



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 121028

(13) C2

(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 49/16 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

G01N 33/563 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2016 10010**
(22) Дата подання заявки: **04.12.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.03.2020**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/948,818**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **06.03.2014**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **27.02.2017, Бюл.№ 4**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.03.2020, Бюл.№ 6**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/CA2014/000861, 04.12.2014**

(72) Винахідник(и):
**Станіміровіч Даніка (CA),
Кеммеріч Крістін (CA),
Хаккані Арсалан С. (CA),
Сулі Трайан (CA),
Арбабі-Гаруді Меді (CA),
Массі Бернар (CA),
Жільбер Рено (CA)**
(73) Власник(и):
**НЕШНЛ РІСЕЧ КАУНСІЛ ОФ КАНАДА,
1200 Montreal Road, Ottawa, Ontario K1A
0R6, Canada (CA)**
(74) Представник:
Кислиця Тетяна Олегівна, реєстр. №425
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2011150061 A1, 01.12.2011
WO 2011044542 A1, 14.04.2011
Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases / Reinhard Gabathuler // Neurobiology of Disease. – 2010. – Vol. 37. – P. 48-57
A Fully Human Monoclonal Antibody to the Insulin-Like Growth Factor I Receptor Blocks Ligand-Dependent Signaling and Inhibits Human Tumor Growth in Vivo / Douglas Burtrum, Zhenping Zhu, Dan Lu et al. // Cancer research. – 2003. – Vol. 63. – P. 8912-8921
US 2005085419 A1, 21.04.2005

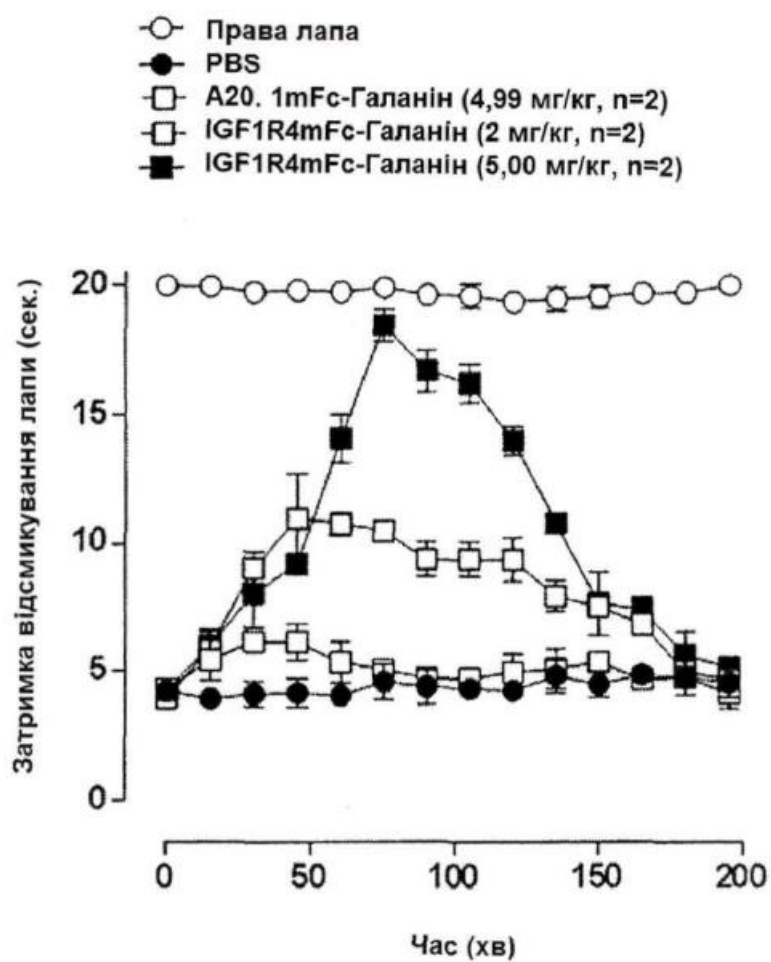
(54) АНТИГЕНЗВ'ЯЗУЮЧИЙ ФРАГМЕНТ АНТИТІЛА, ЯКИЙ СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З РЕЦЕПТОРОМ ІНСУЛІНОПОДІБНОГО ФАКТОРА РОСТУ 1 (IGF1R)

(57) Реферат:

Винахід стосується виділеного або очищеного антигензв'язуючого фрагмента антитіла, де антигензв'язуючий фрагмент антитіла є специфічним для рецептора інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF1R). Також винахід стосується молекули нуклеїнової кислоти, вектора, композиції, *in vitro* способу детектування IGF1R у суб'єкта, *in vivo* способу детектування експресії IGF1R та способу перенесення молекули вантажу через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ), що включає введення суб'єктові вказаного антигензв'язуючого фрагмента антитіла, зв'язаного з молекулою

UA 121028 C2

вантажу, а також способу кількісного визначення кількості молекул вантажу, що доставляється через ГЕБ суб'єкта.



ФІГ. 9 С

Галузь техніки

Винахід відноситься до антитіл, що специфічні до рецептора інсуліноподібного фактору росту 1, їх фрагментами, а також їх застосуванням. Більш конкретно, даний винахід відноситься до антитіл, специфічних до рецептора інсуліноподібного фактору росту 1 і їх фрагментів, які

Рівень техніки

Нейродегенеративні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера і хвороба Паркінсона, є зростаючим тягарем на нашому старіючому суспільстві, тому що в даний час немає ефективних способів лікування цих інвалідизуючих станів. Лікування, а також рання діагностика цих та інших захворювань, які виникають в головному мозку, залишаються складним завданням, оскільки більшість відповідних терапевтичних молекул і діагностик не можуть проникнути через щільний і сильно обмежуючий гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) (Abbott, 2013). ГЕБ є фізичним бар'єром, який утворений ендотеліальними клітинами головного мозку (ЕКМ), що вистилають кровоносні судини і які з'єднуються один з одним за допомогою щільних контактів (Abbott, 2013). Щільні контакти, утворені між ЕКМ, мають важливе значення для цілісності ГЕБ і запобігання парацеллюлярного переносу молекул розміром більше 500 дальтон (Да). Оскільки ендотеліальні клітини мозку демонструють дуже низький рівень піноцитозу (Abbott, 2013), трансцеллюлярне перенесення великих молекул обмежується високо специфічним рецепторно-опосередкованим трансцитозом (POT), і трансцитозом, опосередкованим пасивною адсорбцією на основі заряду (Abbott, 2013; Pardridge, 2002). Крім того, висока щільність ефлюксних насосів, таких як Р-глікопротеїн або білок множинної медикаментозної резистентності-1 (MDR-1), сприяє видаленню небажаних речовин з головного мозку (Abbott, 2013).

У той час як всі ці характеристики захищають мозок від патогенів і токсинів, вони в рівній мірі запобігають проникненню більшості терапевтичних засобів. Насправді, менше 5 % малих терапевтичних молекул і практично ніякі з великих терапевтичних засобів можуть перетинати ГЕБ в фармакологічно значущих концентраціях (тобто достатніх, щоб вразити мішень в центральній нервовій системі (ЦНС) і викликати фармакологічну/терапевтичну відповідь), якщо вони не є специфічно "переносними", тобто з'єднаними з молекулою переносника. Через відсутність ефективних "переносників" для транспортування молекул через ГЕБ численні препарати проти нейродегенеративних захворювань були "заморожені" або виключені з подальших розробок, оскільки вони не можуть бути доставлені в мозок в достатній кількості.

Різні підходи до введення великих молекул в мозок були досліджені. Наприклад, цілісність ГЕБ може бути порушена, що призводить до негерметичності ГЕБ, що в свою чергу допускає необмежене парацеллюлярне введення великих молекул в мозок. Щільні контакти можуть бути успішно послаблені або зруйновані різними підходами. Наприклад, ін'єкція речовин, які викликають осмотичний шок (наприклад маніт, гіпертонічні розчини), в кровотік викликає стиснення і призводить до руйнування щільних контактів, тим самим істотно порушуючи ГЕБ (Guillaume, 2010). Інші модулятори щільних контактів включають алкілгліцерини, брадикинін і кілька його аналогів, а також віруси, які модулюють експресію білків, що беруть участь в підтримці щільних контактів (Erdlenbruch et al., 2003; Preston et al., 2008; Gan et al., 2013). Більш локальне порушення ГЕБ можливо шляхом застосування ультразвуку (Nhan et al., 2013). Проте, часових проміжків, під час яких порушується ГЕБ, досить для зміни гомеостазу мозку, що дозволяє шкідливим хімічним речовинам, токсинам і патогенним мікроорганізмам потрапляти в мозок; це може привести до серйозних побічних ефектів, наприклад судом і набряку мозку, інфекції і, можливо, постійних нейропатологічних змін. Як було б очевидно фахівцям в даній галузі техніки, повторні процедури з використанням цих способів при хронічних і дифузних захворюваннях мозку, що впливають на кілька областей мозку, є непрактичними. Більшість з цих способів лікування є дорогими, вимагають госпіталізації, а також деякі підходи вимагають анестезії.

Іншим підходом для обходу ГЕБ є пряме упорскування терапевтичних молекул в спинномозкову рідину (СМР), паренхімальний простір або інші частини мозку. Кілька способів доставки були розроблені, в тому числі: інтрацеребрально (інтрапаренхімальна), інтравентрикулярна і інтратекальна доставка через інфузійний насос або дифузійний насос з посиленою конвекцією (CED). Проте, будь-який тип прямої ін'єкції в мозок або інтрацеребрального імплантату є інвазивної і дорогою процедурою, так як вона вимагає госпіталізації, анестезії та часто хірургічного втручання. Крім того, низька швидкість дифузії терапевтичних засобів, особливо великих біологічних препаратів, всередині паренхіми мозку обмежує проникнення терапевтичних засобів тільки невеликими ділянками, що оточують сайт ін'єкції/імплантації. Правильне розміщення ін'єкцій, катетерів і імплантатів є складною задачею, при цьому має вирішальне значення для досягнення дифузії лікарського засобу в область-

мішень мозку. Крім того, катетери та імпланти надають сайт для розвитку інфекції і/або імунної відповіді проти чужорідного матеріалу.

В іншій спробі збільшити доставку через ГЕБ ліків для ЦНС були модифіковані з метою збільшення їх захоплення мозком. Такі модифікації можуть включати в себе зміну їх поверхневого заряду, зменшення розміру молекули, а також зміну ліпофільності лікарських засобів. Проте, будь-які зміни для збільшення проникнення в мозок також можуть змінити загальну фармакологію лікарського засобу, в тому числі його бажану активність і/або специфічність. Крім того, ліпофільні молекули більш схильні до виведення з мозку через Р-глікопротеїновий еффлоксний насос.

