анти-hTfR антитела в конъюгате.

Анти-hTfR антитело, полученное культивированием клеток, выбранных описанными выше способами и подобными, вырабатывающих анти-hTfR антитело, которое имеет относительно высокое сродство анти-hTfR антитела к hTfR, и анти-hTfR антитело, полученное экспрессией гена, кодирующего анти-hTfR антитело с высоким сродством, может быть модифицировано встраиванием мутации в их последовательности аминокислот, такой как замещение, делеция, добавление, для придания им желаемых свойств. Встраивание мутации в последовательность аминокислот анти-hTfR антитела может проводиться встраиванием мутации в ген, соответствующий последовательности аминокислот.

Сродство анти-hTfR антитела к hTfR может быть скорректировано по желанию встраиванием мутации, такой как замещение, делеция и добавление, в последовательность аминокислот переменной области антитела. Например, если антитело имеет такое высокое сродство со своим антигеном, которое приводит к слишком низкой константе диссоциации в воде, существует вероятность, что антитело может, после введения в тело, не диссоциироваться от антигена, тем самым приводя к функциональному недостатку. В этом случае наиболее предпочтительное антитело, подходящее для данной цели, может быть получено встраиванием мутации в переменную область антитела так, чтобы скорректировать постепенно константу диссоциации в 2-5 раз, 5-10 раз, 10-100 раз и так далее, от исходного антитела. Наоборот, константа диссоциации может быть скорректирована в 1/2-1/5 раза, 1/5-1/10 раза, 1/10-1/100 раза и так далее от исходного антитела встраиванием мутации.

Встраивание мутации, такой как замещение, делеция и добавление, в последовательность аминокислот анти-hTfR антитела может проводиться встраиванием мутации в определенные положения нуклеотидной последовательности гена либо, например, ПЦР или подобной реакцией с применением гена, кодирующего анти-hTfR антитело, в качестве шаблона, либо рандомным встраиванием мутации.

Встраивание мутации в последовательность аминокислот анти-hTfR антитела для корректировки сродства антитела к hTfR может проводиться, например, встраиванием гена, кодирующего анти-hTfR антитело, в виде одноцепочечного антитела в фагмид, получением с этим фагмидом фага с экспрессированным одноцепочечным антителом на поверхности его капсида, разрешением фагу размножаться при

встраивании мутации в ген, кодирующий одноцепочечное антитело с применением мутагена или подобного, и выбором из размножившегося фага того фага, который экспрессирует одноцепочечное антитело, имеющее желаемую константу диссоциации либо способом, описанным выше, либо очисткой с применением антигенной колонки в определенных условиях.

Если антитело, имеющее относительно высокое сродство к hTfR и полученное описанным выше способом, в котором выбраны клетки, вырабатывающие антитело с высоким сродством, является антителом нечеловекоподобного животного, оно может быть превращено в гуманизованное антитело. Гуманизованным антителом является антитело, полученное с применением последовательности аминокислот части переменной области (например, целой или части ОКО) антитела нечеловекоподобного животного, и замещением подходящей области человеческого антитела последовательностью (имплантацией) при сохранении специфичности к антигену. Примеры гуманизованных антител включают антитело, полученное замещением трех определяющих комплементарность областей (ОКО) в легкой цепи иммуноглобулина и трех определяющих комплементарность областей (ОКО) в тяжелой цепи иммуноглобулина, составляющих человеческое антитело, на ОКО нечеловекоподобного животного. Хотя не существует конкретных ограничений для биологических видов, от которых получают ОКО, вводимые в человеческое антитело, пока они являются нечеловекоподобным животным, предпочтительно, они включают мышь, крысу, кролика, лошадь и нечеловекоподобного примата, более предпочтительно, мышь и крысу, и еще более предпочтительно, мышь. Хорошо известно, что может быть необходимо воспроизвести исходную активность донорного антитела замещением соответствующей части человеческого антитела в качестве акцептора на последовательность аминокислот области вне ОКО, которая вовлечена в сохранение структуры ОКО или связывание с антигеном, а также ОКО антитела нечеловекоподобного животного. Область вне ОКО также называют каркасной областью (КО). Таким образом, получение гуманизованного антитела включает трансплантацию ОКО (и, необязательно, окружающих КО) антитела нечеловекоподобного животного вместо ОКО (и, необязательно, окружающих КО) переменных областей человеческого антитела.

Как указано выше, в гуманизованном антителе области антитела нечеловекоподобного животного, имплантированные в переменные области исходного человеческого антитела, обычно включают сами ОКО или ОКО и их соседнюю часть КО. Однако такие КО, имплантированные вместе с ОКО, также играют роль либо в сохранении структуры ОКО, либо в связывании с антигеном, и тем самым обладают существенной функцией в определении комплементарности антитела, и термин "ОКО" в соответствии с данным изобретением относится к таким областям, которые взяты или могут быть взяты из антитела нечеловекоподобного животного и имплантированы в гуманизованное антитело, при получении гуманизованного антитела. Таким образом, область, в общем считающаяся находящейся в КО области, включена в ОКО в соответствии с данным изобретением, так как она играет роль либо в сохранении структуры ОКО, либо в связывании с антигеном, и тем самым обладает существенной функцией в определении комплементарности антитела.

Далее представлено подробное объяснение варианта, в котором анти-hTfR антителом является гуманизованное антитело или человеческое антитело. В легкой цепи человеческого антитела имеются цепи  $\lambda$  и  $\kappa$ . Легкой цепью, составляющей человеческое антитело, может быть любая из  $\lambda$  и  $\kappa$  цепей. И в человеческой тяжелой цепи имеются цепи  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\sigma$  и  $\epsilon$ , которые соответствуют IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. Хотя тяжелой цепью, составляющей анти-hTfR антитело, может быть любая из  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\sigma$  и  $\epsilon$  цепей, предпочтительной является  $\gamma$  цепь. Кроме того, в  $\gamma$  цепи человеческой тяжелой цепи имеются  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  и  $\gamma 4$  цепи, которые соответствуют IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 соответственно. Если тяжелой цепью, составляющей анти-hTfR антитело, является  $\gamma$  цепь, хотя  $\gamma$  цепью может быть любая из  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  и  $\gamma 4$  цепей, предпочтительной является  $\gamma 1$  или  $\gamma 4$  цепь. В случае, когда анти-hTfR антителом является гуманизованное антитело или человеческое антитело и IgG, легкой цепью человеческого антитела может быть либо  $\lambda$  цепь, либо  $\kappa$  цепь, и хотя тяжелой цепью человеческого антитела может быть любая из  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  и  $\gamma 4$  цепей, предпочтительной является  $\gamma 1$  или  $\gamma 4$  цепь. Например, предпочтительный вариант анти-hTfR антитела включает такой, в котором легкой цепью является  $\lambda$  цепь и тяжелой цепью является  $\gamma 4$  цепь, и такой, в котором легкой цепью является  $\lambda$  цепь и тяжелой цепью является  $\gamma 1$ .

В соответствии с данным изобретением, фармацевтическим агентом, конъюгированным с анти-hTfR антителом, включая биологически активный белок, является агент, оказывающий свое действие в мышце. Способы конъюгирования анти-hTfR антитела с таким агентом включают конъюгирование через не пептидный линкер или пептидный линкер. В качестве не пептидного линкера может применяться полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксипропиленгликоль, полипропиленгликоль, поливинилспирт, полисахарид, декстран, поливиниловый эфир, биоразлагаемый полимер, липидный полимер, хитин и гиалуроновая кислота, их производное или их сочетание. Пептидным линкером является пептидная цепь, состоящая из пептид-связанных 1-50 аминокислот, или ее производное, где N-концевая и C-концевая стороны пептидного линкера образуют ковалентные связи с анти-hTfR антителом или агентом, соответственно, тем самым связывая анти-hTfR антитело и агент.

Конъюгат анти-hTfR антитела в соответствии с данным изобретением и фармацевтического агента с применением ПЭГ в качестве не пептидного линкера особенно предпочтителен в качестве анти-hTfR антитело-ПЭГ-агента. Анти-hTfR антитело-ПЭГ-агент может быть получен конъюгированием анти-hTfR антитела и ПЭГ с получением анти-hTfR антитело-ПЭГ с последующим конъюгированием анти-hTfR антитела-ПЭГ с агентом. Альтернативно, анти-hTfR антитело-ПЭГ-агент может быть получен конъюгированием фармацевтического агента с ПЭГ с получением агента-ПЭГ, и затем конъюгированием агента-ПЭГ с анти-hTfR антителом. ПЭГ, модифицированный функциональной группой, такой как карбонат, карбонилимидазол, активный сложный эфир карбоновой кислоты, азлактон, циклический имидотион, изоцианат, изотиоцианурат, имидат или альдегид, применяют для конъюгации ПЭГ с анти-hTfR антителом и агентом. Функциональная группа, введенная в ПЭГ, взаимодействует в основном с анти-hTfR антителом и аминокислотной группой молекулы агента, с получением ковалентной связи ПЭГ и hTfR антитела и агента. Не имеется конкретных ограничений по молекулярной массе и форме ПЭГ, применяемого здесь, но его средняя молекулярная масса (ММ) предпочтительно составляет от ММ=500 до 60000, более предпочтительно, от ММ=500 до 20000. Например, ПЭГ, имеющий среднюю молекулярную массу около 300, около 500, около 1000, около 2000, около 4000, около 10000, около 20000 или подобную, может подходящим образом применяться в качестве не пептидного линкера.

Например, "анти-hTfR антитело-ПЭГ" может быть получено смешиванием анти-hTfR антитела с полиэтиленгликолем, имеющим альдегидные группы в качестве функциональных групп (АЛД-ПЭГ-АЛД) так, что молярное отношение АЛД-ПЭГ-АЛД к антителу составляет 11, 12,5, 15, 110, 120 и подобное, и последующим добавлением к смеси восстанавливающего агента, такого как NaCNBH<sub>3</sub>, для проведения реакции. Затем анти-hTfR антитело-ПЭГ подвергают взаимодействию с фармацевтическим агентом с присутствием восстанавливающего агента, такого как NaCNBH<sub>3</sub>, с получением анти-hTfR антитело-ПЭГ-агента. Наоборот, анти-hTfR антитело-ПЭГ-агент также может быть получен сначала конъюгированием агента с АЛД-ПЭГ-АЛД с получением агента-ПЭГ, и затем конъюгированием агента-ПЭГ с анти-hTfR антителом.

Если фармацевтическим агентом является биологически активный белок (целевой белок), анти-hTfR антитело и целевой белок могут быть конъюгированы с С-концевой стороной или N-концевой стороной тяжелой или легкой цепи анти-hTfR антитела через линкерную последовательность или непосредственно, соответственно, с N-концевой стороной или С-концевой стороной целевого белка через пептидную связь. Слитый белок, полученный конъюгированием анти-hTfR антитела и целевого белка таким образом, может быть получен встраиванием фрагмента ДНК, в котором кДНК, кодирующая целевой белок, размещена в каркасе в векторе экспрессии для клетки млекопитающего последовательно или размещением последовательности ДНК, кодирующей линкерную последовательность, на 3'-концевой стороне или 5'-концевой стороне кДНК, кодирующей тяжелую или легкую цепь анти-hTfR антитела, и культивированием клетки млекопитающего, в которую встроены векторы экспрессии. В таких клетках млекопитающих если фрагмент ДНК, кодирующий целевой белок, связан с тяжелой цепью, вектор экспрессии для клетки млекопитающего, встраивающий фрагмент кДНК, кодирующий легкую цепь анти-hTfR антитела, также вводят в ту же клетку хозяина, и если фрагмент ДНК, кодирующий целевой белок, связан с легкой цепью, вектор экспрессии для клетки млекопитающего, встраивающий фрагмент кДНК кодирующий тяжелую цепь анти-hTfR антитела, также вводят в ту же клетку хозяина. Если анти-hTfR антителом является одноцепочечное антитело, слитый белок, в котором конъюгированы анти-hTfR антитело и целевой белок, может быть получен встраиванием фрагмента ДНК, в котором кДНК, кодирующая одноцепочечное анти-hTfR антитело, связана на 5'-концевой стороне или 3'-концевой стороне кДНК, кодирующей целевой белок, непосредственно или с ДНК последовательностью, кодирующей линкерную последовательность, расположенную между ними, в вектор экспрессии (для эукариотной клетки, такой как клетка млекопитающего, дрожжи, или прокариотной клетки, такой как *E. coli*), и экспрессированием слитого белка в клетке, в которую встроены векторы экспрессии. Слитый белок должен пониматься как одна форма конъюгата.

В слитом белке такого типа, в котором фармацевтический агент связан с легкой цепью анти-hTfR антитела на ее С-концевой стороне, трансферриновый рецептор античеловеческого антитела содержит последовательность аминокислот, включающую всю или часть легкой цепи переменной области и последовательность аминокислот, включающую всю или часть тяжелой цепи переменной области, и агент связан с легкой цепью этого трансферринового рецептора античеловеческого антитела на ее С-концевой стороне. Здесь легкая цепь анти-hTfR антитела и агент могут быть связаны вместе, прямо или через линкер.

В слитом белке такого типа, в котором фармацевтический агент связан с тяжелой цепью анти-hTfR антитела на ее С-концевой стороне, трансферриновый рецептор античеловеческого антитела содержит последовательность аминокислот, включающую целую или часть легкой цепи переменной области и последовательность аминокислот, включающую целую или часть тяжелой цепи переменной области, и агент связан с тяжелой цепью этого трансферринового рецептора античеловеческого антитела на ее С-концевой стороне. Здесь тяжелая цепь анти-hTfR антитела и агент могут быть связаны вместе, прямо или через линкер.

В слитом белке того типа, в котором фармацевтический агент связан с легкой цепью анти-hTfR антитела на ее N-концевой стороне, трансферриновый рецептор античеловеческого антитела содержит последовательность аминокислот, включающую всю или часть легкой цепи переменной области и последовательность аминокислот, включающую всю или часть тяжелой цепи переменной области, и агент связан с легкой цепью этого трансферринового рецептора анти-человеческого антитела на ее N-концевой стороне. Здесь легкая цепь анти-hTfR антитела и агент могут быть связаны вместе, прямо или через линкер.

В слитом белке такого типа, в котором фармацевтический агент связан с тяжелой цепью анти-hTfR антитела на ее N-концевой стороне, трансферриновый рецептор античеловеческого антитела содержит последовательность аминокислот, включающую целую или часть легкой цепи переменной области и последовательность аминокислот, включающую целую или часть тяжелой цепи переменной области, и агент связан с тяжелой цепью этого трансферринового рецептора анти-человеческого антитела на ее N-концевой стороне. Здесь тяжелая цепь анти-hTfR антитела и агент могут быть связаны вместе, прямо или через линкер.

В описанных выше вариантах, линкерная последовательность, расположенная между анти-hTfR антителом и агентом, может быть пептидной цепью, включающей, предпочтительно, 1-50, более предпочтительно, 1-17, еще более предпочтительно, 1-10, даже более предпочтительно, 1-5 аминокислот, с в соответствии с агентом, связываемым с анти-hTfR антителом, количество аминокислот линкерной последовательности может быть скорректировано до 1, 2, 3, 1-17, 1-10, 10-40, 20-34, 23-31, 25-29, и т.д., при желании. Хотя нет конкретного ограничения по последовательности аминокислот линкерной последовательности, пока связанное ей анти-hTfR антитело сохраняет сродство к hTfR и агент, связанный линкерной последовательностью также демонстрирует собственную физиологическую активность белка в физиологических условиях, линкер, предпочтительно, может быть составлен из глицина и серина. Такие линкерные последовательности предпочтительно, но не ограничиваясь ими, включают такие, которые состоят из глицина и серина, например, последовательность аминокислот Gly-Ser, последовательность аминокислот Gly-Gly-Ser, последовательность аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), последовательность аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4) или последовательность, составленную из 1-50 аминокислот, в которой эти последовательности аминокислот повторяются от 1 до 10 или от 2 до 5 раз, или последовательность, в которой эти последовательности аминокислот повторяются от 2 до 17, от 2 до 10, от 10 до 40, от 20 до 34, от 23 до 31 или от 25 до 29 раз, и т.д., пока связанное анти-hTfR антитело сохраняет сродство к hTfR, и целевой белок, связанный линкерными последовательностями, может оказывать физиологическое действие белка в физиологических условиях. Например, линкер, имеющий последовательность аминокислот Gly-Ser, может подходящим образом применяться в качестве линкерной последовательности.

В случае, когда анти-hTfR антителом является гуманизованное антитело или человеческое антитело, анти-hTfR антитело и целевой белок может быть связан вместе через связывание анти-hTfR антитела на N-конце (или C-конце) тяжелой цепи или легкой цепи, через линкерную последовательность или непосредственно, с C-концом (или N-концом), соответственно, целевого белка, пептидными связями. При связывании целевого белка с тяжелой цепью анти-hTfR антитела на его N-концевой стороне (или на C-концевой стороне), C-конец (или N-конец), соответственно, целевого белка связан с N-концом (или C-концом)  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\sigma$  или  $\epsilon$  цепи анти-hTfR антитела, через линкерную последовательность или прямо, пептидными связями. При связывании целевого белка с легкой цепью анти-hTfR антитела на его N-концевой стороне (или C-концевой стороне), C-конец (или N-конец), соответственно, целевого белка связан с N-концом (или C-концом)  $\lambda$  цепи и к цепи анти-hTfR антитела, через линкерную последовательность или прямо, пептидными связями. Однако в случае, когда анти-hTfR антитело состоит из Fab области или Fab области и целой или части шарнирной области (Fab, F(ab')<sub>2</sub> и F(ab')), целевой белок может быть связан на его C-конце (или N-конце) и через линкерную последовательность или прямо, с N-концом (или C-концом), соответственно, тяжелой цепи или легкой цепи, которая составляет Fab, F(ab')<sub>2</sub> и F(ab'), пептидными связями.

В слитом белке анти-hTfR антитела и целевого белка, где анти-hTfR антителом является одноцепочечное антитело, последовательность аминокислот, включая целую или часть переменной области иммуноглобулиновой легкой цепи и последовательность аминокислот, включающую всю или часть переменной области иммуноглобулиновой тяжелой цепи связаны, в основном через линкерную последовательность. Поскольку сродство анти-hTfR антитела с hTfR сохраняется, последовательность аминокислот, полученная из легкой цепи, может быть связана, на ее C-концевой стороне, с линкерной последовательностью которая, в свою очередь, связана, на ее C-концевой стороне, с последовательностью аминокислот, полученной из тяжелой цепи или, наоборот, последовательность аминокислот, полученная из тяжелой цепи, может быть связана, на ее C-концевой стороне, с линкерной последовательностью которая, в свою очередь, связана, на ее C-концевой стороне, с последовательностью аминокислот, полученной из легкой цепи. То же самое может быть установлено, когда одноцепочечным антителом является scFv.

В одноцепочечном антителе, линкерная последовательность, расположенная между легкой цепью и

тяжелой цепью иммуноглобулина, предпочтительно составляет пептидную цепь, состоящую из, предпочтительно, 2-50, более предпочтительно, 8-50, еще более предпочтительно, 10-30, даже более предпочтительно, 12-18 или 15-25, например 15 или 25 аминокислотных остатков. Такая линкерная последовательность предпочтительно состоит, но не ограничена ей, из такой, которая состоит только из глицина или из глицина и серина, например, последовательности аминокислот Gly-Ser, последовательности аминокислот Gly-Gly-Ser, последовательности аминокислот Gly-Gly-Gly, последовательности аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), последовательности аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4) или последовательности, в которой эти последовательности аминокислот повторяются от 2 до 10 или от 2 до 5 раз, пока анти-hTfR антитело, к которому привязаны обе цепи, сохраняет сродство к hTfR, и целевой белок, связанный с антителом, оказывает свое физиологическое действие в физиологических условиях. В качестве предпочтительного варианта линкерной последовательности представлена последовательность, состоящая из 15 аминокислот, в которой последовательность аминокислот Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3) повторяется три раза.

Если анти-hTfR антителом является одноцепочечное антитело, такой слитый белок может быть получен, например, трансформацией клеток хозяина, таких как клетки млекопитающего, вектором экспрессии, имеющим встроенный фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, и последующим культивированием клеток хозяина.

Кроме того, в данном изобретении, если пептидная цепь включает множество линкерных последовательностей, каждая из этих линкерных последовательностей обозначена, с N-концевой стороны, как первая линкерная последовательность, вторая линкерная последовательность и так далее, для удобства.

Целевой белок для конденсации с анти-hTfR антителом особенно не ограничен, поскольку белок должен функционировать в мышце. Предпочтительные целевые белки включают, например, лизосомный фермент, кодируемый геном, отвечающим за лизосомные заболевания, которые вызывают мышечную дисфункцию. Такой лизосомный фермент включает человеческую кислотную  $\alpha$ -глюкозидазу (hGAA) и человеческую  $\alpha$ -галактозидазу А, но не ограничен ими, также включает  $\alpha$ -L-идуронидазу (IDUA), идуронат-2-сульфатазу (IDS), глюкоцереброзидазу (GBA),  $\beta$ -галактозидазу, GM2 активирующий белок,  $\beta$ -гексозаминазу А,  $\beta$ -гексозаминазу В, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу,  $\alpha$ -маннозидазу (LAMAN),  $\beta$ -маннозидазу, галактозилцерамидазу (GALC), сапосин С, арилсульфатазу А (ARSA),  $\alpha$ -L-фукозидазу (FUCA1), аспартилглюкозаминидазу,  $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминидазу, кислотную сфингомиелиназу (ASM),  $\beta$ -глюкуронидазу (GUSB), гепаран N-сульфатазу (SGSH),  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидазу (NAGLU), ацетил-СоА:  $\alpha$ -глюкозаминид N-ацетилтрансферазу, N-ацетилглюкозамин-6-сульфатсульфатазу, кислотную церамидазу (AC), амило-1,6-глюкозидазу, сиалидазу, аспартилглюкозаминидазу, пальмитоилпротеинтиозстеразу-1 (PPT-1), трипептидилпептидазу-1 (TPP-1), гиалуронидазу-1, CLN1, CLN2, и подобные.

Здесь слитый белок анти-hTfR антитела и лизосомного фермента будет описан более подробно, принимая кислотную  $\alpha$ -глюкозидазу и  $\alpha$ -галактозидазу А в качестве примеров.

При введении пациенту с болезнью Помпе, слитый белок анти-hTfR антитела и человеческой кислотной  $\alpha$ -глюкозидазы (hGAA) вводят в мышечные клетки пациента и транспортируют в лизосомы. Таким образом, он разлагает гликоген, аккумулированный в лизосомах мышечных клеток пациента с болезнью Помпе. В случае болезни Помпе, целью являются мышцы, состоящие в основном из клеток скелетной мышцы, и мышцы, состоящие в основном из клеток сердечной мышцы. При болезни Помпе, функциональное ухудшение сердечной и скелетной мышц является основным симптомом, но при введении этого слитого белка, гликоген, аккумулированный в клетках скелетной мышцы и клетках сердечной мышцы, разлагается, что приводит к улучшению симптомов, таких как принудительное расширение, мышечная слабость на основе инвазии скелетной мышцы, и слабость напряжения мышц. Таким образом, слитый белок анти-hTfR антитела и человеческой кислотной  $\alpha$ -глюкозидазы может применяться в качестве терапевтического агента для дисфункции скелетных мышц и/или сердечных расстройств при болезни Помпе.

Подходящие примеры слитых белков анти-hTfR антитела и человеческой кислотной  $\alpha$ -глюкозидазы включают слитый белок человеческой кислотной  $\alpha$ -глюкозидазы и анти-hTfR антитела, где легкая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и где тяжелая цепь гуманизованного анти-hTfR антитела связана с человеческой кислотной  $\alpha$ -глюкозидазой на ее C-концевой стороне через линкерную последовательность Gly-Ser, и полностью имеет аминокислоты, описанные как SEQ ID NO: 27.

Другим примером является слитый белок человеческой кислотной  $\alpha$ -глюкозидазы и анти-hTfR антитела, где слитый белок содержит легкую цепь анти-hTfR антитела, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь анти-hTfR антитела, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 25, и связан на своей C-концевой стороне с человеческой кислотной  $\alpha$ -глюкозидазой, описанной как SEQ ID NO: 1, через линкерную последовательность (Gly Ser).

При введении пациенту с болезнью Фабри, слитый белок анти-hTfR антитела и человеческой  $\alpha$ -галактозидазы А ( $\alpha$ -GalA) вводят в мышечные клетки пациента и транспортируют в лизосомы. Таким

образом, он разлагает тригексозилцерамид, аккумулированный в лизосомах мышечных клеток пациента с болезнью Фабри. В случае болезни Фабри, целью являются мышцы, состоящие в основном из клеток сердечной мышцы. При болезни Фабри обнаружены сердечно-сосудистые аномалии, но при введении этого слитого белка тригексозилцерамид, аккумулированный в клетках сердечной мышцы, разлагается, что может улучшить различные симптомы сердечно-сосудистых аномалий, таких как расширение желудочков. Этот слитый белок особенно эффективен при сердечной болезни Фабри, атипическом типе болезни Фабри, при котором преимущественно поражается сердце. Таким образом, слитый белок анти-hTfR антитела и человеческой  $\alpha$ -галактозидазы А может применяться в качестве терапевтического агента для сердечных расстройств при болезни Фабри, в частности, сердечной болезни Фабри.

Подходящие примеры слитых белков анти-hTfR антитела и человеческой  $\alpha$ -галактозидазы А включают слитый белок человеческой  $\alpha$ -галактозидазы А и анти-hTfR антитела, где легкая цепь гуманизированного анти-hTfR антитела имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и где тяжелая цепь гуманизированного анти-hTfR антитела связана с человеческой  $\alpha$ -галактозидазой А на ее С-концевой стороне через линкерную последовательность Gly-Ser, и полностью имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 29.

Другим примером является слитый белок человеческой кислой  $\alpha$ -глюкозидазы и анти-hTfR антитела, где слитый белок содержит легкую цепь анти-hTfR антитела, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь анти-hTfR антитела, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 25, и связан на ее С-концевой стороне с человеческой  $\alpha$ -галактозидазой А, описанной как SEQ ID NO: 2, через линкерную последовательность (Gly Ser).

Конъюгат анти-hTfR антитела и фармацевтического агента может применяться в виде фармацевтической композиции, вводимой в кровь для оказания терапевтического действия в мышце. Такое лекарственное средство в общем вводят пациенту внутривенной инъекцией, такой как внутривенная капельная инъекция, подкожной инъекцией, внутримышечной инъекцией или подобными, но способ введения особенно не ограничен.

Конъюгат анти-hTfR антитела и агента в соответствии с данным изобретением может быть предоставлен в медицинское учреждение в виде фармацевтической композиции в форме лиофилизированного продукта, водного раствора или подобного. В случае водного раствора, фармацевтическая композиция может быть предоставлена в виде состава, герметично закрытого во флаконе или шприце, предварительно растворенного в растворе, содержащем стабилизатор, буфер, изотонический агент. Состав, герметично закрытый в шприце, обычно называют составом с предварительно наполненным шприце. Состав в предварительно наполненном шприце может упростить введение лекарственного средства самим пациентом.

Если представлен водный препарат, концентрация конъюгата в водном препарате составляет, например, 1-4 мг/мл, хотя он может быть скорректирован при желании в соответствии с дозой. Если нет конкретных ограничений по стабилизаторам, содержащимся в водном препарате, пока они являются фармацевтически доступными, предпочтительно могут применяться неионные поверхностно-активные вещества. Примеры таких неионных поверхностно-активных веществ включают полисорбат и поллоксамер, любой из которых может применяться отдельно или в сочетании. Из полисорбатов предпочтительно применяют полисорбат 20 и полисорбат 80. В качестве поллоксамера особенно предпочтительным является поллоксамер 188 (полиоксиэтилен (160) полиоксипропилен (30) гликоль). Кроме того, концентрация неионного поверхностно-активного вещества, содержащегося в водном препарате, предпочтительно составляет 0,01-1 мг/мл, более предпочтительно, 0,01-0,5 мг/мл, и еще более предпочтительно, 0,1-0,5 мг/мл. В качестве стабилизаторов также могут применяться аминокислоты, такие как гистидин, аргинин, метионин и глицин. При применении в качестве стабилизатора, концентрация аминокислоты в водном препарате предпочтительно составляет 0,1-40 мг/мл, более предпочтительно, 0,2-5 мг/мл, и еще более предпочтительно, 0,5-4 мг/мл. Хотя не конкретных ограничений по буферу, содержащемуся в водном препарате, пока он является фармацевтически доступным, предпочтительным является фосфатный буфер, и более предпочтительным является буфер на основе фосфата натрия. При применении в качестве буфера, концентрация фосфата натрия предпочтительно составляет, 0,01-0,04 М. рН водного препарата, скорректированный буфером, предпочтительно составляет, 5,5-7,2. Хотя не конкретных ограничений по изотонирующему агенту, содержащемуся в водном препарате, пока он является фармацевтически доступным, предпочтительно применяют хлорид натрия или маннит, отдельно или в сочетании в качестве изотонического агента.

### Примеры

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

Пример 1. Конструирование вектора экспрессии hTfR.