Нарешті, були розроблені ендogenous механізми транспорту через ГЕБ. Фізіологічні механізми, що дозволяють перенесення великих молекул через ГЕБ, можуть бути розділені на високо специфічний рецепторно-опосередкований трансцитоз (RMT) і неспецифічний трансцитоз, опосередкований адсорбцією на основі заряду. Ендоцитоз ініціюється при зв'язуванні специфічного ліганду з його рецептором або при електростатичній взаємодії між катіонних лігандом або лікарським засобом і аніонними функціональними групами на поверхні ендотеліальних клітин мозку (на люмінальному боці), відповідно. Згодом, знову сформовані ендосоми піддаються трансцитозу через клітину до аблюмінального боку для вивільнення вантажу.

Оскільки трансцитоз, опосередкований адсорбції, є неспецифічним зарядо-опосередкованою взаємодією, він відбувається у всіх судинних руслах і органах, що обмежує доступність лікарського засобу для доставки в мозок. Тому використання RMT шляху залишається єдиним фізіологічним, неінвазивним, при цьому високо рецепторно-специфічним способом доставки в мозок.

В даний час відомі лише деякі рецептори, які піддаються RMT в ГЕБ і "переносять" через нього свої природні ліганди: добре вивчений рецептор трансферину (TFR), інсуліновий рецептор (IR), білки 1 і 2, зв'язані з рецепторами ліпопротеїнів низької щільності (LRP-1 і -2), рецептор дифтерійного токсину і TMR30A. Були розроблені пептиди, природні ліганди і антитіла або фрагменти антитіл, які зв'язуються з цими рецепторами (Pardridge et al., 1991; Yu et al., 2011 року; Muruganandam et al., 2001; Abulrob et al., 2005; Demeule, 2008; Sumbria et al., 2013), які функціонують в якості переносників лікарських засобів в мозок, використовуючи ендogenous RMT шляху. Проте, на сьогоднішній день тільки один пептид (Angioper ANG1005, таргетуючий LRP-1) був проаналізований на фазі І клінічних досліджень, в той час як інші кандидати вивчаються в лабораторних умовах. RMT шлях представляється найбільш перспективним шляхом для транспорту лікарського засобу в мозок, але в даний час підходять мають обмеження, включаючи: неселективну експресію рецептора-мішені на ГЕБ, конкуренції між переносником і природними лігандами за рецептор, неефективний трансцитозу рецептора, а також лізосомальну деградацію ендочитозированих переносників (Xiao and Gun, 2013).

Відсутність високої продуктивності і високої селективності переносників через ГЕБ затримує розробку нових терапевтичних і діагностичних засобів для захворювань, що відбуваються в мозку, в тому числі пухлин мозку і нейродегенеративних захворювань. Існує явна необхідність в неінвазивному способі доставки дрібних і великих терапевтичних і діагностичних молекул в фармакологічно ефективних дозах в мозок без порушення фізіології і гомеостазу ГЕБ.

Короткий опис винаходу

Даний винахід відноситься до антитіл, що специфічні до рецептору інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF1R), і їх застосуванням. Більш конкретно, даний винахід відноситься до антитіл, специфічних до рецептору інсуліноподібного фактору росту 1, і їх фрагментів, які проходять гематоенцефалічний бар'єр, і їх застосуванням.

Даний винахід відноситься до виділених або очищених антитіл або їх фрагментів, що специфічно зв'язуються з епітопом рецептору інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF1R), де антитіло або його фрагмент, проходить гематоенцефалічний бар'єр, і де епітоп специфічно зв'язується з антитілом з послідовністю SEQ ID NO: 5. Епітоп IGF1R може перебувати у позаклітинному домені IGF1R.

Даний винахід відноситься до виділених або очищених антитілам або їх фрагментів, що містять

- послідовність галузі, яка визначає компліментарність (CDR) 1 GGTVSPTA (SEQ ID NO: 1);
- послідовність CDR2 ITWSRGTT (SEQ ID NO: 2); і
- послідовність CDR3 AASTFLRLPEESAYTY (SEQ ID NO: 3),

де зазначене антитіло або його фрагмент специфічно зв'язується з рецептором інсуліноподібний фактор росту 1 (IGF1R).

Наприклад, не в рамках будь-якого обмеження, виділеним або очищеним антитілом або його фрагментом, специфічним до IGF1R, може бути

X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCX₅X₆SGGTVSPTAMGWX₇RQAPGKX₈X₉EX₁₀VX₁₁HITWSR GTTR

5 X₁₂ASSVKX₁₃RFTISRDX₁₄X₁₅KNTX₁₆YLQMNSLX₁₇X₁₈EDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGTX₁₉VTVSS (SEQ ID NO:4), де X₁ є E або Q; X₂ є K або Q; X₃ є V або E; X₄ є A або P; X₅ є A або E; X₆ є V або A; X₇ є V або F; X₈ є G або E; X₉ є L або R; X₁₀ є F або W; X₁₁ є G або S; X₁₂ є V або Y; X₁₃ є D або G; X₁₄ є N або S; X₁₅ є A або S; X₁₆ є L або V; X₁₇ є K або R; X₁₈ є A або S; i X₁₉ є L або Q, або послідовність, що по суті ідентична їй. У більш конкретних не обмежуючих прикладах

10 виділені або очищені антитіла можуть містити послідовність, обрану з групи, що складається з:
QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFVGHITWSRGTTTRVASS VKDRFTISRDSAKNTVYLQMNSLKSSED TAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5), зазначається тут як IGF1R-4;

15 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWVRQAPGKGLEWVGHITWSRGTTTRYAS SVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:6), зазначається тут як IGF1R-4_H2;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRGTTTRYASS VKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:7), зазначається тут як IGF1R-4_H3;

20 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRGTTTRYASS VKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:8), зазначається тут як IGF1R-4_H4;

25 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFVGHITWSRGTTTRYAS SVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:9), зазначається тут як IGF1R-4_H5; i

або послідовність, по суті ідентичну їм.

Виділене або очищене антитіло або його фрагмент, як описано вище, може бути одноклоновим антитілом (sdAb); sdAb можуть мати верблуже походження.

30 Виділене або очищене антитіло або його фрагмент в рамках даного винаходу можуть бути представлені в форматі мультівалентного відображення. У форматі мультівалентного відображення антитіло або його фрагмент можуть бути зв'язані з фрагментом Fc; фрагмент Fc є мишачим Fc2b або людським Fc1. Наприклад, не в рамках будь-якого обмеження, виділену чи очищене антитіло або його фрагмент в мультівалентному відображенні можуть містити послідовність SEQ ID NO: 10 (зазначену тут як злиття IGF1R-4 консенсус-Fc), SEQ ID NO: 39 (зазначену тут як злиття Fc-IGF1R-4 консенсус) або 11 (зазначену тут як злиття IGF1R-4-Fc).

35 Виділене або очищене антитіло або його фрагмент, як описано в даному документі, можуть проходити через гематоенцефалічний бар'єр.

40 Даний винахід також відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, що кодує виділене чи очищене антитіло або його фрагмент, як описано в цьому документі. Вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, як описано вище, також запропонований.

Виділене або очищене антитіло або його фрагмент, як описано в цьому документі, можуть бути іммобілізовані на поверхню.

45 Даний винахід додатково відноситься до виділеного або очищеного антитіла або його фрагменту, як описано в даному документі, зв'язаному з молекулою вантажу; молекула вантажу може мати молекулярну масу в діапазоні від приблизно 1 кДа до приблизно 200 кДа. Молекулою вантажу, що зв'язана з антитілом або його фрагментом, може бути, агент, що детектується, терапевтичний, лікарський засіб, пептид, фактор росту, цитокіни, пастка рецептора, хімічна сполука, вуглеводний фрагмент, фермент, антитіло або його фрагменти, молекули на основі ДНК, вірусний вектор або цитотоксичний агент; одна або кілька ліпосом або

50 наноносіїв, завантажених детектуючим агентом, терапевтичним, лікарським засобом, пептидом, ферментом, антитілом або його фрагментом, молекулою на основі ДНК, вірусним вектором або цитотоксическим агентом; або одна або кілька наночастинок, нанопроводів, нанотрубок або квантових точок.

Крім того, даний винахід відноситься до композиції, що містить одне або більше ніж одне

55 виділене або очищене антитіло або його фрагмент, як описано в даному документі, і фармацевтично прийнятний носій, розчинник або наповнювач.

Також запропонований спосіб детектування IGF1R in vitro, причому спосіб включає

60 а) контактування зразка тканини з одним або більше ніж одним виділеним або очищеним антитілом або його фрагментом, як описано в даному документі, зв'язаним з детектуючим агентом; i

б) детектування детектуючого агента, зв'язаного з антитілом або його фрагментом, зв'язаних з IGF1R, в зразку тканини.

У способі, описаному вище, зразком може бути зразком сироватки, зразком судинної тканини, зразком пухлинної тканини або зразком тканини мозку з людського або тваринного суб'єкта. У способі, описаному вище, стадія детектування (стадія б)) може бути здійснена за допомогою оптичної візуалізації, імуногістохімії, молекулярної діагностичної візуалізації, ELISA (імуно-ферментного аналізу), візуалізуючої мас-спектрометрії або іншого відповідного способу.

Нижче наведено спосіб детектування експресії IGF1R in vivo у суб'єкта, причому зазначений спосіб включає:

а) введення одного або більше ніж одного виділеного або очищеного антитіла або його фрагменту, як описано в даному документі, зв'язаного з детектуючим агентом, суб'єкту; і

б) детектування детектуючого агента, зв'язаного з антитілом або його фрагментом, зв'язаним з IGF1R.

У способі, описаному вище, стадія детектування (стадія б)) може бути здійснена з використанням PET (позитронно-емісійної томографії), SPECT (однофотонної емісійної комп'ютерної томографії), флуоресцентної візуалізації або будь-якого іншого відповідного способу.

Запропонований спосіб перенесення представляє інтерес молекули через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ), причому спосіб включає:

а) введення одного або більше ніж одного виділеного або очищеного антитіла або його фрагменту, як описано в даному документі, зв'язаного з молекулою, що представляє інтерес, суб'єкту, де антитіло або його фрагмент проходить через гематоенцефалічний бар'єр,

де одне або більше ніж одне антитіло або його фрагмент переносить молекулу, що представляє інтерес через ГЕБ. У способі, як описано вище, молекула, що представляє інтерес може мати молекулярну масу в діапазоні від приблизно 1 кДа до приблизно 200 кДа; молекулою, що представляє інтерес може бути агент, що детектується, терапевтичний, лікарський засіб, пептид, фактор росту, цитокіни, пастка рецептора, хімічна сполука, вуглеводний фрагмент, фермент, антитіло або його фрагмент, молекула на основі ДНК, вірусний вектор або цитотоксичний агент; одна або кілька ліпосом або наноносіїв, завантажених детектуючим агентом, терапевтичним, лікарським засобом, пептидом, ферментом, антитілом або його фрагментом, молекулою на основі ДНК, вірусним вектором або цитотоксическим агентом; або одна або кілька наночастинок, нанопроводів, нанотрубок або квантових точок. В описаному способі введення може бути внутрішньовенним (iv), підшкірним (sc) або внутрішньом'язовим (im).