Применяя кДНК человеческой селезенки Quick Clone (Clontech Inc.) в качестве шаблона и применяя праймер hTfR5' (SEQ ID NO: 7) и праймер hTfR3' (SEQ ID NO: 8), проводят ПЦР для усиления фрагмента гена, кодирующего человеческий трансферриновый рецептор (hTfR). Усиленный фрагмент, кодирующий hTfR, расщепляют MluI и NotI, и затем вставляют между сайтами MluI и NotI вектора pCI-neo (Promega Inc.). Полученный таким образом вектор обозначают как pCI-neo(hTfR). Затем этот вектор расщепляют с MluI и NotI для того, чтобы отрезать фрагмент гена, кодирующий hTfR, и этот фрагмент вставляют между сайтами MluI и NotI pE-mIRES-GS-puro, вектора экспрессии, описанного в международной публикации WO 2012/063799 для конструирования hTfR вектора экспрессии, pE-mIRES-GS-puro(hTfR).

Пример 2. Получение рекомбинантного hTfR.

В клетки CHO-K1 вводят pE-mIRES-GS-puro(hTfR) электропорацией, и клетки затем подвергают селективному культивированию в среде CD OptiCHO™ (Invitrogen Inc.), содержащей сульфоксимиин метионина (MSX) и пирамицина для получения клеток, экспрессирующих рекомбинантный hTfR. Культивируют клетки, экспрессирующие рекомбинантный hTfR, и получают рекомбинантный hTfR.

Пример 3. Иммунизация мыши рекомбинантным hTfR.

Мышей иммунизируют рекомбинантным hTfR, полученным в примере 2, в качестве антигена. Иммунизацию проводят внутривенной или внутрибрюшинной инъекцией антигена мыши.

Пример 4. Получение гибридом.

Примерно через одну неделю после последней инъекции селезенки мышей усекают и гомогенизируют для выделения клеток селезенки. Полученные таким образом клетки селезенки конденсируют с клетками колонии клеток мышинной миеломы (P3.X63.Ag8.653) пропиленгликолемым способом. После слияния клеток, клетки суспендируют в среде RPMI 1640, содержащей добавку (1X) NAT (Life Technologies Inc.) и фетальную телячью сыворотку 10% Ultra low IgG (Life Technologies Inc.), и суспензию клеток распределяют в 20 лунок 96-луночных планшетов, 200 мкл/лунку. После культивирования клеток в течение 10 дней в инкубаторе с газообразной двуокисью углерода (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), каждую лунку исследуют под микроскопом, и выбирают лунки, которые содержат одну колонию. Когда клетки в каждой лунке почти достигают конfluence, надосадочную жидкость клеточной культуры собирают как надосадочную жидкость клеточной культуры гибридомы, и подвергают следующему процессу скрининга.

Пример 5. Скрининг колоний клеток, вырабатывающих высокоаффинные антитела.

Раствор рекомбинантного hTfR (Sino Biologies Inc.) разводят 50 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 9,5-9,6) до 5 мкг/мл с получением твердофазного раствора. После добавления 50 мкл твердофазного раствора в каждую лунку плоскодонного 96-луночного планшета Nunc MaxiSorp™ (субстрат: полистирол производства Nunc Inc.), планшет выдерживают в течение одного часа при комнатной температуре для того, чтобы рекомбинантный hTfR прилип к планшету и стал неподвижным. Твердофазный раствор удаляют, каждую лунку промывают три раза 250 мкл промывочного раствора (ФРФБ, содержащий ФРФБ-Т: 0,05% Tween20), затем в каждую лунку добавляют 200 мкл блокирующего раствора (ФРФБ, содержащий 1% АБС), и планшет выдерживают в течение одного часа при комнатной температуре.

Блокирующий раствор удаляют, и каждую лунку промывают три раза 250 мкл ФРФБ-Т. В каждую лунку добавляют 50 мкл надосадочной жидкости культуры клеток гибридомы, и планшет выдерживают в течение одного часа при комнатной температуре для того, чтобы позволить мышинным анти-hTfR антителам, содержащимся в надосадочной жидкости клеточной культуры, связаться с рекомбинантным hTfR. В то же время в некоторые лунки добавляют 50 мкл надосадочной жидкости клеточной культуры, которая не вырабатывает мышинные анти-hTfR антитела, в качестве контроля. Кроме того, 50 мкл среды для культивирования гибридомы добавляют в лунки, в качестве пробных лунок, кроме тех лунок, в которые добавлена надосадочная жидкость клеточной культуры. Измерение проводят методом n=2. Затем раствор удаляют, и каждую лунку промывают три раза 250 мкл ФРФБ-Т.

В каждую из указанных выше лунок добавляют 100 мкл раствора HRP-меченых анти-мышинных иммуноглобулиновых антител (Promega Inc.), и планшет выдерживают в течение одной минуты при комнатной температуре. Затем раствор удаляют и каждую лунку промывают три раза 250 мкл ФРФБ-Т. В каждую лунку добавляют 50 мкл раствора хромогенного субстрата, ТМВ стабилизированного субстрата для пероксидазы хрена (Promega Inc.), и лунки выдерживают в течение 10-20 мин при комнатной температуре. Затем после добавления 100 мкл останавливающего раствора (2N серной кислоты), абсорбцию в каждой лунке измеряют на планшетном ридере при 450 нм. Из двух лунок для каждой из надосадочной жидкости клеточной культуры и контроля, получают средние значения, соответственно, и из каждого из средних значений вычитают соответствующее среднее значение для двух пробных лунок, размещенных соответственно к каждой лунке с надосадочной жидкостью клеточной культуры и контролем, с получением значения.

Четырнадцать типов клеток гибридомы, соответствующих надосадочным жидкостям клеточных

культур, добавленным в лунки, которые демонстрируют наивысшие значения, выбирают в качестве колоний клеток (колоний клеток, вырабатывающих высокоаффинные антитела), которые вырабатывают антитела, демонстрирующие высокое сродство к hTfR (высокоаффинные анти-hTfR антитела). Эти четырнадцать типов колоний клеток обозначают как Колония клона 1 - Колония клона 14. Анти-hTfR антитела, выработанные клональными колониями клеток 1-14, обозначают как анти-hTfR антитело № 1 - анти-hTfR антитело № 14 соответственно.

Пример 6. Анализ последовательности аминокислот вариабельной области высокоаффинных анти-hTfR антител.

Дополнительную колонию клона 3 выбирают из колонии клона 1 - колонии клона 14, выбранных в примере 5. кДНК колонии клона 3 получают, и ген, кодирующий легкую цепь и тяжелую цепь антитела усиливают с применением этой кДНК в качестве шаблона. Последовательность нуклеиновых кислот усиленного гена транскрибируют для определения последовательности аминокислот переменной области легкой цепи и тяжелой цепи анти-hTfR антитела № 3, выработанного этой колонией клона.

Было обнаружено, что анти-hTfR антитело № 3 включает последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 9, в качестве легкой цепи переменной области, и последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 10, в качестве тяжелой цепи переменной области. Было обнаружено, что легкая цепь переменной области включает последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 11 или 12 в качестве ОКО1; SEQ ID NO: 13 или 14 в качестве ОКО2, и SEQ ID NO: 15 в качестве ОКО3; и тяжелая цепь переменной области включает последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 16 или 17 в качестве ОКО1, SEQ ID NO: 18 или 19 в качестве ОКО2, и SEQ ID NO: 20 или 21 в качестве ОКО3. Однако также считается, что ОКО не ограничены теми, которые составляют эти последовательности аминокислот, но они также могут быть областями либо последовательностей аминокислот, которые включают любую из указанных выше последовательностей, либо последовательностей аминокислот, состоящих из не менее трех последовательных аминокислот, составляющих часть указанных выше последовательностей.

Пример 7. Измерение сродства анти-hTfR антитела с человеческим и обезьяньим TfR.

Сродство анти-hTfR антитела к человеческому и обезьяньему TfR измеряют на Octet RED96 (ForteBio Inc., подразделение Pall Corporation), системе для анализа взаимодействий между биомолекулами с применением биослойной интерферометрии (БСИ). Основные принципы биослойной интерферометрии кратко описаны ниже. Когда слой биомолекул, иммобилизованных на поверхности наконечника датчика, облучают светом с определенной длиной волны, свет отражается от двух из поверхностей, поверхности биомолекулы и поверхности внутреннего референсного слоя, с образованием интерферирующих световых волн. Молекула в измеряемом образце связывается с биомолекулой на поверхности конца датчика и тем самым увеличивает толщину слоев на конце датчика, что дает сдвиг между интерферирующими слоями. Измерение изменений этого сдвига между интерферирующими волнами, определение количества молекул, связанных со слоем биомолекул, иммобилизованных на поверхности конца датчика, и их кинетический анализ проводят в режиме реального времени. Измерение обычно проводят согласно руководству пользователя, прилагаемого к Octet RED96. В качестве человеческого TfR применяют рекомбинантный человеческий TfR (р. человеческий TfR: Sino Biological Inc.), который имеет последовательность аминокислот внеклеточной области hTfR, т.е. от цистеинового остатка в положении 89 от N-концевой стороны до фенилаланина на C-конце последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 1, с гистидиновым тагом, присоединенным к N-концу. В качестве обезьяньего TfR применяют рекомбинантный обезьяньий TfR (р. обезьяньий TfR: Sino Biological Inc.), который имеет последовательность аминокислот внеклеточной области TfR *Macaca fascicularis*, т.е. от цистеинового остатка в положении 89 от N-концевой стороны до фенилаланина на C-конце последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 2, с гистидиновым тагом, присоединенным к N-концу.

Колонию клона 3, выбранную в примере 6, разводят средой RPMI 1640, содержащей добавку (1X) NAT Supplement (Life Technologies Inc.) и 10% фетальную телячью сыворотку Ultra low IgG (Life Technologies Inc.) так, чтобы скорректировать плотность клеток до приблизительно  $2 \times 10^5$  клеток/мл. В 1 л коническую колбу добавляют 200 мл каждой суспензии клеток, и культивирование проводят в течение 6-7 дней во влажной среде при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздухе при перемешивании со скоростью около 70 об/мин. Надосадочную жидкость культуры клеток центрифугируют и затем фильтруют через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) для сбора надосадочной жидкости культуры клеток. Собранную надосадочную жидкость культуры клеток загружают в колонку Protein G (объем колонки: 1 мл, GE Healthcare Inc.), которая уравновешена заранее тремя объемами колонки 20 мМ буфером Tris (pH 8,0), содержащим 150 мМ NaCl. После промывания колонки 5 объемами колонки тем же буфером, адсорбированные антитела элюируют 4 объемами колонки 50 мМ глициновым буфером (pH 2,8), содержащим 150 мМ NaCl, и элюированные фракции собирают. Элюированные фракции доводят до pH 7,0 добавлением 1 М буфера Tris (pH 8,0). Их применяют в качестве очищенных продуктов анти-hTfR антител № 3 в описанных ниже экспериментах.

Очищенные анти-hTfR антитела № 3 разводят в две стадии HBS-P+ (10 мМ HEPES, содержащим 150 мМ NaCl, 50 мкМ ЭДТК и 0,05% Surfactant P20), соответственно, с получением растворов антител с 7

разными концентрациями, 0,78125-50 нМ (0,117-7,5 мкг/мл). Эти растворы антител применяют в качестве растворов образцов. Р. человеческий и р. обезьяний TfR, соответственно, разводят HBS-P+ с получением 25 мкг/мл растворов, которые применяют в качестве раствора р. человеческого TfR-ECD (Histag) и раствора р. обезьяньего TfR-ECD (Histag) соответственно.

Каждый из растворов образцов, полученных выше 2-кратным разведением, добавляют 200 мкл/лунку, в 96-луночный планшет, черный (Greiner Bio-One Inc.). Каждый из растворов р. человеческого TfR-ECD (Histag) и р. обезьяньего TfR-ECD (Histag), полученных выше, добавляют, 200 мкл/лунку, в определенные лунки. В соответствующие лунки исходного уровня, диссоциации и промывания добавляют HBS-P+, 200 мкл/лунку. В лунки для регенерации добавляют 10 mM Glycine-HCl (pH 1,7), 200 мкл/лунку. В лунки для активации добавляют 0,5 mM раствор NiCl<sub>2</sub>, 200 мкл/лунку. Планшет и биодатчик (Biosensor/Ni-NTA: ForteBio Inc., подразделение Pall Corporation) устанавливают в предписанные положения Octet RED96.

Octet RED96 запускают в условиях, показанных в табл. 1 ниже, для сбора данных, на основании которых затем, с применением анализирующей программы, прилагаемой к Octet RED96, и подгонкой кривой реакции связывания с 1:1 моделью связывания или 2:1 моделью связывания, измеряют константу скорости ассоциации ( $k_{on}$ ) константу скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) анти-hTfR антитела к р. человеческому TfR и р. обезьяньему TfR, и рассчитывают константу диссоциации ( $K_D$ ). Измерение проводят при 25-30°C.

Таблица 1  
Рабочие условия OctetRED96

	Стадия	Время контакта датчика (сек)	Скорость (об./мин.)	Порог
1	Базовая линия 1	60	1000	-
2	Загрузка	600	1000	1,5-2,0
3	Базовая линия 2	60	1000	-
4	Ассоциация	180	1000	-
5	Диссоциация	540	1000	-
6	Регенерация	5	1000	-
7	Промывание	5	1000	-
Стадии 6-7 выше повторяют от 6 до 7 раз				
8	Активация	60	1000	-
Стадии 1-8 повторяют до измерения всех образцов				

Константа диссоциации ( $K_D$ ) с человеческим TfR анти-hTfR № 3 составляет не более  $1 \times 10^{-12}$  М, и константа диссоциации ( $K_D$ ) с обезьяньим TfR составляет не более  $1 \times 10^{-12}$  М. Эти результаты показывают, что анти-hTfR антитело № 3 является антителом с высоким сродством не только к человеческому TfR, но также к обезьяньему TfR.

Пример 8. Получение гуманизованных анти-hTfR антител.

Гуманизацию пробуют на последовательности аминокислот, включенной в легкую цепь и тяжелую цепь переменных областей анти-hTfR антитела № 3. Таким образом, получают переменную область гуманизованной легкой цепи, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 22, и переменную область гуманизованной тяжелой цепи, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 23. Кроме того получают легкую цепь, где легкая цепь имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 24, и имеет последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 22, в переменной области. Что касается тяжелой цепи, получают тяжелую цепь, имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 25, и имеющую последовательность аминокислот, описанную как SEQ ID NO: 23, в переменной области. Тяжелая цепь последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 25, имеет тип IgG4. Полученную таким образом константу диссоциации ( $K_D$ ) гуманизованного анти-hTfR антитела с человеческим TfR измеряют способом, описанным в примере 7. Результаты показывают, что константа диссоциации ( $K_D$ ) гуманизованного анти-hTfR антитела с человеческим TfR составляет не более  $1 \times 10^{-12}$  М, и константа диссоциации ( $K_D$ ) с обезьяньим TfR составляет около  $1 \times 10^{-12}$  М. Эти результаты показывают, что полученное гуманизованное антитело анти-hTfR антитела № 3 имеет высокое сродство не только с человеческим TfR, но также с обезьяньим TfR.