Винахід також охоплює спосіб визначення кількості молекули вантажу, що доставляється через ГЕБ суб'єкта, де молекула вантажу зв'язана з одним або більше ніж одним виділеним або очищеним антитілом або його фрагментом, як описано в даному документі, причому спосіб включає

а) збір спинномозкової рідини (СМР) від суб'єкта; і

б) використання цільових методів протеоміки для визначення кількості молекули вантажу, зв'язаної з одним або більше ніж одним виділеним або очищеним антитілом або фрагментом, в спинномозковій рідині.

Молекула вантажу може бути будь-якої бажаної молекулою, включаючи молекули вантажу вищезазначеного; антитіло або його фрагмент проходять через ГЕБ; молекула може бути "зв'язана" з антитілом або його фрагментом, як описано раніше. В описаному вище способі СМР беруть у суб'єкта з використанням будь-якого відповідного способу, відомого в даній галузі. Кількість СМР, необхідне для цільового методу протеоміки на стадії б), може перебувати в діапазоні від приблизно 1 до 10 мкл. Цільові методи протеоміки, використовувані для визначення кількості одного або більше ніж одного антитіла або його фрагменту, зв'язаного з молекулою вантажу, можуть бути будь-якими відповідними методами, відомим в даній галузі техніки. Наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, цільовий метод протеоміки може бути методом мас-спектрометрії, таким як моніторинг множинних реакцій - ізотіпічески мічені внутрішні стандарти (MRM - ILIS).

Погана доставка діагностичних або лікарських засобів через щільний і високо селективний ГЕБ компрометує розвиток способів лікування захворювань мозку, таких як, але не обмежуючись зазначеним, пухлин мозку і нейродегенеративних захворювань. Відсутність переносників для транспортування молекул через ГЕБ затримує розробку нових терапевтичних і діагностичних засобів для таких захворювань. Як описано в даному документі, був спродукований IGF1R-зв'язуючий V_HH (варіабельний домен важкого ланцюга верблужих), який забезпечує ефективну транспортну платформу для доставки лікарських засобів, кон'югованих з

антитілом, через ГЕБ до їх мішеней в мозку. Описане в даному документі антитіло використовує природний RMT шлях IGF1R від люмінальної до аблюмінальної боку ендотеліальних клітин мозку, що утворюють ГЕБ. Після зв'язування антитіла з IGF1R ініціюється RMT і антитіло разом з кон'югованими молекулами (вантажем) піддається трансцитозу через клітку до аблюмінальної

5 боку, де вони обидва випускаються в мікросередовище мозку. Підтверджено, що анти-IGF1R V_HH зв'язується з IGF1R (Фіг. 3 С), поглинається клітинами ГЕБ (Фіг. 4) і переходить на аблюмінальний бік в моделі ГЕБ *in vitro* (Фіг. 6 В). Дослідження доставки лікарського засобу до мозку *in vivo* показали також, що IGF1R V_HH "переносив" кон'югований пептид (Галанін, приблизно 3 кДа), а також великий злитий білок (приблизно 80 кДа) через ГЕБ (Фіг. 9 А та В; Фіг. 9 С).

Результати також показують, що анти-IGF1R V_HH може експресуватися в злитті з Fc фрагментом (фрагмент, що кристалізується), щоб пролонгувати циркуляційний період напіввиведення приблизно в 75 рази (приблизно 25 годин в порівнянні з приблизно 20 хв для V_HH окремо). Даний злитий конструкт з високою молекулярною масою (приблизно 80 кДа) також ефективно може транспортуватися через ГЕБ. Тривалий період напіввиведення з плазми значно збільшує СМР вплив кон'югату IGF1R V_HH-mFc (mFc = мишачий Fc) в порівнянні тільки з V_HH і робить його корисним в якості переносників через ГЕБ для лікування хронічних захворювань з мішенями у ЦНС. Кон'югат легко виявляється в паренхімі мозку з використанням імуно-флюоресцентного детектування. Результати показують, що переносник IGF1R V_HH може

15 "переносити" великі молекули (аналогічні за розміром: антитіл, ферментів, факторів росту, пептидів, цитокінів, пасток рецепторів) через ГЕБ.

Таким чином, антитіло-опосередкована доставка може бути не тільки корисною для короткострокового лікування (наприклад епілептичного нападу), але також може бути корисна для середньострокового (наприклад раку) і довгострокового (наприклад хвороби Альцгеймера або хвороби Паркінсона) лікування.

Додаткові аспекти та переваги даного винаходу будуть очевидні в світлі наступного опису. Детальні описи і приклади, які демонструють кращі варіанти здійснення винаходу, даються тільки в якості ілюстрації, оскільки різні зміни і модифікації в межах обсягу даного винаходу стануть очевидними для фахівців в даній галузі техніки в світлі ідей цього винаходу.

Короткий опис креслень

Ці та інші ознаки винаходу будуть тепер описані за допомогою прикладу, з посиланням на прикладені креслення, на яких:

На Фіг. 1 представлена схема рецептору інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF1R). IGF1R знаходиться на поверхні клітини і містить дві субодиниці: альфа-субодиницю і бета-субодиницю. Альфа-субодиниця (містить позаклітинну частину з сайтом зв'язування з інсуліноподобним фактором росту 1) зв'язана дисульфідним зв'язком з бета-субодиницею (містить невеликий позаклітинний домен, трансмембранний участок і внутрішньоклітинну частину). Рецептор IGF1 може утворювати димер. Фрагмент довжиною в 933 амінокислоти, що містить альфа-субодиницю і позаклітинну частину бета-субодиниці, як зазначено в сірому полі,

35 (M1-F933, інвентарний № SwissProt P08069, см Фіг. 2) був рекомбінантно продукований і використаний для імунізації лами.

На Фіг. 2 показана послідовність IGF1R (інвентарний № SwissProt P08069). Білковий фрагмент довжиною в 933 амінокислоти, використовуваний для імунізації і пеннінга, показаний жирним шрифтом; повний ектодомен на 2 амінокислоти довше. Сайт розщеплення фурином, що розділяє альфа і бета субодиниці, показаний малими літерами курсивом. Сигнальний пептид виділено жирним курсивом.

На Фіг. 3 А зображено ексклюзійну хроматограму IGF1R-зв'язуючого V_HH IGF1R-4 і його гуманізованих варіантів (H1, H2, H3, H4, H5, H6), пропущених через колонку з Superdex 75. Профіль передбачає, що всі V_HH крім IGF1R H1 мономірні і не агреговані. Фіг. 3 В зображує температуру плавлення (T_m), визначену за допомогою кругового дихроїзму (CD) для IGF1R-4 V_HH і його гуманізованих варіантів (H2, H3, H4, H5, H6). Білки нагрівали до температури вище 90 °C і вимірювання проводили в CD пристрої, щоб визначити криву плавлення (верхня крива) і T_m. Згодом білки охолоджували до кімнатної температури, нагрівали ще раз і аналізували за допомогою CD (нижня крива для IGF1R-4 V_HH; лінія або точки приблизно 0 % рефолдингу для гуманізованих варіантів). Це дозволило визначити частку рефолдингу білка, яка становила нуль для гуманізованих версій і 80 % для IGF1R-4. Фіг. 3С зображує перекривання сенсограмми поверхневого плазмонного резонансу (SPR) для зв'язування 0,1-5 нМ IGF1R-4 V_HH і його гуманізованих варіантів (H2, H3, H4, H5, H6) з рекомбінантною позаклітинною частиною фрагменту людського IGF1R. Ці дані добре підходять до моделі 1:1. Фіг. 3 D показує сенсограмми SPR зв'язування IGF1R-4 V_HH з рекомбінантною позаклітинною частиною фрагменту

людського IGF1R в присутності IGF1. IGF1 в 100-кратному надлишку не впливає на зв'язування IGF1R-4 V_HH, що демонструє, що вони обидва зв'язуються з різними епітопами на рецепторі. Фіг. 3Е зображує, що IGF1R-4 V_HH не зв'язується з рекомбінантною позаклітинною частиною людського інсулінового рецептору (IR), іммобілізованого на SPR поверхні, в той час як він зв'язується з контрольною поверхнею людського IGF1R.

На Фіг. 4 зображені результати візуалізації захоплення клітин Су-5.5-міченого IGF1R-4 V_HH і контрольного V_HH. Су5.5-мічений IGF1R-4 V_HH (або FC5 V_HH в якості позитивного контроль, Muruganandam et al., 2002; Haqqani et al., 2012) інкубували з SV40 імморталізованих щурячими ендотеліальними клітинами мозку (svARBEC) при температурі 4 °C (верхні блоки) або при 37 °C (нижні блоки) для оцінки того, чи поглинається IGF1R-4 пасивно (4 °C) або за допомогою активних механізмів (37 °C), таких, як рецепторно-опосередкований ендоцитоз. Спільне фарбування агглютинином зародків пшениці і DAPI (4',6-діамідинів-2-феніліндол) проводили для візуалізації поверхні клітини і ядра, відповідно. Верхній блок: при інкубації при 4 °C IGF1R-4 і FC5 V_HH були виявлені поза клітинами (стрілки), зв'язані з клітинною мембраною (солокалізуються з агглютинином зародків пшениці). Нижній блок: при 37 °C і FC5 і IGF1R-4 V_HH накопичувалися всередині клітин в структурах, подібних везикули (стрілки), ймовірно ендосомаїв, що передбачає поглинання за допомогою механізму активного транспорту.

На Фіг. 5 А зображено послідовність С-кінцевого злиття IGF1R-4 V_HH з мишачим фрагментом Fc (IGF1R-4-mFc). Схематичне зображення зібраного злитого білка зображено на Фіг. 5 В. IGF1R-4 V_HH зображений чорним кольором і мишачий Fc (CH2 і CH3) зображений сірим кольором на Фіг. 5 А і В.