Пример 9. Конструирование гена, кодирующего слитый белок анти-TfR антитела и hGAA.

Синтезируют фрагмент ДНК, кодирующий легкую цепь последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 24 (SEQ ID NO: 26). Фрагмент имеет, на 5' стороне, в порядке от 5' конца, последовательность MluI и последовательно, кодирующую сигнальный пептид, который действует как секреторный сигнал, и последовательность NotI на 3' стороне.

Кроме того, фрагмент ДНК (SEQ ID NO: 28), кодирующий белок последовательности аминокислот,

описанной как SEQ ID NO: 27, в целом синтезированной в этом белке человеческой кислой  $\alpha$ -глюкозидазы последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 1, связывают на С-концевой стороне тяжелой цепи последовательности аминокислот, описанной как SEQ ID NO: 25, через линкерную последовательность, состоящую из Gly-Ser. Фрагмент ДНК имеет, на 5' стороне, в порядке от 5' конца, последовательность MluI и последовательность, кодирующую сигнальный пептид, который действует как секреторный сигнал, и последовательность NotI на 3' стороне.

Пример 10. Конструирование вектора экспрессии для слитого белка анти-TfR антитела и hGAA.

pEF/mys/nuc вектор (Invitrogen Inc.) расщепляют с KpnI и NcoI, область, содержащую EF-1 $\alpha$  промотор и его первый интрон вырезают и "затупляют" концы с T4 ДНК полимеразой. pCI-neo вектор (Invitrogen Inc.) расщепляют с BglII и EcoRI для вырезания области, содержащей CMV энхансер/промотор и интрон, затем "затупляют" концы с T4 DNA полимеразой. Туда вставляют область, содержащую EF-1 $\alpha$  промотор и его первый интрон, описанный выше, для конструирования pE-neo вектора. pE-neo вектор расщепляют с SfiI и BstXI, и вырезают приблизительно 1 т.п.н. области, содержащей ген устойчивости к неомицину. Применяя pсDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen Inc.) в качестве шаблона, ген резистентности к гигромицину усиливают ПЦР реакцией с применением праймера Hyg-Sfi5' (SEQ. NO. 30) и праймера Hyg-BstX3' (SEQ. NO. 31). Усиленный ген резистентности к гигромицину расщепляют с SfiI и BstXI, и ген резистентности к неомицину вставляют в вырезанный pE-neo вектор для конструирования pE-hygr вектора.

pE-hygr вектор и pE-neo вектор расщепляют с MluI и NotI соответственно. ДНК фрагмент, кодирующий легкую цепь анти-hTfR антитела, синтезированного в примере 9 (SEQ ID NO: 26), и ДНК фрагмент, кодирующий белок, в котором связаны тяжелая цепь анти-hTfR антитела и человеческая кислая  $\alpha$ -глюкозидаза (SEQ ID NO: 28), расщепляют с MluI и NotI и вставляют между MluI-NotI pE-hygr вектора и pE-neo вектора соответственно. Полученные векторы применяют в качестве pE-hygr (LC), вектора для экспрессии легкой цепи гуманизированного анти-hTfR антитела, и pE-neo(НС-hGAA, вектора для экспрессии белка, в котором связаны тяжелая цепь анти-hTfR антитела и человеческая кислая  $\alpha$ -глюкозидаза соответственно.

Пример 11. Получение клеток для экспрессирования слитого белка hGAA-гуманизированного анти-hTfR антитела.

Клетки CHO (CHO-K1: полученные из American Type Culture Collection) трансформируют с pE-hygr (LC) и pE-neo(НС-hGAA), сконструированными в примере 10, с применением GenePulser(Bio-Rad, Inc.) согласно описанному ниже способу. Трансформацию клетки обычно проводят следующим образом.  $5 \times 10^6$  клеток CHO-K1 засевают в 3,5 см чашку для культивирования и добавляют среду CD OptiCHO™ (Life Technologies Inc.), и выращивают в течение ночи в условиях 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Среду меняют на среду Opti-MEM™ I (Life Technologies Inc.) и клетки суспендируют с плотностью  $5 \times 10^6$  клеток/мл. Собирают 100 мкл клеточной суспензии и 5 мкл каждого из раствора pE-hygr(LC1) плазмидной ДНК и раствора pE-neo(НС1) плазмидной ДНК, оба которых разведены до 100 мкг/мл в среде Opti-MEM medium™ I, добавляют в суспензию клеток. Проводят электропорацию с применением GenePulser (Bio-Rad Inc.), и плазмиды вводят в клетки. Затем клетки культивируют в течение ночи в условиях 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, и подвергают селективному культивированию в среде CD OptiCHO™ с добавлением 0,5 мг/мл гигромицина и 0,8 мг/мл G418.

Затем клетки, выбранные выше селективным культивированием, засевают в 96-луночные планшеты так, что не более одной клетки засевают в лунку при предельном разведении. Затем клетки культивируют в течение около 10 дней так, что образуются моноклональные колонии. Собирают соответствующие надосадочные жидкости клеточных культур из лунок, в которых образовались моноклональные колонии, количество гуманизированных антител, содержащихся в надосадочных жидкостях клеточных культур определяют ELISA, и выбирают колонии клеток с высокой экспрессией hGAA-гуманизированного анти-hTfR антитела-слитого белка.

Указанный выше ELISA проводят обычно следующим образом. В каждую лунку 96-луночного титровального микропланшета (Nunc Inc.) добавляют 100 мкл раствора козьего анти-человеческого IgG поликлонального антитела, разведенного 0,05 М натрий-бикарбонатный буфер (pH 9,6) до 4 мкг/мл, и планшет выдерживают в течение, по крайней мере, одного часа при комнатной температуре так, чтобы антитела могли быть адсорбированы планшетами. Затем, после тройного промывания лунки ФРФБ-Т, 200 мкл блокирующего буфера Starting Block (ФРФБ) (Thermo Fisher Scientific Inc.) добавляют в каждую лунку, и планшеты выдерживают в течение 30 минут при комнатной температуре. После тройного промывания каждой лунки ФРФБ-Т, надосадочную жидкость клеточной культуры или стандартный продукт человеческого IgG, который разведен ФРФБ-ВТ (ФРФБ с добавлением 0,5% АБС и 0,05% Tween20) до подходящих концентраций, добавляют в каждую лунку в количестве 100 мкл, и планшеты выдерживают в течение, по крайней мере, одного часа при комнатной температуре. После тройного промывания планшетов ФРФБ-Т, 100 мкл раствора HRP-меченого анти-человеческого IgG поликлонального антитела, который разведен ФРФБ-ВТ, добавляют в каждую лунку, и планшеты выдерживают в течение, по крайней мере, одного часа при комнатной температуре. После тройного промывания лунок ФРФБ-Т, 0,4

мг/мл о-фенилендиамин в цитрате-фосфатного буфера (pH 5,0) добавляют в каждую лунку в количестве 100 мкл, и лунки выдерживают в течение 8-20 минут при комнатной температуре. Затем 1 моль/л серной кислоты добавляют в каждую лунку в количестве 100 мкл для окончания реакции, и абсорбцию для каждой лунки измеряют при 490 нм с применением ридера 96-луночного планшета. Клетки, соответствующие лункам, которые демонстрируют наивысшие значения, считаются колониями клеток с высокой экспрессией hGAA-гуманизированного анти-hTfR антитела-слитого белка. hGAA-гуманизированное анти-hTfR антитело-слитый белок, вырабатываемый этой колонией клеток, обозначают как hGAA-анти-hTfR антитело.

Пример 12. Получение hGAA-Анти-hTfR антитела.

hGAA-анти-hTfR антитело получают следующим образом. Колонию клеток с высокой экспрессией hGAA-анти-hTfR антитела, полученную в примере 11, разводят в среде CD OptiCHO™ до концентрации клеток около  $2 \times 10^6$  клеток/мл, 200 мл клеточной суспензии добавляют в 1 л колбу Эрлейнмейера и инкубируют при 37°C во влажной среде, состоящей из 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха со скоростью перемешивания около 70 об/мин в течение 6-7 дней. Надосадочную жидкость клеточной культуры собирают центрифугированием и фильтруют через 0,22 мкм фильтр (Millipore Inc.) с получением надосадочной жидкости клеточной культуры. К собранной надосадочной жидкости клеточной культуры добавляют 5 объемов колонки 20 мМ буфера Tris (pH 8,0) содержащего 150 мМ NaCl и загружают в колонку Protein A (объем колонки: 1 мл, Bio-Rad Inc.), которую заранее уравнивают 3 объемами колонки 20 мМ буфера Tris (pH 8,0), содержащего 150 мМ NaCl. Затем колонку промывают 5 объемами колонки того же буфера, и адсорбированные hGAA-анти-hTfR антитела элюируют 4 объемами колонки 50 мМ глицинового буфера (pH 2,8), содержащего 150 мМ NaCl. pH этого элюата, содержащего hGAA-анти-hTfR антитело, доводят до pH 7,0 добавлением 1 М буфера Tris (pH 8,0), и затем буфер меняют на ФРФБ с применением 30 кДа мембраны Amicon Ultra (Millipore Co.). Полученное применяют в качестве очищенного продукта hGAA-анти-hTfR антитела.

Пример 13. Измерение введения hGAA в клетки с применением человеческой скелетной мышцы.

Человеческие скелетные миоциты (PromoCell Inc.) разводят в  $8,0 \times 10^4$  клеток/мл среде для выращивания клеток скелетной мышцы (готовой к применению) (PromoCell Inc.) и засевают в лунки 96-луночного планшета, покрытого Cellnest™ (Fujifilm Inc.) в количестве 250 мкл/лунку. После культивирования при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение 3 дней, среду заменяют на среду для индукции дифференциации скелетных миоцитов, Skeletal Muscle Cell Differentiation Medium (готовую к применению) (PromoCell Inc.). Затем каждые 2 дня среду меняют на среду для индукции дифференциации, и дифференциацию вызывают в течение 6 дней. После удаления среды 100 мкл каждого из серийно разведенных растворов hGAA-анти-hTfR антитела и hGAA (0,005-20,0 мкг/мл), разведенных средой для индукции дифференциации, добавляют в лунку в качестве тестируемого вещества, и клетки далее инкубируют при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение еще 20 часов.

После инкубации среду удаляют, и каждую лунку промывают три раза 300 мкл ФРФБ. 100 мкл M-PER™ (с 0,5% смеси ингибиторов протеаз, Thermo Fisher Scientific Inc.) добавляют в каждую лунку, и планшет встряхивают на планшетном шейкере при комнатной температуре в течение 25 минут с получением клеточного экстракта. 20 мкл экстракта из каждой лунки собирают, и белок, содержащийся в экстракте, определяют с применением набора анализа белка BCA (Pierce Inc.). Кроме того, 80 мкл ФРФБ-ВТ добавляют в лунки после сбора 20 мкл экстракта, и планшет встряхивают в течение 10 минут при комнатной температуре на планшетном шейкере с получением клеточного экстракта, который подвергают анализу ELISA.

Таким же образом получают клеточный экстракт из клеток в лунках, в которые тестируемое вещество не добавляли, и этот экстракт применяют в качестве экстракта пула. hGAA-анти-hTfR антитело и коммерчески доступный hGAA серийно разводят объединенными экстрактами для получения образцов калибровочной кривой. Тестируемое вещество может быть количественно оценено следующим способом ELISA.

Кроличье анти-hGAA поликлональное антитело, полученное иммунизацией кролика hGAA, разводят до 5 мкг/мл 20 ммоль/л натрий-карбонатным буфером (pH 9,0), добавляют в каждую лунку 96-луночного планшета (Maxisorp™) в количестве 100 мкл/лунку, и встряхивают в течение 1 часа при комнатной температуре на планшетном шейкере. Раствор антитела удаляют и 300 мкл блокирующего буфера (ФРФБ с 1% АБС) добавляют в каждую лунку и выдерживают в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем лунки промывают три раза 300 мкл ФРФБ-Т. И 100 мкл каждого из образцов стандартной кривой и клеточного экстракта добавляют в лунку, и планшет встряхивают в течение 1 часа при комнатной температуре на планшетном шейкере. Каждую лунку промывают три раза 300 мкл промывочного раствора, 100 мкл меченого биотином кроличьего анти-hGAA антитела (полученного на месте) в ФРФБ-ВТ добавляют в каждую лунку и планшет встряхивают на планшетном шейкере при комнатной температуре в течение 1 часа. После тройного промывания каждой лунки 300 мкл промывочного раствора, 100 мкл конъюгата NeutrAvidin-HRP (Pierce Inc.), разбавленного 0,5% АБС/ФРФБ (с 0,05% Tween20), добавляют в каждую лунку, планшет встряхивают в течение 15 минут при комнатной температуре на план-

шетном шейкере, и затем каждую лунку промывают три раза 300 мкл промывочного раствора. Смешанный раствор Субстратного раствора ТМВ пероксидазы В из ТМВ Microwell Peroxidase Substrate (2-компонентной системы, KPL Inc.) и Субстрата ТМВ пероксидазы в равных количествах добавляют в каждую лунку в количестве 100 мкл/лунку, и цветная реакция развивается при комнатной температуре. После получения правильного развития цвета, 100 мкл 1 моль/л фосфата добавляют в каждую лунку, и реакцию останавливают. Абсорбцию при 450 нанометрах измеряют микропланшетным ридером, калибровочную кривую получают с применением SoftMax Pro (Molecular Device Inc.), и концентрации каждого тестируемого вещества рассчитывают интерполированием измеренных значений каждого тестируемого вещества на калибровочную кривую. Концентрацию тестируемого вещества в каждом клеточном экстракте делят на концентрацию белка с получением количества тестируемого вещества, поглощенного клеткой (нг/мг белка).

Пример 14. Получение CD71-KI/GAA-KO мыши.

CD71-KI/GAA-KO мышей с выключенным геном кислой  $\alpha$ -глюкозидазы (GAA геном) и нокинированным геном человеческого трансферринового рецептора (CD71 геном), создают обычными методами генной инженерии. Способ получения обычно следующий. Направленный вектор (GAA выключающий вектор), способный выключать мышинный ген GAA, конструируют вставкой стоп-кодона и гена резистентности к неомицину в сайт BamHI, присутствующий в экзоне 6 мышинного гена GAA. Направленный вектор содержит последовательность нуклеиновых кислот, описанную как SEQ ID NO: 32. После линеаризации направленного вектора, вектор вводят в клетки ES клеточной линии C57BL/6 электропорацией. После введения проводят селективное культивирование с применением резистентности к неомициновому лекарственному средству в качестве показателя, и получают резистентные к лекарственному средству ES клоны. Полученные резистентные к лекарственному средству ES клоны подвергают скринингу с применением геномной ПЦР и саузерн-блоттинга, и выбирают клоны, в которых достигается специфическая гомологичная рекомбинация (гомологичная рекомбинация ES клонов). Применяя ES клоны с гомологичной рекомбинацией и эмбрионы линии клеток ICR на стадии 8-клеток получают химерные эмбрионы способом агрегации. Мыши реципиенту имплантируют химерные эмбрионы для рождения химерных мышей.