На Фіг. 6 А зображено блок-схема, яка узагальнює використання моделі ГЕБ in vitro для оцінки здатності різних V_HH долати гематоенцефалічний бар'єр. Еквімолярні кількості (5,6 мкМ або 1,25 мкМ) позитивного (FC5) і негативного контролю (A20.1, з Clostridium difficile токсин А-зв'язуючий V_HH; і EG2, EGFR (рецептор епідермального фактору росту) - зв'язуючий V_HH) V_HH і IGF1R-3 тестували одночасно на їх здатність перетинати щурячу модель ГЕБ. SV40-імморталізованих ендотеліальні клітини мозку дорослого щура (svARBEC) вирощували в моношарі на мембрані вставки в присутності щурячої астроцитарного-кондиційованого середовища в нижній камері і стандартного середовища у верхній камері. Після спільного додавання еквімолярних кількостей різних V_HH на люмінальний бік моделі ГЕБ, зразки були взяті з нижньої камери через 15, 30 і 60 хв. Концентрація кожного V_HH потім кількісно вимірювалися за допомогою мас-спектрометрії (моніторинг множинних реакцій - ізотіпічески мічені внутрішні стандарти; MRM-ILIS) в цих зразках. Значення P_{app} [Qr/DT = загальна кількість в приймальному відділенні в залежності від часу; A = площа моношару клітин; C0 = початкова концентрація дозованого розчину] зазвичай використовується для визначення здатності молекули до перетину гематоенцефалічного бар'єру. На Фіг. 6 В наведені значення P_{app} з чотирьох спільно введених V_HH. IGF1R-4 має значно більше значення P_{app} , ніж FC5, в той час як негативні контроли мають дуже низькі значення P_{app} , що вказує на полегшений перенос FC5 і IGF1R-4 V_HH в порівнянні з дуже низьким неспецифічним транспортом або парацеллюлярним транспортом контрольних V_HH. Результати представляють собою середні значення P_{app} , отримані в 5-6 незалежних експериментах. Фіг. 6 З зображує значення P_{app} гуманізованих IGF1R-4 однодомених антитіл (H2, H3, H4, H5, H6) (чорні стовпчики) в порівнянні з A20.1 V_HH (сірі стовпчики), які були протестовані в якості контролю в тій же лунці (середнє значення A20.1 позначається сірою пунктирною лінією). Результат чітко демонструє, що простого зв'язування IGF1R (як це спостерігається для гуманізованого варіанту 6 (H6)) недостатньо для запуску проходження через ГЕБ. Фіг. 6 D зображує значення P_{app} С-термінального злиття IGF1R-4 V_HH з мишачим Fc (чорний) в порівнянні з A20.1-мишачий Fc (A20.1mFc) (сірий), яке було протестовано в тій же ополонці і мало дуже низьке значення P_{app} . IGF1R-4-mFc має істотно більш високе значення P_{app} , ніж FC5-mFc (зазвичай приблизно 180 см/хв, як зображено сірою пунктирною лінією). Інший IGF1R-зв'язуючий V_HH, IGF1R-1 в злитті з Fc має лише несуттєво більш високе значення P_{app} , ніж внутрішній негативний контроль A20.1 V_HH. Даний результат також демонструє, що не всі IGF1R-зв'язуючі антитіла проходять через ГЕБ. Дані далі показують, що IGF1R-4-mFc має аналогічну високу швидкість транспорту через ГЕБ у порівнянні з моновалентний IGF1R-4 V_HH. Результати представляють собою середні значення P_{app} , отримані в 3-6 незалежних експериментах. Середні значення P_{app} FC5 (V_HH) і A20.1 (V_HH) також позначені пунктирними лініями для порівняння.

Фіг. 7 (верхні блоки) зображує зображення всього тіла in vivo CD-1 мишей, яким вводили внутрішньовенно PBS (натрій-фосфатний буфер) (інтактна) або 2,5 мг/кг Су5.5-IGF1R-4 V_HH або Су5.5-A20.1 V_HH (схематично введені молекули показані зверху) і сканували на просторово-часовому оптичному візуалізаторі eXplore Optix через 30 хв після ін'єкції. Нижні блоки показують

ex-vivo зображення мозку тих же тварин, отримані через 1 год. після ін'єкції $V_{\text{H}}\text{H}$ і після транскардіальної перфузії для видалення антитіл з крові. Стрілки вказують на високий оптичний сигнал (світло-сірий) флуоресцентного індикатора в голові і в ex-vivo головному мозку у тварині, якій вводили Cy5.5-IGF1R-4, тоді як у тварині, якій вводили контроль Cy5.5-A20.1 (чорний) він не може бути виявлений.

На Фіг. 8 А зображена схема хімічного синтезу кон'югату IGF1R-4 $V_{\text{H}}\text{H}$ -Галанін. IGF1R-4 спочатку кон'юговали з групою NHS сульфо-SMCC (сульфосукцинімідил-4 (N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилат) кросс-линкера (1); потім малеїмідом-активованій IGF1R-4-сульфо-SMCC кон'юговали з відновленим цистеїном Галаніну (2). На Фіг. 8 В зображений IGF1R-4 (доріжка 2), IGF1R-4-SMCC (доріжка 3) і кон'югат IGF1R-4-Галанін (доріжка 4) в SDS-PAGE гелі (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію). Характер "смуг" вказує на приєднання 1-2 молекул Галаніну на IGF1R-4. Такі ж способи кон'югування були використані для зв'язування Галаніну з IGF1R-mFc.

На Фіг. 9 зображена IGF1R-5-опосередкована доставка в мозок хімічно кон'югованого пептиду Галаніна. На Фіг. 9 А представлений графік, що демонструє здатність IGF1R-4 доставляти фармакологічно ефективні дози анальгетического пептиду Галаніну (3,2 кДа) в мозок з використанням больової моделі Харгрівса. У цій моделі локалізований хронічний біль індукують у самців щурів лінії Wistar (4-6 тижневого віку) шляхом введення 100 мкл повного ад'юванта Фройнда (CFA) в поверхню лівої стопи, викликаючи тим самим протягом декількох годин місцеве запалення. Після ін'єкції в хвостову вену ГЕБ-переносника кон'югату $V_{\text{H}}\text{H}$ -лікарський засіб або тільки Галаніну, щурів поміщають в плексигласові шафи, встановлені на поверхні скла. Тепловий подразник орієнтований на запалену або контралатеральну лапу за допомогою кутового дзеркала. Затримка між застосуванням подразника і реакцією лапи (облизування або помах лапою) інтерпретується як міра анальгетичного ефекту (пригнічення теплової гіперальгезії). Пептид Галанін сам по собі не може проникати через ГЕБ, про що свідчить відсутність анальгетичного ефекту після системної (в хвостову вену) ін'єкції 1 мг/кг Галаніну (суцільні чорні трикутники). Системне введення кон'югату IGF1R-4-Галанін (3 мг/кг) пригнічує теплову гіперальгезію, досягаючи максимального ефекту через 30 хв після введення (суцільні чорні кола); ефект був більш тривалим, ніж ефект, що спостерігається після введення 6 мг/кг кон'югату FC5-Галанін (білі відкриті квадрати). Фіг. 9 В зображує дані результати у вигляді площі під кривою (AUC) відповіді в порівнянні з максимально можливим ефектом (MPE, контрольна лапа). На Фіг. 9 С зображено дозозалежне (2 мг/кг і 5 мг/кг) інгібування теплової гіперальгезії в моделі Харгрівса запальної болю за допомогою кон'югату IGF1R-4-mFc-Галанін, введеного iv. Навпаки, A20.1-mFc-Галанін (5 мг/кг) не викликав будь-якого пригнічення теплової гіперальгезії. На Фіг. 9 D зображено відсоток інгібування теплової гіперальгезії (Emax) на піку відповіді, досягнутого різними дозами A20.1-mFc-Галаніна і IGF1R-4-mFc-Галаніна.

На Фіг. 10 зображені рівні IGF1R-4-mFc в плазмі та CMP і "позитивний" контроль $V_{\text{H}}\text{H}$, FC5 і "негативний" контроль $V_{\text{H}}\text{H}$ A 20.1 через 30 хв після системного (в хвостову вену) спільного введення 6 мг/кг кожного антитіла. CMP збирали з мостомозжечкової цистерни. Рівні IGF1R-4, FC5 і A 20.1 в плазмі та CMP визначали за допомогою методу MRM-ILIS, який "відстежує" і кількісно визначає специфічні білкові пептидні сигнатури. Рівні альбуміну в CMP були одночасно визначені MRM. Всі зразки CMP, що мають співвідношення плазми/CMP нижче 1500, були виключені як потенційно забруднені кров'ю. Співвідношення плазми/CMP становило 1,2 % для IGF1R-4 в порівнянні з 0,9 % для FC5 і 0,017 % для A 20.1.

На Фіг. 11 зображено імунодетектування IGF1R-4mFc в секціях мозку через 24 годин після введення в хвостову вену дози 6 мг/кг. Перфузії з PBS проводили на щурах і секції мозку (12 мкм) були отримані з використанням вібратора. IGF1R-4mFc був імунодетектований з використанням анти-мишачого Fc антитіла (червоний, червоний канал показаний тільки на вставках). Кровоносні судини в секції мозку (дорсальний стріатум, А, лобова кора головного мозку, В) були детектовані з використанням лектина RCA1 (агглютинин Ricinus Communis 1) (зелений). IGF1R-4mFc може бути детектований як в обох судинах, так і поза судинами (тобто в паренхімі головного мозку, перенесений через ГЕБ), як зображено стрілками.

На Фіг. 12 зображено, що IGF1R-4 не перетинається з інсуліновою або IGF1 передачею сигналу через інсуліновий рецептор або IGF1R. Фіг. 12 А являє собою характерну картину Вестерн блотингу, що демонструє, що ні IGF1R-4, ні будь-які з інших протестованих анти-IGF1R $V_{\text{H}}\text{H}$ (IGF1R-1, -3, -5 або -6) не індукують фосфорилування протеїнкінази В в прямому напрямку окремо при 100 нМ концентрації. Також присутність 100 нМ IGF1R-4 або будь-якого з інших анти-IGF1R $V_{\text{H}}\text{H}$ не пригнічує фосфорилування протеїнкінази В, індуковане 10 мкг/мл інсуліну. Кількісне визначення щільності смуг Вестерн блотингу з 3 незалежних експериментів зображено на гістограмі (середнє \pm SD (стандартне відхилення)) під зображенням гелю. На Фіг. 12 В

представлена характерна картина Вестерн блотингу, що показує, що ні IGF1R-4, ні будь-які інші протестовані анти-IGF1R V_HH (IGF1R-3, -5 або -6) при 100 нМ не індують фосфорилування протеїнкінази В самі по собі і не пригнічують IGF-1 індукване фосфорилування протеїнкінази В (тобто передачу сигналу), викликане стимуляцією 200 нг/мл IGF-1. Кількісне визначення щільності смуг Вестерн блот з 3 незалежних експериментів показано на гістограмі (середнє +/- SD) під зображенням гелю. Фіг. 12 С зображує Вестерн блотинги фосфорильованих IGF1R. Клітини інкубували або з 100 нМ або 500 нМ IGF1R-4-mFc, або будь-яким іншим анти-IGF1R V_HH-mFc злиттям (IGF1R-1, -3 або -4 mFc) окремо або стимулювали 200 нг/мл IGF-1 в присутності відповідних злитих білків IGF1R-V_HH-mFc. Вестерн блотинги показують, що жоден з злитих конструктів не інгібував IGF-1 індукване фосфорилування IGF1R і не індуквав фосфорилування рецептора сам по собі.

Детальний опис винаходу

Даний винахід відноситься до антитіл, специфічних до рецептора інсуліноподібного фактору росту 1, їх фрагментам, а також їх застосуванням. Більш конкретно, даний винахід відноситься до антитіл, специфічних до рецептора інсуліноподібного фактору росту 1 і фрагментам, які проходять гематоенцефалічний бар'єр, і їх застосуванням.

Даний винахід відноситься до виділених або очищених антитіл або їх фрагментів, специфічно зв'язується з епітопом рецептора інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF1R), причому антитіло або його фрагмент переноситься через гематоенцефалічний бар'єр, і епітоп специфічно зв'язується з антитілом з послідовністю SEQ ID NO: 5. Епітоп IGF1R може перебувати у позаклітинному домені IGF1R.