Химерных мышей естественно спаривают для получения GAA-KO гетеро мышей, и GAA-KO гомо мышей получают через повторное спаривание. CD71-KI гетеро мышей и GAA-KO гомо мышей спаривают, и полученных мышей подвергают скринингу с получением CD71-KI/GAA-KO мышей. CD71-KI гетеро мышей получают согласно способу, описанному в Sonoda H., et al. *Molecular Therapy* 26. 1366-74 (2018).

Пример 15. Измерение введения hGAA в клетки у мышей.

Очищенный продукт hGAA-анти-hTfR антитела, полученный в примере 12, и коммерчески доступный hGAA для медицинского применения готовят в виде 4 мг/мл растворов с применением физиологического раствора. Используя эти растворы, CD71-KI/GAA-KO мышам вводят hGAA-анти-hTfR антитело или hGAA через хвостовые вены соответственно. Оба hGAA-анти-hTfR антитело и hGAA вводят в дозе 20 мг/дозу в общем количестве 4 дозы каждую последующую неделю. Через две недели после последней дозы мышей обескровливают до смерти и сердце, диафрагму, камбаловидную мышцу, переднюю большеберцовую мышцу и квадрицепс собирают. Собранную ткань промывают солевым раствором. Концентрации гликогенов в этих мышечных тканях, массы мышц в мг/г измеряют, как описано в примере 16. Группу, которая получает hGAA-анти-hTfR антитело, обозначают как группу введения hGAA-анти-hTfR антитела, и группу, которая получает коммерчески доступный медицинский hGAA, обозначают как группу введения hGAA. CD71-KI/GAA-KO мышей, которым вводят равный объем солевого раствора, применяют в качестве KO-контрольной группы. Кроме того, мышей дикого типа, которые получают равный объем солевого раствора, используют в качестве контрольной группы дикого типа. Каждая группа состоит из 5 мышей.

Результаты измерения количества гликогена, содержащегося в каждой мышечной ткани, показаны на фиг. 1-5. Фиг. 1, 2, 3, 4 и 5 показывают результат измерения в сердце, диафрагме, камбаловидной мышце, передней большеберцовой мышце и квадрицепсе. Если количество гликогена, содержащееся в каждой ткани у группы введения hGAA принимать за 100%, количество гликогена, содержащееся в каждой ткани в группе введения hGAA-анти-hTfR антитела снижается до приблизительно 7,5% в сердце, 6,5% в диафрагме, 13,5% в камбаловидной мышце, 13,5% в передней большеберцовой мышце и 6% в квадрицепсе. Эти результаты демонстрируют, что hGAA-анти-hTfR антитело может эффективно снижать гликоген, аккумулированный в мышечной ткани, по сравнению с коммерчески доступным медицинским hGAA. Болезнь Помпе (гликогеноз II типа) является болезнью, при которой гликоген аккумулируется в больших количествах в лизосомах в клетках при генетическом отсутствии большинства или всей активности кислой  $\alpha$ -глюкозидазы, и основным симптомом является дисфункция сердечной и скелетной мускулатуры. То есть, hGAA-анти-hTfR антитело является многообещающим в качестве терапевтического агента в ферментозамещающей терапии пациентов с болезнью Помпе, так как оно может эффективно снижать гликогены, аккумулированные в сердечной и скелетной мускулатуре у пациентов с болезнью

Помпе по сравнению с hGAA.

Пример 16. Способ определения количества гликогена, содержащегося в ткани.

Ткани, полученные в примере 15, и 15 штук диаметром 0,5 мм шариков SUS помещают в держатель в шаровую мельницу (BEADS CRUSHER  $\mu$ T-12, Titec Inc.), и дополнительно в держатель добавляют воду для инъекций. Шаровая мельница измельчает ткань. Полученную измельченную ткань центрифугируют при 15000 об/мин. в течение 10 минут при 4°C, и надосадочную жидкость собирают в качестве раствора образца и хранят замороженной до измерения.

Концентрацию гликогена измеряют с применением набора Glycogen Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (Biovision Inc.) в следующих стадиях в целом. Образец калибровочной кривой (Glycogen Standard) постадийно разводят чистой водой, и 50 мкл разведенных растворов добавляют в лунки планшета F96 Black (Nunc Inc.). Также, 50 мкл раствора образца добавляют в каждую лунку. В это время, каждый из разведенных растворов образца калибровочной кривой и растворов образца добавляют в две лунки соответственно. 1 мкл смеси Hydrolysis Enzyme Mix добавляют в две лунки, в которые добавлен образец калибровочной кривой и в одну лунку, в которую добавлен образец, смешивают и подвергают взаимодействию при комнатной температуре в течение 30 минут для разложения гликогена на глюкозу. Затем 50 мкл реакционной смеси, содержащей флуоресцентный реагент, добавляют во все лунки и подвергают взаимодействию в течение 30 минут при комнатной температуре защищенным от света. Интенсивность флуоресценции измеряют (Ex/Em=535/587 нм) с применением флуоресцентного планшетного ридера (SPECTRA max GEMINI XPS, Molecular Devices Inc.), и концентрацию глюкозы в растворе образца, к которому добавлена смесь Hydrolysis Enzyme Mix, и раствора образца, к которому не добавлена смесь Hydrolysis Enzyme Mix, рассчитывают из калибровочной кривой, полученной из кривой линейным приближением из теоретической концентрации (X) и среднего сигнала (Y) образцов калибровочной кривой. Измерение концентрации глюкозы раствора образца, к которому не добавлена смесь Hydrolysis Enzyme Mix, затем вычитают из измерения концентрации глюкозы раствора образца, к которому добавлена смесь Hydrolysis Enzyme Mix, и это значение берут как концентрацию гликогена в растворе образца. Концентрации гликогена (мг/г массы влажной ткани) тканей определяют из массы тканей, применяемых для получения растворов образцов и определенных концентраций гликогена.

#### **Промышленная применимость**

В соответствии с данным изобретением, фармацевтический агент, работающий в мышцах, который недостаточно поглощается мышцами как таковой, может эффективно поглощаться мышцей при превращении его в конъюгат, сопряженный с анти-трансферриновым рецептором антитела. Поэтому он может применяться для разработки нового терапевтического лекарственного средства для мышечных заболеваний.

#### **Свободный список последовательностей**

- SEQ ID NO: 3: последовательность аминокислот примерного линкера 1.
- SEQ ID NO: 4: последовательность аминокислот примерного линкера 2.
- SEQ ID NO: 7: праймер hTfR5', синтетическая последовательность.
- SEQ ID NO: 8: праймер hTfR3', синтетическая последовательность.
- SEQ ID NO: 9: последовательность аминокислот переменной области легкой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3.
- SEQ ID NO: 10: последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3.
- SEQ ID NO: 11: последовательность аминокислот 1 OKO1 в легкой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3.
- SEQ ID NO: 12: последовательность аминокислот 2 OKO1 в легкой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3.
- SEQ ID NO: 13: последовательность аминокислот 1 OKO2 в легкой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3.
- SEQ ID NO: 14: последовательность аминокислот 2 OKO2 в легкой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3.
- SEQ ID NO: 15: последовательность аминокислот OKO3 в легкой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3.
- SEQ ID NO: 16: последовательность аминокислот 1 OKO1 в тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3.
- SEQ ID NO: 17: последовательность аминокислот 2 OKO1 в тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3.
- SEQ ID NO: 18: последовательность аминокислот 1 OKO2 в тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3.
- SEQ ID NO: 19: последовательность аминокислот 2 OKO2 в тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3.
- SEQ ID NO: 20: последовательность аминокислот 1 OKO3 в тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3.

SEQ ID NO: 21: последовательность аминокислот 2 ОКОЗ в тяжелой цепи мышинового анти-hTfR антитела № 3.

SEQ ID NO: 22: последовательность аминокислот переменной области легкой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3.

SEQ ID NO: 23: последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3.

SEQ ID NO: 24: последовательность аминокислот легкой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3.

SEQ ID NO: 25: последовательность аминокислот тяжелой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3.

SEQ ID NO: 26: последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая последовательность аминокислот легкой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 27: последовательность аминокислот слитого белка тяжелой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3 и hGAA.

SEQ ID NO: 28: последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая последовательность аминокислот слитого белка тяжелой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3 и hGAA, синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 29: последовательность аминокислот слитого белка тяжелой цепи гуманизованного анти-hTfR антитела № 3 и ч. альфа-galA.

SEQ ID NO: 30: праймер Hyg-Sfi5', синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 31: праймер Hyg-BstX3', синтетическая последовательность.

SEQ ID NO: 32: последовательность аминокислот GAA выключенного вектора, синтетическая последовательность.

#### Перечень последовательностей

<110> Джей Си Ар ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО., ЛТД.

<120> СПОСОБ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА В МЫШЦУ

<130> 1210P

<150> JP2018-018652

<151> 2018-02-05

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 883

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro  
1 5 10 15

Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu  
20 25 30

Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu  
35 40 45

Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr  
50 55 60

Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr



048186

Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu  
325 330 335

Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe  
340 345 350

Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg  
355 360 365

Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly  
370 375 380

Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr  
385 390 395 400

Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr  
405 410 415

Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp  
420 425 430

Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile  
435 440 445

Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys  
450 455 460

Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly  
465 470 475 480

Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu  
485 490 495

Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile  
500 505 510

Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val  
515 520 525

Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp  
530 535 540

Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro  
545 550 555 560

Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp  
565 570 575

Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp  
 580 585 590

Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu  
 595 600 605

Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln  
 610 615 620

Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu  
 625 630 635 640

Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg  
 645 650 655

Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp  
 660 665 670

His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln  
 675 680 685

Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr  
 690 695 700

Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro  
 705 710 715 720

Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val  
 725 730 735

Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly  
 740 745 750

Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg  
 755 760 765

Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala  
 770 775 780

Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu  
 785 790 795 800

Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile  
 805 810 815

Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu  
 820 825 830

Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu  
835 840 845

Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys  
850 855 860

Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val  
865 870 875 880

Ser Trp Cys

<210> 2  
<211> 398  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp  
1 5 10 15

Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys  
20 25 30

Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu  
35 40 45

Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp  
50 55 60

Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln  
65 70 75 80

Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys  
85 90 95

Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala  
100 105 110

Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe  
115 120 125

Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp  
130 135 140

Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu  
145 150 155 160

048186

Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr  
 165 170 175

Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys  
 180 185 190

Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile  
 195 200 205

Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp  
 210 215 220

Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly  
 225 230 235 240

Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp  
 245 250 255

Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile  
 260 265 270

Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile  
 275 280 285

Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp  
 290 295 300

Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val  
 305 310 315 320

Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile  
 325 330 335

Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe  
 340 345 350

Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp  
 355 360 365

Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu  
 370 375 380

Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu  
 385 390 395

<210> 3

<211> 5  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Аминокислотная последовательность линкера 1, приведенного в качестве примера  
  
 <400> 3  
  
 Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5  
  
 <210> 4  
 <211> 6  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Аминокислотная последовательность линкера 2, приведенного в качестве примера  
  
 <400> 4  
  
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5  
  
 <210> 5  
 <211> 760  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 5  
  
 Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu  
 1 5 10 15  
  
 Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp  
 20 25 30  
  
 Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Glu Glu Glu Asn Ala  
 35 40 45  
  
 Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Val Thr Lys Pro Lys Arg Cys Ser Gly  
 50 55 60  
  
 Ser Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Val Phe Phe Leu Ile Gly  
 65 70 75 80  
  
 Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr  
 85 90 95  
  
 Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro  
 100 105 110

## 048186

Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys  
 115 120 125

Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile  
 130 135 140

Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln  
 145 150 155 160

Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe  
 165 170 175

Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val  
 180 185 190

Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg  
 195 200 205

Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys  
 210 215 220

Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys  
 225 230 235 240

Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile  
 245 250 255

Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu  
 260 265 270

Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe  
 275 280 285

Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly  
 290 295 300

Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln  
 305 310 315 320

Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr  
 325 330 335

Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp  
 340 345 350

Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser  
 355 360 365

048186

Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile  
 370 375 380

Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp  
 385 390 395 400

His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala  
 405 410 415

Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met  
 420 425 430

Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile  
 435 440 445

Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr  
 450 455 460

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr  
 465 470 475 480

Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val  
 485 490 495

Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn  
 500 505 510

Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp  
 515 520 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe  
 530 535 540

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp  
 545 550 555 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu  
 565 570 575

Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu  
 580 585 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn  
 595 600 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp





## 048186

Phe Pro Pro Ser Gln Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr  
 325 330 335

Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp  
 340 345 350

Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Lys Met Val Thr Ser  
 355 360 365

Glu Asn Lys Ser Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Thr  
 370 375 380

Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp  
 385 390 395 400

His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala  
 405 410 415

Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met  
 420 425 430

Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile  
 435 440 445

Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr  
 450 455 460

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr  
 465 470 475 480

Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val  
 485 490 495

Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asp  
 500 505 510

Val Lys His Pro Val Thr Gly Arg Ser Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp  
 515 520 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe  
 530 535 540

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp  
 545 550 555 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu  
 565 570 575

## 048186

Val Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu  
580 585 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Thr Glu Leu Asn  
595 600 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Leu Phe Leu Arg Asp  
610 615 620

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Val Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln  
625 630 635 640

Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu  
645 650 655

Thr Thr Asp Phe Arg Asn Ala Glu Lys Arg Asp Lys Phe Val Met Lys  
660 665 670

Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr Tyr Phe Leu Ser Pro  
675 680 685

Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser  
690 695 700

Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Leu Glu Ser Leu Lys Leu Arg Arg  
705 710 715 720

Gln Asn Asn Ser Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala  
725 730 735

Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp  
740 745 750

Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe  
755 760

<210> 7

<211> 43

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер hTfR5', синтетическая последовательность

<400> 7

ccgacgcgctc gccaccatga tggatcaagc tagatcagca ttc

43

<210> 8

<211> 59

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер hTfR3', синтетическая последовательность

<400> 8

ataatgсggс сgcttaatga tgatgatgat gatgaaactc attgtcaatg tcccaaacg 59

<210> 9

<211> 113

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи  
мышинного

анти-hTfR антитела № 3

<400> 9

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Thr Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Phe Phe Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg

<210> 10

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи  
мышинного

анти-hTfR антитела № 3

&lt;400&gt; 10

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Met Asn Tyr  
 20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Ser Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Val Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Ser Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Thr  
 115

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Аминокислотная последовательность 1 CDR1 легкой цепи мышиноного  
 анти-hTfR антитела № 3

&lt;400&gt; 11

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr  
 1 5 10

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Аминокислотная последовательность 2 CDR1 легкой цепи мышиноного  
 анти-hTfR антитела № 3

&lt;400&gt; 12

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15

<210> 13  
<211> 6  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Аминокислотная последовательность 1 CDR2 легкой цепи мышиного анти-hTfR антитела № 3