Даний винахід відноситься до виділених або очищених антитіл або їх фрагментів, що містить

- послідовність області, яка визначає компліментарність (CDR) 1 GGTVSPTA (SEQ ID NO: 1);
- послідовність CDR2 ITWSRGTT (SEQ ID NO:2); і
- послідовність CDR3 AASTFLRILPEESAYTY (SEQ ID NO:3),

де антитіло або його фрагмент специфічно зв'язується з рецептором інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF1R).

Термін "антитіло", також званий в даній галузі "імуноглобулін" (Ig), який використовується в даному документі, відноситься до білка, який було збудовано з спарених важких і легких поліпептидних ланцюгів; існують різні ізотипи Ig, включаючи IgA, IgD, IgE, IgG і IgM. Коли антитіло складено правильно, кожен ланцюг укладається в деяку кількість окремих глобулярних доменів, з'єднаних більш лінійними поліпептидними послідовностями. Наприклад, легкий ланцюг імуноглобуліну укладається в варіабельний (VL) і константний (CL) домен, в той час як важкий ланцюг укладається в варіабельний (VH) і три константних (CH, CH2, CH3) домену. Взаємодія варіабельних доменів важкого і легкого ланцюга (VH і VL) призводить до утворення області зв'язування антигену (Fv). Кожен домен має усталену структуру, знайому фахівцям в даній галузі техніки.

Варіабельні області легкого і важкого ланцюга відповідають за зв'язування антигену-мішені і, відтак, можуть демонструвати значну різноманітність послідовностей у різних антитіл. Константні області демонструють меншу різноманітність послідовностей і відповідають за зв'язування ряду природних білків для виявлення важливих біохімічних подій. Варіабельна область антитіла містить антиген-зв'язуючі детермінанти молекули і, таким чином, визначає специфічність антитіла до його антигену-мішені. Велика частина відмінностей послідовностей зв'язана з шістьма гіперваріабельними областями, по три в варіабельних областях важкого (VH) і легкого (VL) ланцюга; гіперваріабельні області об'єднуються для формування антиген-зв'язуючого сайту і вносять свій внесок в зв'язування і впізнавання антигенної детермінанти. Специфічність і афінність антитіла до його антигену визначається структурою гіперваріабельних областей, а також їх розміром, формою і хімією поверхні, яку вони представляють антигену. Існують різні схеми для ідентифікації областей гіперваріабельності, двома найбільш поширеними з яких є зазначені у Kabat і Chothia and Lesk. Kabat et al (1991), що визначають "області, що визначають комплементарність" (CDR) на основі варіабельності послідовності в антиген-зв'язуючих областях доменів VH і VL. Chothia і Lesk (1987) визначають "гіперваріабельні петлі" (H або L) на основі розташування областей структурної петлі в доменах VH і VL. Оскільки дані індивідуальні схеми визначають CDR і області гіперваріабельної петлі, які є суміжними або перекриваються, фахівці в даній області техніки, що стосується антитіл, часто використовують терміни "CDR" і "Гіперваріабельна петля" взаємозамінні, і вони можуть бути так використані в даному документі. CDR/петлі називаються тут відповідно до більш пізньої системою нумерації IMGT (Lefranc, M.-P. et al., 2003), яка була розроблена для спрощення порівняння варіабельних доменів. У цій системі консервативні амінокислоти (такі як Cys23,

Trp41, Cys104, Phe/Trp118 і гідрофобний залишок в позиції 89) завжди мають ту ж позицію. Крім того, забезпечується стандартизоване розмежування каркасних областей (FR1: позиції від 1 до 26; FR2: від 39 до 55; FR3: від 66 до 104; і FR4: 118 до 129) і CDR (CDR1: 27 до 38, CDR2: 56 до 65; і CDR3: від 105 до 117).

5 "Фрагмент антитіла", згадуваний тут, може включати в себе будь-який відповідний антиген-зв'язуючий фрагмент антитіла, відомий в даній області. Фрагмент антитіла може бути фрагментом природного антитіла або може бути отриманий шляхом обробки природних антитіл або за допомогою рекомбінантних способів. Наприклад, фрагмент антитіла може включати в себе, але не обмежується зазначеним, Fv, одноклановий Fv (ScFv, молекула, що складається з VH і VL, зв'язаних пептидним лінкером), Fab, F (ab')₂, одноклановий антитіло (sdAb; фрагмент, що складається з одного VH або VL), і мультівалентні презентації будь-якого з них. Фрагменти антитіл, такі як тільки що описані, можуть вимагати лінкерних послідовностей, дисульфідних зв'язків або інший тип ковалентного зв'язку для зв'язування різних частин фрагментів; фахівці в даній галузі техніки знайомі з вимогами різних типів фрагментів і різними підходами до їх побудови.

15 У необмеженому прикладі фрагмент антитіла може бути sdAb, отриманим з природних джерел. Важкі ланцюги антитіл верблюжого походження (Hamers-Casterman et al, 1993) не мають легких ланцюгів і, відтак, їх антиген-зв'язуючі сайти складаються з одного домену, званого V^HH. sdAb також спостерігається у акул і називається VNAR (Nuttall et al, 2003). Інша sdAb може бути сконструйовано на основі важкого і легкого ланцюга людського Ig (Jespers et al, 2004; To et al, 2005). Використовуваний в даному описі термін "sdAb" включає sdAb, безпосередньо виділені з джерела VH, V^HH, VL, АБО VNAR будь-якого походження за допомогою фагового відображення або інших технологій, sdAb, отримані з вищезазначених sdAb, рекомбінантні sdAb, а також sdAb, що генеруються за допомогою подальшої модифікації таких sdAb гуманізацією, дозріванням афінності, стабілізацією, солюбілізацією, верблюдізацією або іншими способами інженерії антитіл. Також охоплюються цим винаходом гомологи, похідні або фрагменти, які зберігають антиген-що зв'язує функцію і специфічність sdAb.

30 SdAb володіють необхідними властивостями для молекул антитіл, такими як висока термостабільність, висока стійкість до детергентів, відносно висока стійкість до протеазам (Dumoulin et al, 2002) і високий вихід (Arbabi-Ghahroudi et al, 1997); також можуть бути створені високо афінні sdAb виділенням з імунної бібліотеки (Li et al, 2009) або шляхом дозрівання афінності in vitro (Davies & Riechmann, 1996). Подальші модифікації для підвищення стабільності, такі як введення неканонічних дисульфідних зв'язків (Hussack et al, 2011 року; Kim et al, 2012), також можуть бути застосовані до sdAb.

35 Фахівець у даній галузі техніки повинен бути добре знайомий зі структурою однокланових антитіл (див, наприклад, 3DWT, 2P42 в Protein Data Bank). SdAb містить один домен імуноглобуліну, який зберігає характерну для імуноглобуліну укладку ланцюга; в першу чергу, три CDR/гіперваріабельні петлі утворюють антиген-зв'язуючий сайт. Тим не менш, і, як повинно бути зрозуміло фахівцям в даній галузі техніки, не всі CDR можуть знадобитися для зв'язування антигену. Наприклад, і не обмежуючись цим, одна, дві, або три CDR можуть внести свій вклад в зв'язування і розпізнавання антигену за допомогою sdAb відповідно до даного винаходу. CDR з sdAb або варіабельного домену згадуються тут як CDR1, CDR2 і CDR3 і пронумеровані, як це визначено у Lefranc, M.-P. et al. (2003).

45 Антитіло або його фрагмент відповідно до даного винаходу є специфічним до рецептора інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF1R), що знаходиться на поверхні клітин. IGF1R містить альфа-субодиницю, яка включає позаклітинну частину, що має ділянку зв'язування інсуліноподібний фактор росту 1, з'єднану дисульфідним зв'язком з бета-субодиницею, яка містить невеликий позаклітинний домен, трансмембранну ділянку і внутрішньоклітинну частину. 50 Рецептор IGF1 компонується в гомодимер або може утворювати гетеродимер з рецептором інсуліну. Послідовність IGF1R може бути, але не обмежується цим, такою, як зображено на Фіг. 2 (інвентарний № SwissProt P08069; SEQ ID NO: 12), або послідовністю, по суті ідентичною їй.

55 Антитіло або його фрагмент, як описано в даному документі, не повинні заважати передачі сигналів через інсуліновий рецептор (IR) або IGF1R. Зокрема, антитіла або їх фрагменти, описані в даному документі, не повинні пригнічувати фосфорилування протеїнкінази B, індуковане інсуліном, і вони не повинні індукувати фосфорилування IR самостійно або пригнічувати викликану інсуліном передачу сигналу; крім того, антитіла або їх фрагменти, описані в даному документі, не повинні пригнічувати IGF-1-індуковане фосфорилування IGF1R. 60 До того ж, вони не повинні зв'язуватися з інсуліновим рецептором.

Як було зазначено вище, антитіло або його фрагмент можуть бути sdAb. SdAb може мати верблюже походження або бути отриманим з верблюжих V_HH , і, таким чином, можуть бути засновані на верблюжих каркасних областях; В якості альтернативи, CDR, описані вище, можуть бути щеплені на VNAR, V_HH , VH АБО VL каркасні області. У ще одному

альтернативному варіанті, гіперваріабельні петлі, описані вище, можуть бути щеплені на каркасні області інших типів фрагментів антитіл (Fv, ScFv, FAB) з будь-якого джерела (наприклад, мишачі) або білки аналогічного розміру і характеру, на які може бути щеплена CDR (наприклад, див. Nicaise et al, 2004)

Даний винахід додатково включає антитіло або фрагмент, який "гуманізований" з використанням будь-якого відповідного способу, відомого в даній галузі техніки, наприклад, але не обмежуючись ними, CDR щепленням і облицюванням. Гуманізація фрагмента антитіла або антитіла містить заміну амінокислоти в послідовності на її людський аналог, який міститься в людській консенсусній послідовності, без втрати антиген-зв'язуючої здатності або специфічності; такий підхід зменшує імуногенність антитіла або його фрагмента при введенні людини. В процесі щеплення CDR, одна або більше ніж одна з CDR, визначених у даному документі, може бути злита або щеплена до варіабельної області людини (VH або VL), іншому людському антитілу (IgA, IgD, IgE, IgG і IgM), іншим людським каркасним областям фрагментів антитіл (Fv, ScFv, Fab) або інших білків аналогічного розміру і природи, на які можуть бути щеплені CDR (Nicaise et al, 2004). В такому випадку, конформація зазначеної однієї або більше ніж однієї гіперваріабельної петлі ймовірно зберігається і спорідненість і специфічність sdAb до своєї мішені (тобто IGF1R) ймовірно мінімально порушені. CDR-щеплення відомі в даній галузі техніки і описані щонайменше в наступних документах: патент США № 6180370, патент США № 5693761, патент США № 6054297, патент США № 5859205, і Європейський патент № 626390. Облицювання також згадується в цій галузі як "шліфовка варіабельної області" і включає в себе гуманізацію гідрофільних областей антитіла або фрагмента; таким чином, приховані негуманізованні залишки, які можуть бути важливі для конформації CDR, зберігаються, в той час як потенціал для імунологічної реакції проти гідрофільних областей зведений до мінімуму. Облицювання відоме в даній галузі техніки і описане щонайменше в наступних документах: в патенті США № 5869619, в патенті США № 5766886, патент США № 5821123, і Європейському патенті № 519596. Фахівці в цій галузі техніки також достатньо знайомі зі способами отримання таких гуманізованих фрагментів антитіл і гуманізації амінокислотних позицій.

Наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, виділене чи очищене антитіло або його фрагмент, специфічні до IGF1R, може мати послідовність $X_1VX_2LX_3ESGGGLVQX_4GGSRLRLSCX_5X_6SGGTVSPTAMGWX_7RQAPGKX_8X_9EX_{10}VX_{11}HITWSRGTT$ $RX_{12}ASSVKX_{13}RFTISRDX_{14}X_{15}KNTX_{16}YLMNSLX_{17}X_{18}EDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT$ $X_{19}VTVSS$ (SEQ ID NO:4), де X_1 являє собою E или Q; X_2 являє собою K або Q; X_3 являє собою V або E; X_4 являє собою A або P; X_5 являє собою A або E; X_6 являє собою V або A; X_7 являє собою V або F; X_8 являє собою G або E; X_9 являє собою L або R; X_{10} являє собою F або W; X_{11} являє собою G або S; X_{12} являє собою V або Y; X_{13} являє собою D або G; X_{14} являє собою N або S; X_{15} являє собою A або S; X_{16} являє собою L або V; X_{17} являє собою K або R; X_{18} являє собою A або S; и X_{19} являє собою L або Q, або по суті ідентичну їй послідовність. В якості альтернативи, виділене чи очищене антитіло може містити послідовність, обрану з групи, що складається з:

$QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFGVGHITWSRGTTTRVASS$ $VKDRFTISRDSAKNTVYLMNSLKS EDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGTQVTVSS$ (SEQ ID NO:5), згадуваної тут як IGF1R-4;

$QVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAVSGGTVSPTAMGWVRQAPGKGLEWVG HITWSRGTTTRYAS$ $SVKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT LTVTVSS$ (SEQ ID NO:6), згадуваної тут як IGF1R-4_H2;

$QVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRGTTTRYASS$ $VKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT LTVTVSS$ (SEQ ID NO:7), згадуваної тут як IGF1R-4_H3;

$QVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRGTTTRYASS$ $VKGRFTISRDSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT LTVTVSS$ (SEQ ID NO:8), згадуваної тут як IGF1R-4_H4;

$QVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFGVGHITWSRGTTTRYAS$ $SVKGRFTISRDSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT LTVTVSS$ (SEQ ID NO:9), згадуваної тут як IGF1R-4_H5;

і/або послідовності, по суті ідентичною їм.

По суті ідентичні послідовності можуть містити одну або кілька консервативних амінокислотних мутацій. Відомо, що одна або кілька консервативних амінокислотних мутацій в референсній послідовності можуть дати мутантний пептид без істотної зміни фізіологічних, хімічних, фізико-хімічних або функціональних властивостей в порівнянні з референсною послідовністю; в такому випадку, референсна і мутантна послідовності будуть вважатися "по суті ідентичними" поліпептидами. Консервативне амінокислотне заміщення визначається тут як заміщення амінокислотного залишку на інший амінокислотний залишок з подібними хімічними властивостями (наприклад, розмір, заряд або полярність). Дані консервативні амінокислотні мутації можуть відбутися в каркасах областях sdAb при збереженні послідовностей CDR, перерахованих вище, а також загальної структури CDR антитіла або його фрагмента; таким чином, специфічність і зв'язування антитіла зберігаються.

В якості необмеженого прикладу, консервативна мутація може бути заміщенням амінокислоти. Таке консервативне амінокислотне заміщення може заміщати основну, нейтральну, гідрофобну або кислу амінокислоту на іншу з тієї ж групи. Під терміном "основна амінокислота" маються на увазі гідрофільні амінокислоти, які мають бічний ланцюг із значенням рК більше 7, які, як правило, позитивно заряджені при фізіологічному значенні рН. Основні амінокислоти включають гістидин (His або H), аргінін (Arg або R) і лізин (Lys або K). Під терміном "нейтральна амінокислота" (також "полярна амінокислота") мають на увазі гідрофільні амінокислоти, які мають боковий ланцюг, яка не заряджена при фізіологічному значенні рН, але яка має принаймні один зв'язок, в якій пара електронів, загальна для двох атомів, знаходиться ближче до одного з атомів. Полярні амінокислоти включають серин (Ser або S), треонін (Thr або T), цистеїн (Cys або C), тирозин (Tyr або Y), аспарагін (Asn або N) і глютамін (Gln або Q). Термін "гідрофобна амінокислота" (також "неполярна амінокислота") включає амінокислоти, що проявляють гідрофобність вище нуля відповідно до нормованої консенсусної шкали гідрофобності Айзенберга (1984). Гідрофобні амінокислоти включають пролін (Pro або P), ізолейцин (Ile або I), фенілаланін (Phe або F), валін (Val або V), лейцин (Leu або L), триптофан (Trp або W), метіонін (Met, або M), аланін (Ala або A) і гліцин (Gly або G). "Кисла амінокислота" відноситься до гідрофільних амінокислот, які мають боковий ланцюг із значенням рК менше 7, які, як правило, негативно заряджені при фізіологічному значенні рН. Кислі амінокислоти включають глютамат (Glu або E) і аспартат (Asp або D).

Ідентичність послідовності використовується для оцінки подібності двох послідовностей; вона визначається шляхом обчислення відсотка залишків, які є однаковими, коли дві послідовності вирівнюються для максимальної відповідності між позиціями залишків. Будь-який відомий спосіб може бути використаний для обчислення ідентичності послідовностей; наприклад, існує комп'ютерне програмне забезпечення для розрахунку ідентичності послідовності. Не у рамках будь-яких обмежень, ідентичність послідовності може бути розрахована за допомогою програмного забезпечення, такого як NCBI BLAST2, підтримуваного Швейцарським інститутом біоінформатики (його можна знайти за адресою sa.exrasy.org/tools/blast/), BLAST-P, Blast-N або FASTA-H, або будь-якого іншого відповідного програмного забезпечення, яке відоме в даній галузі техніки.

По суті ідентичні послідовності відповідно до даного винаходу можуть бути щонайменше на 90 % ідентичні; в іншому прикладі по суті ідентичні послідовності можуть бути щонайменше на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, або 100 % ідентичні, або на будь-яке інше значення між зазначеними, на рівні амінокислотної послідовності, описаному в даному документі. Важливим є те, що по суті ідентичні послідовності зберігають активність і специфічність референсної послідовності. У необмеженому втіленні різниця в ідентичності послідовностей може бути через мутації (й) консервативної амінокислоти. В якості необмеженого прикладу, даний винахід може бути направлено на антитіло або його фрагмент, що містить послідовність щонайменше на 95 %, 98 % або 99 % ідентичну послідовності антитіла, описаних в даному документі.

Антитіло або його фрагмент відповідно до даного винаходу може також містити додаткові послідовності для допомоги в експресії, детектуванні або очистці рекомбінантного антитіла або його фрагменту. Можуть бути використані будь-які такі послідовності або мітки, відомі фахівцям в даній галузі. Наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, антитіло або його фрагмент може включати в себе таргетовану або сигнальну послідовність (наприклад, але не обмежуючись зазначеним, OmpA), мітку детектування/очищення (наприклад, але не обмежуючись зазначеним, с-Мус, His5 або His6), або їх комбінації. В іншому прикладі додаткова послідовність може бути біотинним сайтом впізнання як, наприклад, описаний Cronan et al в WO 95/04069 або Cronan et al в WO/2004/076670. Як також відомо фахівцям в цій галузі техніки, лінкерні послідовності можуть бути використані в поєднанні з додатковими послідовностями або мітками, або можуть слугувати в якості мітки детектування/очищення.

Антитіло або його фрагмент відповідно до даного винаходу також можуть бути в форматі мультівалентного відображення, так званому тут мультівалентною презентацією. Мультімерізація може бути досягнута будь-яким підходящим способом, відомим в даній галузі техніки. Наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, мультімерізація може бути досягнута за допомогою молекул самозбірки, таких, як описані у Zhang et al (2004a; 2004b) і в WO2003/046560, де пентатела отримують шляхом експресії злитого білка, що містить антитіло або його фрагмент відповідно до даного винаходу, і домен пентамерізації В-субодиниці сімейства токсинів AB5 (Merritt & Hol, 1995). Мультімер також може бути сформований з використанням доменів мультімерізації, описаних у Zhu et al. (2010); ця форма, яка називається тут "combody" формою, є злиттям антитіла або його фрагмента відповідно до даного винаходу з суперспіральним пептидом, що створює мультімерну молекулу (Zhu et al., 2010). Інші форми мультівалентної презентації також охоплюються цим винаходом. Наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, антитіло або його фрагмент можуть бути представлені у вигляді димеру, тримера або будь-якого іншого відповідного олігомеру. Це може бути досягнуто за допомогою способів, відомих в даній галузі техніки, наприклад, за допомогою з'єднання прямих зв'язуванням (Nielson et al, 2000), з-Jun/Fos взаємодії (Kruif & Logtenberg, 1996), "Виступи-у-западниці" взаємодії (Ridgway et al, 1996).

Іншим способом, відомим в даній галузі для мультімерізації, є димеризація антитіла або його фрагмента з використанням домену Fc, наприклад, але не обмежуючись зазначенням, людських доменів Fc. Домени Fc можуть бути обрані з різних класів, в тому числі, але не обмежуючись зазначенням, IgG, IgM або різних підкласів, включаючи, але не обмежуючись зазначенням, IgG1, IgG2 і т.д. При такому підході ген Fc вбудовують у вектор разом з геном sdAb для створення злитого білка sdAb-Fc (Bell et al, 2010 року; Iqbal et al, 2010); злитий білок рекомбінантно експресують, потім очищують. Наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, формати мультівалентного відображення можуть включати в себе химерні формати анти-IGF1R-4 V_HH, зв'язаного з доменом Fc, або бі- або три-специфічні злиті антитіла з двома або трьома анти-IGF1R-4 V_HH, що розпізнають унікальні епітопи. Такі антитіла можна легко спроектувати і отримати, вони можуть значно продовжити період напіввиведення у сироватці sdAb і вони можуть бути придатними реагентами для візуалізації пухлин (Bell et al., 2010).

Домен Fc у мультімерному комплексі, як описано вище, може являти собою будь-який відповідний Fc-фрагмент, відомий у даній галузі техніки. Фрагмент Fc може бути отриманий з будь-якого відповідного джерела. Наприклад, Fc може бути мишачого або людського походження. У конкретному необмеженому прикладі Fc може бути мишачим Fc2b фрагментом або людським Fc1 фрагментом (Bell et al, 2010 року; Iqbal et al, 2010). Фрагмент Fc може бути злитий з N-термінальним або C-термінальним кінцем анти-IGF1R-4 V_HH або гуманізувати варіантів відповідно до даного винаходу. У конкретному необмеженому прикладі мультімерізовані виділені або очищені антитіла або фрагменти, як описано вище, можуть містити послідовність SEQ ID NO: 10, 38, або 11.