<400> 13

Lys Val Ser Asn Arg Phe  
1 5

<210> 14  
<211> 7  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Аминокислотная последовательность 2 CDR2 легкой цепи мышиного анти-hTfR антитела № 3

<400> 14

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

<210> 15  
<211> 9  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи мышиного анти-hTfR антитела № 3

<400> 15

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr  
1 5

<210> 16  
<211> 5  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Аминокислотная последовательность 1 CDR1 тяжелой цепи мышиного анти-hTfR антитела № 3

<400> 16

Asn Tyr Trp Leu Gly  
1 5

<210> 17

<211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Аминокислотная последовательность 2 CDR1 тяжелой цепи мышиног  
 анти-hTfR антитела № 3  
 <400> 17

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp  
 1 5

<210> 18  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Аминокислотная последовательность 1 CDR2 тяжелой цепи мышиног  
 анти-hTfR антитела № 3  
 <400> 18

Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro  
 1 5

<210> 19  
 <211> 17  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Аминокислотная последовательность 2 CDR2 тяжелой цепи мышиног  
 анти-hTfR антитела № 3  
 <400> 19

Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Ser Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Val

<210> 20  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Аминокислотная последовательность 1 CDR3 тяжелой цепи мышиног  
 анти-hTfR антитела № 3  
 <400> 20

Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr  
 1 5

<210> 21  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Аминокислотная последовательность 2 CDR3 тяжелой цепи мышиного анти-hTfR антитела № 3

<400> 21

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr  
 1 5 10

<210> 22  
 <211> 112  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного анти-hTfR антитела № 3

<400> 22

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser  
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 23  
 <211> 118  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного анти-hTfR антитела № 3

## 048186

&lt;400&gt; 23

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Ser Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Val Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 219

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Аминокислотная последовательность легкой цепи гуманизированного ан-  
ти-hTfR

антитела № 3

&lt;400&gt; 24

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile



## 048186

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Ser Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Val Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser  
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys  
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

048186

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 26

<211> 740

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность

легкой цепи гуманизированного анти-hTfR антитела № 3, синтетическая последовательность

<400> 26

acgcgtgccg ccaccatggg ctggagctgg attctgctgt tcctcctgag cgtgacagca 60

ggagtgcaca gcgacatcgt gatgaccag actcccctga gcctgagcgt gacacctggc 120

cagcctgccg gcatcagctg cagaagctct cagagcctgg tgcacagcaa cggcaacacc 180

tacctgcact ggtatctgca gaagcccggc cagagccctc agctgctgat ctacaagggtg 240

tccaacagat tcagcggcgt gcccgacaga ttctccggca gcggctctgg caccgacttc 300

accctgaaga tttccagagt ggaagccgag gacgtgggcg tgtactactg cagccagagc 360

accacgtgc cctggacatt cggccagggc accaaggtgg aatcaagag aaccgtggcc 420

gctcccagcg tgttcatctt cccacctagc gacgagcagc tgaagtccgg cacagcctct 480  
 gtcgtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac 540  
 aacgccctgc agagcggcaa cagccaggaa agcgtgaccg agcaggactc caaggacagc 600  
 acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg 660  
 tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg tctagccccg tgaccaagag cttcaacaga 720  
 ggcgagtgct aagcggccgc 740

<210> 27

<211> 1330

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность слитого белка тяжелой цепи гуманизированного анти-hTfR антитела № 3 (IgG4) и hGAA

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Ser Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Val Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

048186

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser  
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys  
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Ala  
 435 440 445

His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro  
 450 455 460

Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu Gln  
 465 470 475 480

Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu Gln  
 485 490 495

Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr Pro  
 500 505 510

Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr Ala  
 515 520 525

Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu Thr  
 530 535 540

Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe Thr  
 545 550 555 560

Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro  
 565 570 575

Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe Ser  
 580 585 590

Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val  
 595 600 605

Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu  
 610 615 620

Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu  
 625 630 635 640

His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu  
 645 650 655

Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser



## 048186

Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly Gly  
 915 920 925

Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu Ser  
 930 935 940

Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile Ala  
 945 950 955 960

Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val Ile  
 965 970 975

Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp Thr  
 980 985 990

Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro Glu  
 995 1000 1005

Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp  
 1010 1015 1020

Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg  
 1025 1030 1035

Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn  
 1040 1045 1050

Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro  
 1055 1060 1065

Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu  
 1070 1075 1080

Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly  
 1085 1090 1095

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser  
 1100 1105 1110

Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu  
 1115 1120 1125

Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly  
 1130 1135 1140

Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile  
 1145 1150 1155

048186

Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu  
1160 1165 1170

Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro  
1175 1180 1185

Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro  
1190 1195 1200

Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro  
1205 1210 1215

Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly  
1220 1225 1230

Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg  
1235 1240 1245

Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile  
1250 1255 1260

Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln  
1265 1270 1275

Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln  
1280 1285 1290

Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro  
1295 1300 1305

Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu  
1310 1315 1320

Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys  
1325 1330

<210> 28

<211> 4076

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность

тяжелой цепи слитого белка гуманизированного анти-hTfR антитела № 3 (IgG4) и hGAA,

синтетическая последовательность

<400> 28

acgcgtgccg ccaccatggg ctggagctgg attctgctgt tcctcctgag cgtgacagca

60

ggagtgacaca gcgaggtgca actagtgacag tctggagcag aggtgaaaaa gcccggggag 120  
 tctctgaaga tttcctgtaa gggttctgga tacagcttta ccaactactg gctgggatgg 180  
 gtgcgccaga tgcccgggaa aggcctggag tggatggggg acatctaccc cggcggagac 240  
 taccctacat acagcgagaa gttcaaggtc caggtcacca tctcagccga caagtccatc 300  
 agcaccgcct acctgcagtg gagcagcctg aaggcctcgg acaccgcat gtattactgt 360  
 gcgagatcag gcaattacga cgaagtggcc tactggggcc aaggaaccct ggtcaccgtc 420  
 tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 480  
 tccgagagca cagccgcctt gggctgctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540  
 gtgtcgtgga actcagggcg cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag 600  
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 660  
 aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 720  
 gagtccaaat atgggtcccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggtcca 780  
 tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag 840  
 gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 900  
 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 960  
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020  
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 1080  
 gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatcca ggaggagatg 1140  
 accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1200  
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260  
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggtcaccg tggacaagag caggtggcag 1320  
 gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcaacaacca ctacacacag 1380  
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagga tctgctcacc ctggacggcc tagggccgtg 1440  
 cctaccagat gcgacgtgcc tectaattcc aggttcgact gcgccccga taaagccatc 1500  
 acccaggaac agtgtgaggc caggggctgt tgctatattc ccgccaagca gggcctgacg 1560  
 ggcgctcaga tgggccagcc ctgggtgctt ttccccctt cctatccctc ctacaagctg 1620  
 gaaaacctgt cctcctccga gatgggctac acagccacc tcacaaggac aacccccacc 1680  
 ttcttccccca aggacatcct caccctgcgg ctggatgtga tgatggagac cgagaaccgg 1740  
 ctgcacttca ccatcaagga cctgccaat cggcggtagc aggtgcctct ggaaaccccc 1800  
 cgggtgcact ccagggtcc ttccccctg tatagcgtgg agtttagcga ggagcccttc 1860  
 ggcgtgatcg tgcaccggca gctcgacgga aggggtgctg tgaacaccac cgtcgcccc 1920

ctgttcttcg	ccgatcagtt	cctccagctg	tccacctccc	tgccctcca	gtacattacc	1980
ggcctggctg	agcacctgag	ccccctgatg	ctgtccacca	gctggacaag	gatcaccctg	2040
tggaatcggg	acctcgctcc	cacccctgga	gccaatctgt	acggcagcca	ccccttctac	2100
ctggccctcg	aagatggagg	cagcgctcat	ggcgtgttcc	tgctgaattc	caacgctatg	2160
gacgtggtgc	tccaaccctc	ccctgcctcg	tcttgaggga	gcacaggcgg	cattctggac	2220
gtctacattt	tcctcggccc	cgagcctaaa	tcgctcgtcc	agcagtacct	ggacgtggtg	2280
ggctaccctt	ttatgcctcc	ttactggggc	ctgggctttc	acctgtgtag	gtggggctat	2340
tccagcaccg	ctattacacg	gcaggctcgc	gaaaacatga	cacgggcca	ctttcccctg	2400
gacgtccaat	ggaatgacct	ggactacatg	gactcccggc	gggacttcac	attcaataag	2460
gacggcttcc	gggacttccc	tgccatggtg	caggagctgc	atcagggagg	ccggaggtag	2520
atgatgattg	tggaccctgc	tatttcacgc	tcgggacctg	ctggctccta	ccggccctac	2580
gacgagggac	tgcggagggg	cgtcttcate	acaaacgaaa	ccggtcagcc	cctgattgga	2640
aaggtgtggc	ccggttctac	agctttcccc	gactttacaa	acccacagc	cctggcttgg	2700
tgggaggaca	tgggtggcca	gtttcacgac	caggtgcctt	tcgacggcat	gtggatcgat	2760
atgaacgagc	cttccaactt	tatcaggggc	agcgaggatg	gctgccccaa	caacgagctc	2820
gagaatcccc	cctacgtccc	cggagtcgtg	ggaggcacac	tccaggctgc	cacaatctgc	2880
gccagctccc	atcagttcct	gagcaccat	tacaacctgc	ataacctgta	cggcctcacc	2940
gaagccatcg	ccagccatag	ggctctggtg	aaggccaggg	gaacacggcc	tttcgtgatc	3000
tccaggagca	catttgccgg	ccacggcagg	tacgctggcc	actggacagg	cgatgtctgg	3060
tcctcctggg	agcaactggc	ttccagcgtc	cccagatccc	tccagttcaa	cctgctgggc	3120
gtgcccctgg	tgggcgcca	cgtgtgoggc	tttctcggca	acacctccga	ggagctgtgt	3180
gtgcggtgga	cccagctggg	cgcttctat	ccctttatgc	ggaatcaca	cagcctgctg	3240
tcctgcctc	aggaacccta	cagcttcagc	gaacctgctc	agcaggccat	gcggaaggcc	3300
ctgaccctcc	ggtatgcctt	gctgccccac	ctctataccc	tgtttcatca	ggctcatgtg	3360
gctggcgaga	cagtggctag	gcctctgttc	ctggagtttc	ccaaggattc	cagcacatgg	3420
acagtggacc	atcagctgct	gtggggogag	gctctgctga	tcacaccctg	gctgcaggcc	3480
ggcaaagccg	aggtgacagg	ctatttcccc	ctgggaacct	ggtacgacct	ccagacagtg	3540
cccattgagg	ccctgggttc	tctccctcct	cctcctgcog	ctcccaggga	acctgctatc	3600
cactccgaag	gccagtgggt	gacctgcct	gctcccctgg	acacaatcaa	cgctccacctg	3660
cgggctggct	acattattcc	tctccaggga	cccggcctga	caaccacaga	gagcaggcag	3720
cagcccatgg	ccctggctgt	cgctctgaca	aaaggaggcg	aggcccgggg	agagctcttc	3780
tgggatgacg	gcgagagcct	ggaggctcctg	gagaggggag	cctataccca	ggtgatcttc	3840

ctcgcccgga acaacacccat tgtgaacgag ctgggtgaggg tcacatccga aggagccgga 3900  
 ctgcaactgc agaaagtgac agtgctgggc gtcgccaccg ctcctcaaca ggtgctgtcc 3960  
 aacggcgtgc ccgtctccaa ctttacctac agccccgaca ccaaggtgct ggacatttgt 4020  
 gtgtccctgc tgatgggcca acagtttctg gtgtcctggt gttaataagc ggccgc 4076

<210> 29

<211> 845

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность тяжелой цепи слитого белка гуманизированного анти-hTfR антитела № 3 (IgG4) и h альфа-galA

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Ser Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Val Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175

## 048186

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser  
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys  
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

048186

420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Leu  
435 440 445

Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu  
450 455 460

Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile  
465 470 475 480

Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly  
485 490 495

Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met  
500 505 510 515

Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg  
515 520 525

Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly  
530 535 540

Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly  
545 550 555 560

Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala  
565 570 575

Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser  
580 585 590

Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn  
595 600 605

Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met  
610 615 620

Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn  
625 630 635 640

His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys  
645 650 655

Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val  
660 665 670

## 048186

Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn  
675 680 685

Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala  
690 695 700

Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser  
705 710 715 720

Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn  
725 730 735

Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn  
740 745 750

Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala  
755 760 765

Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala  
770 775 780

Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile  
785 790 795 800

Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr  
805 810 815

Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln  
820 825 830

Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu  
835 840 845

<210> 30

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер Нуг-Sfi5', синтетическая последовательность

<400> 30

gaggccgcct cggcctctga

20

<210> 31

<211> 29

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер Нуг-BstX3', синтетическая последовательность

<400> 31  
aaccatcgtg atgggtgcta ttcctttgc 29

<210> 32  
<211> 15669  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность нуклеиновой кислоты вектора с нокаутом GAA, синтетическая последовательность