Кожна субодиниця мультімерів, описаних вище, може містити однакові або різні антитіла або їх фрагменти відповідно до даного винаходу, які можуть мати однакову або різну специфічність. Крім того, домени мультімерізації можуть бути зв'язані з антитілом або фрагментом антитіла з використанням лінкера в міру необхідності; такий лінкер повинен мати достатню довжину і відповідний склад, щоб забезпечити гнучке кріплення двох молекул, але він не повинен заважати антиген-зв'язуючим властивостям антитіла.

Антитіло або його фрагмент, як описано у даному документі, можуть проходити через гематоенцефалічний бар'єр. Мозок відділений від іншої частини тіла за допомогою спеціалізованої ендотеліальної тканини, відомої як гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ). Ендотеліальні клітини ГЕБ з'єднані щільними контактами і ефективно запобігають потраплянню множини терапевтичних з'єднань у мозок. На додаток до низької швидкості везикулярного транспорту ще однією особливістю ГЕБ є наявність ферментативного бар'єру (ів) та високого рівня (рівнів) експресії АТФ-залежних транспортерів на аблюмінальній (з боку мозку) боці ГЕБ, у тому числі Р-глікопротеїну (Gottesman et al., 1993; Watanabe, 1995), який активно транспортує різні молекули з головного мозку у кровотік (Samuels, 1993). Лише невеликі (менше 500 дальтон) і гідрофобні (Pardridge, 1995) молекули можуть легко проникати через ГЕБ. Таким чином, здатність антитіла або його фрагмента, як описано вище, специфічно зв'язуватися з поверхневим рецептором, поглинатися у ендотеліальних клітинах головного мозку і піддаватися трансцитозу через ГЕБ, ухиляючись від лізосомальної деградації, корисна у галузі неврології.

Даний винахід охоплює також нуклеотидні послідовності, які кодують молекули, як описано у даному документі. З огляду на виродженість генетичного коду, деяке число нуклеотидних послідовностей буде мати ефект кодування поліпептиду, що буде зрозуміло фахівцям у даній

галузі техніки. Нуклеотидна послідовність може бути кодон-оптимізована для експресії у різних мікроорганізмах. Даний винахід також відноситься до векторів, що містять нуклеїнові кислоти, описані вище. Крім того, винахід охоплює клітини, що містять нуклеїнову кислоту і/або вектор, описані вище.

5 Даний винахід додатково відноситься до виділених або очищених антитіл або їх фрагментів, іммобілізованим на поверхню з використанням різних методик; наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, антитіло або його фрагмент можуть бути зв'язані або спарені з поверхнею за допомогою His-мітки, біотінового зв'язування, ковалентного зв'язування, адсорбції тощо. Іммобілізація антитіла або його фрагмента відповідно до даного винаходу може бути корисна у
10 різних застосуваннях для захоплення, очищення або виділення білків. Тверда поверхня може являти собою будь-яку відповідну поверхню, наприклад, але не обмежуючись зазначеним, поверхня лунки мікротитраційного планшету, канали сенсорних чипів поверхневого плазмонного резонансу (SPR), мембрани, кульки (такі як магнітні або сефарозні кульки або засновані на інших хроматографічних смолах), скло, пластик, нержавіючу сталь, плівку або
15 будь-яку іншу корисну поверхню, таку як наночастки, нанопроводи і поверхні кантільоверу.

Винахід також включає антитіло або його фрагмент, як описано вище, зв'язане з молекулою вантажу. Молекула вантажу може являти собою будь-яку відповідну молекулу, яка поставляється через ГЕБ антитілом або його фрагментом. Молекула вантажу може мати
20 молекулярну масу у діапазоні від приблизно 1 кДа до приблизно 200 кДа; наприклад, молекула вантажу може мати молекулярну масу приблизно 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 або 200 кДа, або будь-яку масу у проміжку між зазначеними масами, або будь-який діапазон мас, визначений за допомогою будь-яких двох зазначених вище мас. У конкретних, не обмежуючих прикладах, молекула вантажу може мати молекулярну масу 1 кДа
25 (наприклад, але не обмежуючись зазначеним, мала молекула, така як Су5.5), 1-10 кДа (наприклад, але не обмежуючись зазначеним, пептид, такий як Галанін, 3 кДа), приблизно 80 кДа (наприклад, але не обмежуючись зазначеним, фрагмент Fc, фермент, білок, антитіло і т.д.), або приблизно 200 кДа (наприклад, але не обмежуючись зазначеним, моноклональних антитіл).

Наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, молекулою вантажу може бути детектуючий
30 агент, терапевтичний агент, лікарський засіб, пептид, фермент, фактор росту, цитокіни, пастка рецептора, антитіло або його фрагмент (наприклад IgG, ScFv, Fab, V_HH, V_H, V_L і т.д.), хімічна сполука, вуглеводний фрагмент, молекули на основі ДНК (антисмислової олігонуклеотид, мікроРНК, міРНК, плазмида), цитотоксический агент, вірусний вектор (адено-, ленті-, ретро-), одна або більше ліпосом або наноносіїв, завантажених будь-яким з раніше перерахованих типів
35 молекул вантажу, або одна або кілька наночастинок, нанопроводів, нанотрубок або квантових точок. Молекула вантажу, як це описано вище, може бути детектуючим агентом. Наприклад, IGF1R-специфічне антитіло або його фрагмент може бути зв'язано з радіоактивним ізотопом, парамагнітною міткою, фторофором, флуоресцентним агентом, ближнім інфрачервоним (NIR, наприклад Су5.5) фторохромом або барвником, ехогенним мікропузірів, аффіной міткою, детектуючою молекулою на основі білка, нуклеотидом, квантовими точками, наночастиною,
40 нанопроводи або нанотрубкою або будь-яким іншим відповідним агентом, який може бути виявлений за допомогою способів візуалізації. Антитіло або його фрагмент можуть бути зв'язані з молекулою вантажу з використанням будь-якого способу, відомого в даній галузі (рекомбінантна технологія, хімічної кон'югації і т.д.).

45 Молекула вантажу, як описано в даному документі, може бути зв'язана, що також названо тут "кон'югована", з антитілом або його фрагментом будь-яким підходящим способом, відомим в даній галузі техніки. Наприклад, не в рамках яких-небудь обмежень, молекула вантажу може бути зв'язана з пептидом за допомогою ковалентного зв'язку або іонної взаємодії. Зв'язок може бути досягнутий за допомогою хімічної реакції зшивання або шляхом злиття з використанням
50 методології рекомбінантної ДНК в поєднанні з будь-якою системою експресії пептидів, такий як бактерії, дріжджі або системи, засновані на клітинах ссавців. При кон'югації молекули вантажу з антитілом або його фрагментом може бути використаний відповідний лінкер. Способи зв'язування антитіла або його фрагмента з молекулою вантажу, такою як терапевтичний або агент, що детектується, добре відомі фахівцям в даній галузі техніки.

55 В одному не обмежуючому прикладі молекулою вантажу може бути детектована мітка, радіоактивний ізотоп, парамагнітна мітка, така як гадоліній або оксид заліза, фторофор, ближній інфрачервоний (NIR) фторохром або барвник, ехогенний мікроміхур, аффіна мітка (наприклад, біотин, авідин і т. д.), ферменти або будь-який інший відповідний агент, який може бути виявлений за допомогою діагностичних способів візуалізації. У конкретно не обмежуючому
60 прикладі анти-IGF1R-4 або його фрагмент може бути зв'язаний з барвником ближньої

інфрачервоної флуоресцентної візуалізації (NIRF), наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, Cy5.5, Alexa680, Dylight680 або Dylight800.

Таким чином, даний винахід додатково передбачає спосіб *in vitro* детектування IGF1R, що включає контактування зразка тканини з одним або більше ніж одним виділеним або очищеним антитілом або його фрагментом відповідно до даного винаходу, зв'язаним з детектованим агентом. Комплекс IGF1R-антитіло можна потім виявити за допомогою технологій детектування і/або візуалізації, відомих в даній галузі техніки. Зразок тканини в способі, описаному вище, може являти собою будь-який відповідний зразок тканини, наприклад, але не обмежуючись зазначеним, зразок сироватки, зразок тканини судин, зразок пухлинної тканини або тканини головного мозку; зразок тканини може бути з організму людини або тварини. Стадія контактування здійснюється у відповідних умовах для формування комплексу між антитілом або його фрагментом і IGF1R, відомих фахівцям у цій галузі техніки. Стадія детектування може бути здійснена будь-яким підходящим способом, відомих в даній галузі техніки, наприклад, але не обмежуючись зазначеним, за допомогою оптичної візуалізації, імуногістохімії, молекулярної діагностичної візуалізації, ELISA (імуно-ферментний аналіз), візуалізуючої мас-спектрометрії або іншим відповідним способом. Наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, виділене чи очищене антитіло або його фрагмент, зв'язаний з агентом, що детектує, можуть бути використані в імунологічних дослідженнях (IA), включаючи, але не обмежуючись зазначеним, ферментативні IA (EIA), ELISA, "швидке захоплення антигену", "швидкі хроматографічні IA", і "швидкі EIA". (Наприклад, див Planche et al, 2008; Sloan et al, 2008; Russmann et al, 2007; Musher et al, 2007; Turgeon et al, 2003; Fenner et al, 2008).

Даний винахід також описує спосіб детектування експресії IGF1R в суб'єкті *in vivo*. Спосіб включає в себе введення одного або більше одного виділеного або очищеного антитіла або його фрагмента, як описано в даному документі, зв'язаного з детектуючим агентом, суб'єкту, потім детектування міченого антитіла або його фрагмента, зв'язаного з IGF1R. Стадія детектування може включати в себе будь-який відповідний спосіб, відомий в даній галузі техніки, наприклад, але не обмежуючись зазначеним, PET, SPECT або флуоресцентну візуалізацію або будь-який інший відповідний спосіб. Спосіб, як описано вище, може бути корисним при виявленні експресії IGF1R в кровоносних судинах або тканинах, наприклад, але не обмежуючись зазначеним, в пухлинних тканинах.

Стадія детектування *in vivo* способами, описаними вище, може включати візуалізацію всього тіла для діагностичних цілей або локальну візуалізацію в специфічних сайтах, таких як, але не обмежуючись зазначеним, судини головного мозку або пухлини судин головного мозку, в кількісному вираженні для оцінки прогресування захворювання або відповіді суб'єкта на режим лікування. Стадією детектування способами, описаними вище, може бути імуногістохімія або технологія неінвазивної (молекулярної) діагностичної візуалізації, в тому числі, але не обмежуючись зазначеним:

- оптична візуалізація;

- позитронно-емісійна томографія (PET), в якій детектуючий агент являє собою ізотопи, такі як ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{62}Cu , ^{124}I , ^{76}Br , ^{82}Rb і ^{68}Ga , причому ^{18}F є найбільш клінічно використовуваним;

- однофотонна емісійна комп'ютерна томографія (SPECT), в якій детектуючий агент являє собою радіоіндикатор, такий як $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I , ^{201}Tl , ^{133}Xe , в залежності від конкретного застосування;

- магнітно-резонансна томографія (MRI), в якому детектуючим агентом може бути, наприклад, але не обмежуючись зазначеним, гадоліній, наночастини оксиду заліза і наночастини заліза-кобальту, покриті вуглецем, тим самим підвищуючи чутливість MRI для виявлення бляшок;

- контрастна ультразвукова ехографія (CEUS) або ультразвук, де детектуючим агентом є щонайменше один акустично активний і газонаповнений мікроміхур. Ультразвук є поширеною технологією для скринінгу та раннього виявлення захворювань людини. Це дешевше MRI або сцинтиграфії і безпечніше, ніж технології молекулярної візуалізації, такі як радіонуклідна візуалізація, так як не зв'язане з радіацією.