<400> 32  
ggcggccgct tgatacctta caactacatg aaggctcata accatctgta cagatacagt 60  
gtactcatat acataaaata aataatTTTT taaaaaagaa gccgaagctg agcgtgggtg 120  
cacatgcctt taaccccagc acttgggagg cagaggcagg tagatttctg agttccaggc 180  
cagcctggtc tatagagtga gttccaggac agccagggct gtacacagaa accctgtctc 240  
ggaaaaaaca aaaaagaaaa agaaaaacat tcccatcact taacttttct aaaagattta 300  
ttatgtatac aacatttctg ctgcacttac gtctgcaggc cagaagaggg caccagatct 360  
cattatagat agtcatgagc caccaggtgg ttgctgggat ttgaactcag gacctctgga 420  
agagcagcca gtgctctcaa cctctgagcc atctctccag cccacgtaat tgttttaaga 480  
agccaaaatt ctaccatac tgtctccct ctcttagatc aaagatcctg ctagtaagcg 540  
ctacgaagtg cccttgaga cccacgtgt gctgagccag gcaccatccc cactttacag 600  
cgtggaattc tcagaggaac cctttggagt gatcgttcgt aggaagcttg gtggccgagt 660  
gttgtgagtt ggttacctga ggctttgact ccacctgag tggcccctta gggtcagagc 720  
ttctgcaatc agcaaacctg tctacctcat tccaaacct gccttttct gtcttgttt 780  
ctgttgctgt ggtaaacacg aacagaagcc acgtggggaa gagaaagtgg tttacctcac 840  
aggttctagg ccatgctcca tcaactgccg ggcaggaact gaagcagagg ccatggagga 900  
gtgctgttta ctgccttagt cctcatggct cacttagctt aagttcttat ccagcccaga 960  
actaccagcc ctaggggtgt accaccctca gtgagctagg cccacccac aacgaactag 1020  
gccccacca cagtgagcta ggccccacc acaacaagct aggccccacc cacagtgtgc 1080  
taggcctcc cacatcagtc aaaataaaaa atactcctc aggttactta cagaccaatc 1140  
taatggaagt atgttctcag tggagagtca tccctcttc tagatggccc tcgcttgat 1200  
caagtgatca ccagttctt ggcttcagc tctctcattg ggtcccagag gttccctctg 1260  
tggcttcca gtgaggagtg gtgcctcca ggagagacag gcagtgtgtg gagatgacct 1320  
accacagagg atgatccatc caagtgccag ggggactagg ggaagacagt tgtccgtcca 1380  
cagtggcgcc ccctgcaggc ggcacactct gccagccgcc tctcttaagc cttgtgtttc 1440

tccaaggtcc	atgtcccca	gacaggacct	catgctggta	cccctgtgcc	ctctgacctg	1500
gggtgacatg	ggaccccctt	gggcatgcct	gtccggctt	ctcccactgt	cttcagatgc	1560
tgagagcctc	tgggctctat	gtggccgttg	tcccagggtt	gtaatctggc	gtccccccac	1620
aggctgaaca	caaccgtggc	ccccctgttc	ttcgctgacc	agttcctgca	gctgtccact	1680
tccttgcctt	cccagcacat	cacaggcctg	ggggaacacc	tcagcccact	catgctcagc	1740
accgactggg	ctcgtatcac	cctctggaac	cgggacacac	caccctcggg	aagagacggg	1800
cagtgggtgg	gaggggtggag	gctgggatcc	tgagtgcaag	gcgttgtctc	ttgtcacccc	1860
agcaaggtac	caacctctac	gggtcacatc	ctttctacct	ggcactggag	gacggtggtt	1920
tggctcacgg	tgtcttcttg	ctaaacagca	atgccatggg	tgagtcacca	gactggggct	1980
cctcagcggg	cacttccgtg	tgagagcttg	cccgtccag	agtctgcctg	tctccaagcg	2040
acctccgtgg	agagagtccc	gtgagcagag	tccccctcat	cctcgggaacc	taaggaggtc	2100
ctgggtgatt	ctccaggctc	acatgttcac	gtccttcagg	ccttgctatg	ttgagctcag	2160
tacagctgcc	tcaggcccac	cctgaggaca	tctccccaca	attcatattg	gaagggcgcg	2220
ccataacttc	gtataatgta	tgctatacga	agttatagcc	acactccacc	cacaggttga	2280
gtcccccatc	tgtggggcac	ttgttcctga	gccccaaacac	ttctttccag	atgtcatcct	2340
gcaaccacgc	ccagccctaa	cctggagggtc	aacggggcggg	tgaaattcta	ccgggtaggg	2400
gagggcgttt	tccaaggca	gtctggagca	tgcgctttag	cagccccgct	gggcacttgg	2460
cgctacacaa	gtggcctctg	gcctcgcaca	cattccacat	ccaccggtag	gcgccaaccg	2520
gctccgttct	ttgggtggccc	cttcgcgcga	ccttctactc	ctcccctagt	caggaagttc	2580
ccccccgccc	cgcagctcgc	gtcgtgcagg	acgtgacaaa	tggaagtagc	acgtctcact	2640
agtctcgtgc	agatggacag	caccgctgag	caatggaagc	gggtaggcct	ttggggcagc	2700
ggccaatagc	agctttgctc	cttcgctttc	tgggctcaga	ggctgggaag	gggtgggtcc	2760
gggggcgggc	tcaggggcgg	gctcaggggc	ggggcgggcg	cccgaaggtc	ctccggaggc	2820
ccggcattct	gcacgcttca	aaagcgcacg	tctgcgcgc	tgttctcctc	ttcctcatct	2880
ccgggccttt	cgacctgcag	ccaatatggg	atcggccatt	gaacaagatg	gattgcacgc	2940
aggttctccg	gccgcttggg	tggagaggct	attcggctat	gactgggcac	aacagacaat	3000
cggctgctct	gatgccgccg	tgttccggct	gtcagcgcag	gggcgcccgg	ttctttttgt	3060
caagaccgac	ctgtccgggtg	ccctgaatga	actgcaggac	gaggcagcgc	ggctatcgtg	3120
gctggccacg	acgggcgttc	cttgcgcagc	tgtgctcgac	gttgtcactg	aagcgggaag	3180
ggactggctg	ctattggggc	aagtgcgggg	gcaggatctc	ctgtcatctc	accttgctcc	3240
tgccgagaaa	gtatccatca	tggctgatgc	aatgcggcgg	ctgcatacgc	ttgatccggc	3300
tacctgccca	ttcgaccacc	aagcgaaaca	tcgcatcgag	cgagcacgta	ctcggatgga	3360

agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga 3420  
 actgttcgcc aggctcaagg cgcgcatgcc cgacggcgat gatctcgtcg tgacccatgg 3480  
 cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg 3540  
 tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg ttggctaccg gtgatattgc 3600  
 tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc 3660  
 cgattcgag cgcatcgct tctatcgct tcttgacgag ttcttctgag gggatcgatc 3720  
 cgctgtaagt ctgcagaaat tgatgatcta ttaaacaata aagatgtcca ctaaaatgga 3780  
 agtttttctt gtcatacttt gttaagaagg gtgagaacag agtacctaca ttttgaatgg 3840  
 aaggattgga gctacggggg tgggggtggg gtgggattag ataaatgcct gctctttact 3900  
 gaaggctctt tactattgct ttatgataat gttcatagt tggatatcat aatttaaaca 3960  
 agcaaaacca aattaagggc cagctcattc ctcccactca tgatctatag atctatagat 4020  
 ctctcgtggg atcattgttt ttctcttgat tcccactttg tggttctaag tactgtggtt 4080  
 tccaaatgtg tcagtttcat agcctgaaga acgagatcag cagcctctgt tccacataca 4140  
 cttcattctc agtattgttt tgccaagttc taattccatc agaagctatc ctggatgtgt 4200  
 atgtgttcct aggcccagag cccaagagcg ttgtgcaaca atacctggat gttgtgggta 4260  
 ggcataactt cgtataatgt atgctatacg aagttatgtc gacctggccc ctgcccactg 4320  
 agctcagacc cctgccctt gctccttggc ccattgtccc agtccttctg cactcgcagt 4380  
 actggtcctc aggatacccc ttcatgcctc catactgggg cctcggcttc cacctctgcc 4440  
 gctggggcta ctctcgacc gccattgtcc gccaggtagt ggagaacatg accaggacac 4500  
 acttcccgt ggtgagtggc agtcagggtg agggcggccc cagcttccgt gctcttggct 4560  
 cccgacctca gcatcagctc gogtctctg cttcaggacg tgcaatggaa tgacctggac 4620  
 tacatggacg cccgaagaga cttcacctc aaccaggaca gctttgccga cttcccagac 4680  
 atggtgcggg agctgcacca ggatggcgg cgctacatga tgatcgtggt aagcaggttt 4740  
 gggcacagcc attgctgctg cttccgtgtg gcctcttct cctacctgag cagtttccca 4800  
 ggacactctc tgatgtgtct gctgcccagg ctctggaca caccatgag ctcggggctc 4860  
 tttggttaac aggcgggatc cgcagaactg ctctgcctta aagcctgcgg caggggccgt 4920  
 aacgagctgg tactgagctg aggacctaga tgtggtttgt gcgtcctcct ggcctgctc 4980  
 ctctctcagg ccagctatgt ccatgtggga aggaaacata cttgccctgt gcctgtcccc 5040  
 gcagcaggaa ggtccaagaa gaccaaacag tcacagccat gggatgtcct tgaggggagg 5100  
 gagctaagcc ctggaagata cggctttgta aggaagggt acgactgcct cgccgccacc 5160  
 accaccacca ccaccaccac ggggcagtga atagtgttac aggcagtgag ggccaccag 5220

acattaggca agccctccac cactgagctg cactgccaac tctctttccg gtttttattt 5280  
gaggcagggc cacaccagat tgcccagcca ggccttgaat ccataatcct cccacttccg 5340  
cggctccaggc agctgggatg atgaacctgt atcaccagcc cccgtgcaga tttaaagacag 5400  
ggtctcctca tgtagctctg actgacctat ctgtcactgt atagagtaga ccaggctggc 5460  
ctcaaactca cccgcctgcc tcttagtctc tcagcagctg gaactaaagg cgtgcgccac 5520  
catgcctggg tgctttttat tcatctccat ttttaaaaag taagtggggc tggaaagatg 5580  
gctgagcagt taaagcacac tgctctcgaa gaggactgga gttcggtgcc tgggacctac 5640  
accaagcagc tgtacttgtc atttcagcag ctgctgctgg cctctgtggg tcacgtgcat 5700  
tcgctgctgct gcgctgctgc gcacacacac acacagacac acacacacag acacacaagt 5760  
aataataagc tggacagtgt ggtaaacacc tgtttttttt ttattattta tttatttatt 5820  
tatttgagca cactggagct gtcttcagac acaccagaag agggcatcag atcccattac 5880  
agatgtttgt gagctaccat gtggttttgg ggatttgaac tcaggacctc tggaaagagca 5940  
gcagtcagtg ctcttaacct ctgagccatc tcccagcgc atacagtga cacctttaat 6000  
cacagctctc gggaggcaga ggcaggtgca tctcttgagt tctgtgcca cccggtctac 6060  
agagtgagtt tcaaggcagc caagaatata caaagaaacc ccatcttta aattaaat 6120  
aaaataaaaa gagcaaatat aagcaactgc tgtaactctg gaaagcctga gaacaggagg 6180  
atcacacgtc tagacttgct caccctgct gcccccaaca ggcttcgcac agcctgacct 6240  
atgccgcttt cctgtatagg ccatctctgc ctccggccagc tctcttctct gggacctgag 6300  
cttctacctc tgccgctccg gctgctcctc cttctgggct ttggggctag gctcttact 6360  
gttggcttct cccccagga ccctgccatc agcagcgcag gccctgctgg gagttacagg 6420  
ccctacgacg agggctctgc gaggggctg ttcatcacca acgagactgg gcagccgctg 6480  
attgggaagg tagcgagggg gatgggagct gtgggtgggg tgggtggggg ggggtcctca 6540  
ctgggggtaa ctctgacag tcgcctgagg ttttctaagt ggaggggtgt ctcaggcatc 6600  
ctgagtagct gggcccggct taagcctagc agaccttctg tgaggccttg gagattgggg 6660  
ggaggggagt cttccttgtc cctggggggc ttctgggagt tctgagtccc agcctcccca 6720  
tcctaagcag ccctggccat gggagaagtg agggcttctg tctgggtggc agggatcaat 6780  
ggcactatct caacctcttt cccatgccct ggttcatggc tcatctgcc cacggcctta 6840  
tgtgtagggc tggcctttgc tctcccaagg ctgaaggccc ctatgccctg aggcattggt 6900  
tgatattggg cttgaggctc tctgatata tcatggctt agagcgaggc tgctgccttg 6960  
cttgaggcat gaggcccaac agggctctgg cgcaggatct gtgtgggtatt ggttcttccc 7020  
tctgggctct tgttcagggt tggcctggaa ccaccgctt cctgatttc accaacctg 7080  
agacccttga ctgggtggcag gacatgggtg ctgagttcca cgcccagggt cccttcgatg 7140

gcatgtggct cgtaagtgca gtcccatccc tccatgggta cccccccagc ctctggggac 7200  
caacctagct cacatctctg cctcttccag gacatgaacg aaccgtccaa ctctcgtaga 7260  
ggctctcagc agggctgccc caacaatgaa ctggagaacc ccccctatgt gcccggtgag 7320  
ccctgcttgc ctgcccggaa tggggatagt gctagagtta gtggcttaaa ccagggagt 7380  
tgcgcctctc tgtggtttgg gggatgtaaa gctctccatt tttttggccg tcaatagaca 7440  
cagcagcttc gggacacaga acccaggagt gaagtctac agtgtgtgac acagacatgg 7500  
tcacagctag ccagtgcac aggggaaggg ggtaggccc ggatgacaga cacttaggat 7560  
gagtcaagag aagggtgatg tggagactgt aggtttagga ggaccgtctt tcgtacacct 7620  
gtctttggac tagcagaagt gtatagtgat gtggggggat ggggatggga ccagtttcag 7680  
gaggctccgc cctgggcaga acccaaggag gtgtcaatca aagcagaggg tgtgggcca 7740  
ggagagggca caggaaccc tggagagagt tacacctaaa actagtcctc ctctcgccta 7800  
ggggtgggtg gcgggatctt gcaggcagcc accatctgtg cctccagcca ccaattcctc 7860  
tccacacact acaacctcca caacctgtac ggctcactg aagctatcgc ctccagcagg 7920  
tgaggctctg ccggctctgc accagccagc ctgccctgca atcacagtgg gggtcgagag 7980  
gtgggctggc tcatgtcagg gtcatgaaag gaagggaaag aggttaccat accacccatg 8040  
ggccagcgat gctgcaagt ctgctgaaat ggttgcgtgt tccccctcc cccccccagc 8100  
atggagccgg cttctcccc ctatgccag accagccag atgttaagtg gggatgtcca 8160  
aagggactcc atgtctctgg caaggcttag agtggtgact cacctgtaaa tgacttaaga 8220  
gtcattgggg caggcctgac tgtacctagc atactttaa gatggcctct ctttcccacc 8280  
cattgtgac tactaaacta tcagttctc ttggccctga tccccttgct gctggcccc 8340  
atgctctgtt ccagcacacg ggtgtgatg acccaggtga gcccaggtct ctgtgttctc 8400  
atcccactca gggccctggt caagactcgg ggaacacgac cctttgtgat ctcccgtca 8460  
accttctcgg gccacggccg gtacgctggt cactggacag gggatgtgag gagctcttg 8520  
gagcatcttg catactctgt gccaggtag tacaagctgc ctgcagggct ctggggctct 8580  
ttctgggggt ctttgggctg tgggctcacc actgcagatg gtattgtgat agcttgggga 8640  
catgcgccat ctcatgtggc acatgaagc tgctgctggt ccttactcac ctgtgtcagc 8700  
agcgcacctg tgcagtatgg ctgcctggg caccttctt ctcaggatcc ctgtgtctgt 8760  
ttcacctga cactgcttg aaaagccctc agactctcgc cagagaccgg ttgttctctg 8820  
gtcacctcat ccggagacac aggctagctg ttccacttgc ttttgggggt ttgtttgtt 8880  
ttcaagacag ggtctctctc tctctctctc tgtatagcca tgaatgtcct ggaactggct 8940  
ttgtagacca gtctggcctc aaattcatag aagtctgcct gcctctgcct cccaagtgt 9000

gggattaaag acgtttataa ccacagocca gctgcctgat ctacttgcaa aaaggagttt 9060  
 ggtttttatt ccaagaactt gaatgccatt ggcccatggt aggtcagaaa gtcaggagcc 9120  
 ctagagaaca gactagggaa ggagagggag ccaggcctcc tcatgggcac ctaaggggcg 9180  
 tgactaagag tttggaacct tctaacttct ggaagactgg cttctgtata ggatatgctc 9240  
 acagacctat gaagggcccc agctggctga ctctcagag gtggagctgg ctacctctgc 9300  
 ctcatgggct gcagctcact gcaggcaggc ctggtaggcc aggagccaga ctcagagcag 9360  
 ccttgacagag ctgagtctgg tctttctoct tctcttttgg cctcaggtct cttaatgtcc 9420  
 tgaggctgcc agagctgagg gcagctttct ggggacttaa tgtcatagga atccatctgt 9480  
 ggatagtgac tggaccatag gtctgcagcc aaggagtgac agagccacac ccccttgccc 9540  
 caaggtgtgg ctcggtgccc ctcacagcct tgggaaccct tcattctgct ctaggccctc 9600  
 tgggcgttgc tgctgggatg tatctccatc ctcacagggc tatcgtccca tgtgactttt 9660  
 aagtgtccca cgacattttc ttcaggacca catcaaacc accttagtgc cattacatct 9720  
 ggagagctcc tgtttccaaa tgaggttaca gtcacacatc ctgcacccca gtatcttggg 9780  
 ctctgggcta ctctgctgcc cacaggcggt aggacaaatg gaaagcagag aactatgggc 9840  
 tcttgcccgt caggccggga tggcaaggct gggttcaacc tgcccagcag gcctgtctgt 9900  
 ccagctgctg tcttggtaac ctggtaccac tctgcctctg taccagaca tctgcagtt 9960  
 caacctgctg ggcgtgcccc tggctggggc ggacatctgc ggcttcatag gagacacgtc 10020  
 agaagagctg tgtgtgctgt ggaccagtt gggggccttc tacccttca tgcggaacca 10080  
 caatgacctg aatagcgtgg taggacggag tggcagggag tccccacca cctagaccct 10140  
 ctctgggta atccataacc tgctggaaga gctgtcgacg aattctaccg ggtaggggag 10200  
 gcgcttttcc caaggcagtc tggagcatgc gcttttagcag ccccgctggg cacttggcgc 10260  
 tacacaagtg gcctctggcc tcgcacacat tccacatcca ccggtaggcg ccaaccggct 10320  
 ccgttctttg gtggcccctt cgcgccacct tctactcctc ccctagtcag gaagttcccc 10380  
 cccgccccgc agctcgcgtc gtgcaggacg tgacaaatgg aagtagcacg tctcactagt 10440  
 ctctgacaga tggacagcac cgctgagcaa tggaaagcggg taggcctttg gggcagcggc 10500  
 caatagcagc tttgctcctt cgctttctgg gctcagaggc tgggaagggg tgggtccggg 10560  
 ggcgggctca ggggcgggct caggggcggg gcgggcgcga aggtcctccc gaggcccggc 10620  
 attctcgcac gcttcaaaaag cgcacgtctg ccgcgctggt ctctcttcc tcatctccgg 10680  
 gcctttcgac ctgcagcagc ccgcttaaca gcgtcaacag cgtgccgcag atcttgggtg 10740  
 cgtgaaactc ccgcacctct tcggccagcg cctttagtaa gcgcgtatgg ctctgtacct 10800  
 ctgccatcaa cacgcgtctg cgttcgacca ggctgcgcgt tctcgcggcc ataacaaccg 10860  
 acgtacggcg ttgcgcctc gccggcaaca aaaagccacg gaagtccgcc tggagcagaa 10920

aatgcccacg	ctactgicggg	tttatataga	cggtccccac	gggatgggga	aaaccaccac	10980
cacgcaactg	ctgggtggccc	tgggttcgog	cgacgatata	gtctacgtac	ccgagccgat	11040
gacttactgg	cggtgtttgg	gggcttcoga	gacaatcgog	aacatctaca	ccacacaaca	11100
ccgcctcgac	cagggtgaga	tatcggccgg	ggacgcggcg	gtggtaatga	caagcgccca	11160
gataacaatg	ggcatgcctt	atgccgtgac	cgacgccggt	ctggctcctc	atatcggggg	11220
ggaggctggg	agctcacatg	ccccgcccc	ggccctcacc	ctcatcttcg	accgccatcc	11280
catcgccgcc	ctcctgtgct	accgggocgc	gcgatacctt	atgggcagca	tgacccccca	11340
ggccgtgctg	gcgttcgtgg	ccctcatccc	gccgaccttg	cccggcacia	acatcgtggt	11400
gggggcccct	ccggaggaca	gacacatcga	ccgcctggcc	aaacgccagc	gccccggcga	11460
gcggcttgac	ctggctatgc	tggccgcgat	tcgcccgcgt	tatgggctgc	ttgccaatac	11520
ggtgcgggat	ctgcagggcg	gcgggtcgtg	gcgggaggat	tggggacagc	tttcgggggc	11580
ggccgtgccg	ccccaggggtg	ccgagcccca	gagcaacgcg	ggccccacgac	cccatatcgg	11640
ggacacgtta	tttaccctgt	ttcgggcccc	cgagttgctg	gcccccaacg	gcgacctgta	11700
taacgtgttt	gcctgggctt	tggacgtcct	ggccaaacgc	ctccgtccca	tgcattgtctt	11760
tatcctggat	tacgaccaat	cgcccgcggg	ctgccgggac	gccctgctgc	aacttacctc	11820
cgggatggtc	cagaccacag	tcaccacccc	aggctccata	ccgacgatct	gcgacctggc	11880
gcgcacgttt	gccccgggaga	tgggggaggc	taactgaaac	acggaaggag	acaataaccg	11940
aaggaacccg	cgctatgacg	gcaataaaaa	gacagaataa	aacgcacggg	tgttgggtcg	12000
tttgttcata	aacgcgggggt	tcgggtcccag	ggctggcact	ctgtcgatac	cccaccgaga	12060
ccccattggg	accaatacgc	ccgcgtttct	tccttttccc	cacccaacc	cccaagtctg	12120
ggtgaaggcc	cagggctcgc	agccaacgtc	ggggcggcaa	gccctgcat	agccacgggc	12180
cccgtgggtt	agggacgggg	tccccatgg	ggaatggttt	atggttcgtg	ggggttatta	12240
ttttgggcgt	tgcgtgggggt	caggtccacg	actggactga	gcagacagac	ccatggtttt	12300
tggatggcct	gggcatggac	cgcatgtact	ggcgcgacac	gaacaccggg	cgtctgtggc	12360
tgccaaacac	ccccgacccc	caaaaaccac	cgcgcggatt	tctggcgccg	ccggacgaac	12420
taaacctgac	tacggcatct	ctgccccttc	ttcgtggta	cgaggagcgc	ttttgttttg	12480
tattggtcac	cacggccgag	tttccgcggg	accccggcca	ggacctgcag	aaattgatga	12540
tctattaaac	aataaagatg	tccactaaaa	tgggaagttt	tcctgtcata	ctttgttaag	12600
aagggtgaga	acagagtacc	tacatthtga	atggaaggat	tggagctacg	gggggtggggg	12660
tgggggtggga	ttagataaat	gcctgctcct	tactgaaggc	tctttactat	tgctttatga	12720
taatgtttca	tagttggata	tcataattta	aacaagcaaa	accaaattaa	gggccagctc	12780

attcctccca	ctcatgatct	atagatctat	agatctctcg	tgggatcatt	gtttttctct	12840
tgattcccac	tttgtgggtc	taagtactgt	ggtttccaaa	tgtgtcagtt	tcatagcctg	12900
aagaacgaga	tcagcagcct	ctgttccaca	tacacttcat	tctcagtatt	gttttgccaa	12960
gttctaattc	catcagaagc	ttggcactgg	ccgtcgtttt	acaacgtcgt	gactgggaaa	13020
accctggcgt	tacccaactt	aatcgocctt	cagcacatcc	ccctttcgcc	agctggcgta	13080
atagcgaaga	ggcccgcacc	gatcgccctt	cccaacagtt	gcgcagcctg	aatggcgaat	13140
ggcgcctgat	gcggtatfff	ctccttaocg	atctgtgcgg	tatttcacac	cgcatatggt	13200
gcactctcag	tacaatctgc	tctgatgocg	catagttaag	ccagccccga	cacccgccaa	13260
cacccgctga	cgcgccctga	cgggcttgtc	tgctcccggc	atccgcttac	agacaagctg	13320
tgaccgtctc	cgggagctgc	atgtgtcaga	ggttttcacc	gtcatcaccg	aaacgcgcga	13380
gacgaaaggg	cctcgtgata	cgctatfff	tataggttaa	tgtcatgata	ataatggttt	13440
cttagacgtc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aaccctatt	tgtttatfff	13500
tctaaataca	ttcaaatacg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	13560
aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	tgtcgccctt	attccctfff	13620
ttgcggcatt	ttgccttctt	gtttttgctc	accagaaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	13680
ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	agcggtaaga	13740
tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacggt	ttccaatgat	gagcactfff	aaagttctgc	13800
tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggg	cgccgcatac	13860
actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	13920
gcatgacagt	aagagaatta	tgcagtgctg	ccataaccat	gagtgataac	actgcggccca	13980
acttacttct	gacaacgatc	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	14040
gggatcatgt	aactcgctt	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaaacg	14100
acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	14160
gcgaactact	tactctagct	tcccggcaac	aattaataga	ctggatggag	gcggataaag	14220
ttgcaggacc	acttctgcgc	tgggoccttc	cggttggtg	gtttattgct	gataaatctg	14280
gagccgggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	14340
cccgtatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	14400
agatcgctga	gataggtgcc	tactgatta	agcattggta	actgtcagac	caagtttact	14460
catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atfffataatt	taaaaggatc	taggtgaaga	14520
tcctfffga	taatctcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	gtfffctgtc	cactgagcgt	14580
cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	ttfffctctg	cgcgtaatct	14640
gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgg	ttgtttgccg	gatcaagagc	14700



кислотной последовательности SEQ ID NO: 3 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

9. Композиция по п.8, где линкерная последовательность содержит 15 аминокислотных остатков, где аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 3 последовательно повторяется три раза.

10. Композиция по любому из пп.1-9, где антитело против рецептора трансферрина человека содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 в вариательной области легкой цепи антитела, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 в вариательной области тяжелой цепи антитела.

11. Композиция по любому из пп.1-9, где 1-10 аминокислот, составляющих вариательную область легкой цепи антитела, замещены другими аминокислотами в сравнении с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22.

12. Композиция по любому из пп.1-9, где 1-3 аминокислоты, составляющих вариательную область легкой цепи антитела, замещены другими аминокислотами в сравнении с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22.

13. Композиция по любому из пп.1-9, где 1-10 аминокислот, составляющих вариательную область тяжелой цепи антитела, замещены другими аминокислотами в сравнении с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23.

14. Композиция по любому из пп.1-9, где 1-3 аминокислот, составляющих вариательную область тяжелой цепи антитела, замещены другими аминокислотами в сравнении с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23.

15. Композиция по любому из пп.1-9, где

1-10 аминокислот, составляющих вариательную область легкой цепи антитела, замещены другими аминокислотами в сравнении с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22, и

1-10 аминокислот, составляющих вариательную область тяжелой цепи антитела, замещены другими аминокислотами в сравнении с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23.

16. Композиция по любому из пп.1-9, где

1-3 аминокислоты, составляющих вариательную область легкой цепи антитела, замещены другими аминокислотами в сравнении с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22, и

1-3 аминокислоты, составляющих вариательную область тяжелой цепи антитела, замещены другими аминокислотами в сравнении с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23.

17. Композиция по п.1, где антитело против рецептора трансферрина человека содержит легкую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

18. Композиция по любому из пп.1-17, выбранная из группы, состоящей из (1)-(4) ниже:

(1) конъюгат, в котором кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека связана с С-концевой стороной легкой цепи антитела пептидной связью,

(2) конъюгат, в котором кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека связана с N-концевой стороной легкой цепи антитела пептидной связью,

(3) конъюгат, в котором кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека связана с С-концевой стороной тяжелой цепи антитела пептидной связью, и

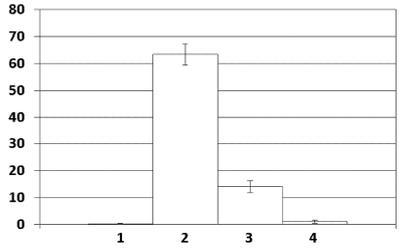
(4) конъюгат, в котором кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека связана с N-концевой стороной легкой цепи антитела пептидной связью.

19. Композиция по п.18, где кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека связана с антителом через линкерную последовательность.

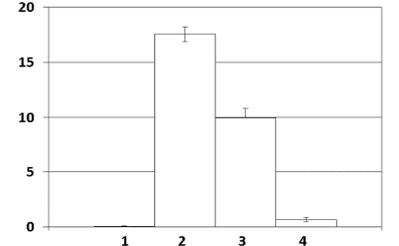
20. Композиция по п.19, где линкерная последовательность состоит из 1-50 аминокислотных остатков.

21. Композиция по п.20, где линкерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из отдельного глицина, отдельного серина, аминокислотной последовательности (Gly Ser), аминокислотной последовательности (Gly Gly Ser), аминокислотной последовательности, описанной как SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности, описанной как SEQ ID NO: 4, и аминокислотной последовательности, состоящей из 1-10 последовательностей аминокислот, которые связаны последовательно.

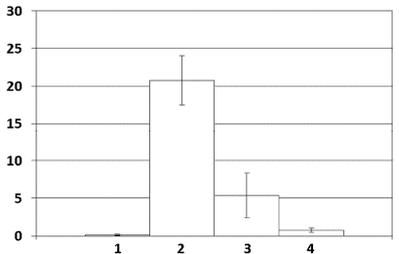
22. Композиция по п.1, где легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и где тяжелая цепь антитела связана его С-концевой стороной с кислотой  $\alpha$ -глюкозидазы человека через линкерную последовательность (Gly Ser), и полноразмерная связанная тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.



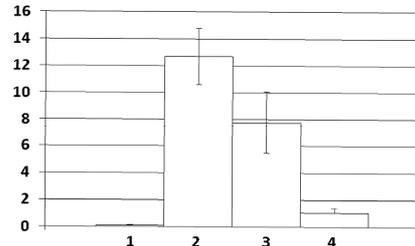
Фиг. 1



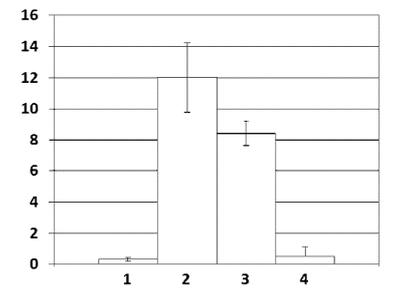
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