Даний винахід також стосується способу транспортування молекули, що представляє інтерес через гематоенцефалічний бар'єр. Спосіб включає введення молекули, зв'язаної з антитілом або його фрагментом, як описано в цьому документі, суб'єкту; антитіло або його фрагмент проходять гематоенцефалічний бар'єр. Молекула може бути будь-якою бажаною молекулою, в тому числі молекулою вантажу, як було описано раніше; молекула може бути "зв'язана" з антитілом або його фрагментом з використанням будь-якого відповідного способу, включаючи, але не обмежуючись зазначеним, кон'югацію або експресію в злитому білку.

Введення може бути здійснено будь-яким підходящим способом, наприклад за допомогою парентерального введення, включаючи, але не обмежуючись зазначеним, внутрішньовенне (iv), підшкірні (sc) і внутрішньом'язове (im) введення. У цьому способі антитіло або його фрагмент згідно з винаходом "переносять" молекулу, що представляє інтерес через гематоенцефалічний бар'єр до мішені в мозку.

Даний винахід також відноситься до композиції, що містить одне або більше виділене чи очищене антитіло або його фрагмент, як описано в цьому документі. Композиція може містити одне антитіло або фрагмент, як описано вище, або може являти собою суміш антитіл або їх фрагментів. Крім того, в композиції, що містить суміш антитіл або фрагментів відповідно до даного винаходу, антитіла можуть мати таку ж специфічність або можуть відрізнятися за своєю специфікою; наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, композиція може містити антитіла або їх фрагменти, специфічні до IGF1R (той же або інший епітоп).

Композиція може також містити фармацевтично прийнятний розчинник, ексципієнт або носій. Розчинник, ексципієнт або носій може являти собою будь-який відповідний розчинник, ексципієнт або носій, відомий в даній галузі, і повинен бути сумісний з іншими інгредієнтами композиції, зі способом доставки композиції і не бути шкідливим для суб'єкта. Композиція може бути в будь-якої зручної формі; наприклад, композиція може знаходитися в формі суспензії, формі порошку (наприклад, але обмежуючись ліофілізованою або інкапсульованою), в формі капсул або таблеток. Наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, коли композиція знаходиться у формі суспензії, носій може містити воду, фізіологічний розчин, відповідний буфер або добавки для поліпшення розчинності і/або стабільності; реконструкція для отримання суспензії здійснюється в буфері при відповідному рН, щоб забезпечити життєздатність антитіла або його фрагмента. Сухі порошки можуть також включати добавки для поліпшення стабільності і/або носії для збільшення маси/об'єму; наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, композиція сухого порошку може містити сахарозу або трегалозу. У конкретно не обмежуючому прикладі композиція може бути сформована таким чином, щоб доставити антитіла або їх фрагменти в шлунково-кишковий тракт суб'єкта. Таким чином, композиція може включати в себе інкапсуляцію, вивільнення з часом або інші відповідні технології для доставки антитіла або його фрагмента. У компетенції фахівця в даній галузі техніки підготувати відповідні композиції, що містять дані сполуки.

Винахід також відноситься до способу кількісного визначення кількості молекули вантажу, що доставляється через ГЕБ суб'єкта, в якому молекула вантажу зв'язана з одним або більше виділеним або очищеним антитілом або його фрагментом, як описано в даному документі, причому спосіб включає стадії:

- a) збору спинномозкової рідини (CSF) у суб'єкта; і
- b) використання цільових методів протеоміки для визначення кількості молекули вантажу, зв'язаного з одним або більше антитілом або його фрагментом, в спинномозковій рідині.

Молекула вантажу може являти собою будь-яку бажану молекулу, в тому числі молекули вантажу, описані раніше; виділене чи очищене антитіло або його фрагмент проходить через гематоенцефалічний бар'єр; і молекула може бути "зв'язана" з антитілом або його фрагментом з використанням будь-якого відповідного способу, включаючи, але не обмежуючись зазначеним, кон'югацію або експресію в злитому білку, як описано вище. В описаному вище способі CSF беруть у суб'єкта з використанням будь-якого відповідного способу, відомого в даній галузі. Кількість CSF, необхідне для цільового методу протеоміки на стадії b), може перебувати в діапазоні від приблизно 1 до 10 мкл; наприклад, кількість необхідної спинномозкової рідини може становити приблизно 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, або 10 мкл, або будь-яку кількість між цими значеннями, або будь-який діапазон, який визначається тільки що описаними значеннями. Антитіло або його фрагмент, зв'язане з молекулою вантажу, може бути введено суб'єкту до збору спинномозкової рідини. Може знадобитися відповідна затримка між введенням і доставкою антитіла або його фрагмента, зв'язаного з молекулою вантажу, через ГЕБ. Затримка може становити щонайменше 30 хвилин після введення антитіла або фрагмента, зв'язаного з молекулою вантажу; наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, затримка може становити щонайменше 30 хвилин, 1 годину, 1,5 години, 2 години, 2,5 години, 3 години, 3,5 години, 4 години, 4,5 години, або 5 годин. Цільові методи протеоміки, використовувані для визначення кількості одного або більше антитіла або його фрагмента, зв'язаного з молекулою вантажу, можуть бути будь-якими відповідними методами, відомими в даній галузі техніки. Наприклад, не в рамках будь-яких обмежень, цільовий метод протеоміки може бути методом мас-спектрометрії, таким як, але не обмежуючись зазначеним, моніторинг множинних реакцій з використанням ізотоп-мічених внутрішніх стандартів (MRM-ILIS; см, наприклад, Haqqani et al., 2013), Перевага MRM полягає в

тому, що він дозволяє провести швидку, чутливу і специфічну кількісну оцінку немічених цільових аналітів (наприклад, антитіла або його фрагмента, як описано в даному документі) в біологічному зразку. Можливість мультиплексування аналізу дозволяє кількісно оцінити антитіла або їх фрагменти і молекулу вантажу.

5 Даний винахід буде проілюстровано на наступних прикладах. Проте, слід розуміти, що дані приклади наведені тільки в ілюстративних цілях і не повинні використовуватися для обмеження обсягу винаходу будь-яким чином.

Приклад 1: Очищення рекомбінантного фрагмента IGF1R

10 Рекомбінантний фрагмент позаклітинного домену IGF1R довжиною в 933 амінокислоти (показаний сірою рамкою на Фіг. 1; див. також амінокислоти 1-933 SEQ ID NO: 12) був підготовлений. Фрагмент складається з N-термінального 30 амінокислотного сигнального пептиду, повної альфа-субодиниці, сайту фуринового розщеплення (RKRR, SEQ ID NO: 13; відокремлює альфа і бета субодиниці), а також більшої частини позаклітинної частини бета-субодиниці (Фіг. 1 і 2).

15 Клонування. Послідовність IGF1R ектодомена, що представляє інтерес, ампліфікували за допомогою ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) з використанням наступних праймерів:

5'-CGGGATCCGCCACCATGAAGTCTGGCTCCGGAG-3" (прямий; SEQ ID NO:14)

5'-GCTCTAGATCAGAAGTTTTCATATCCTGTTTGG-3" (зворотний; SEQ ID NO:15)

20 і субклонували в сайт Smal pUC19. Послідовність IGF1R⁹³³ потім субклонували в pCDN4/Мус-His (Invitrogen), щоб створити р IGF1R⁹³³-His для експресії His-міченого ектодомена, як описано раніше (Samani et al. 2004).

25 Перехідна трансфекція. Частинок лентівірусів, що експресують IGF1R⁹³³-His, були отримані в пакуючій клітинній лінії 293SF-PacLV, як детально описано раніше (Broussau et al., 2008). Якщо коротко, клітини були трансфіковані вектором з використанням поліетиленіміну. Свіже середовище (LC-SFM (безсироватковане середовище з низьким кальцієм)), що містить 1 мкг/мл доксицикліну і 10 мкг/мл кумату, додавали до клітин через 5 годин після трансфекції, і супернатант, що містить LV частки, був зібраний після 48-72 годин, його концентрували за допомогою ультрацентрифугування при 100000 g протягом 2 годин при температурі 4 °C на підкладці 20 % сахарози (Gaillet B et al. 2007), ресуспендували в LC-SFM середовищі, доповнене 1 % FBS (фетальна бичача сироватка), і зберігали при -70 °C до використання.

30 Стабільна експресія. Стабільна клітинна лінія, 293SF-cum2-CR5-IGF1R-His, була згенерована трансдукцією клітинних ліній 293SF-Cum2 з відповідними лентівірусними частинками з використанням протоколу, описаного раніше (Gaillet B et al. 2010). Якщо коротко, 0,5-1,0 × 10⁵ 293SF-Cum2 клітин висівали в 24-лункових планшетах в 200 мкл LC-SFM середовища без декстрансульфатом. Суспензія LV була отримана змішуванням 200-500 мкл LV з 8 мкг/мл полібрена і інкубуванням протягом 30 хвилин при 37 °C. Свіжоприготовлену суспензію LV додавали до клітин через 4 години після посіву. Після 24 годин 500 мкл середовища з додаванням декстрансульфату додавали до клітин. Для підвищення рівня експресії клітини були знову трансдуковані до 6 разів з використанням того ж протоколу після 3-4 діб відновлення клітин. Нарешті, клітини були розмножені в 6-ти лункових планшетах і колбах шейкерах.

40 Великомасштабне виробництво білка і очищення. Клон, ідентифікований як найбільш високопродуктивний, був розмножений у колбах шейкерах або центрифужних колбах. Продуктування білка ініціювали додаванням 1 мкг/мл кумату до свіжої середовищі, після чого 24 год. інкубували при 37 °C і 4-8-діб інкубували при 30 °C. Клітини видаляли центрифугуванням і супернатант фільтрували і концентрували (10x) з використанням систем тангентальної потокової фільтрації (касети ультрафільтрації Pellicon, EMD Millipore).

45 IGF1R⁹³³-His очищали з використанням колонки HisPrep (GE Healthcare) відповідно до інструкцій виробника. Якщо коротко, концентрований зразок наносили на His-Prep FF (16/10) колонку (GE Healthcare), калібрували і промивали 50 мМ фосфатом натрію, 300 мМ NaCl, 5 мМ імідазолу з pH 7,5 і елюювали 50 мМ фосфатом натрію, 300 мМ NaCl, 500 мМ імідазолу, pH 7,5. Стадію елюювання з 0,1 М цитратом натрію pH 4,5 - pH 2,5 використовували для елюювання білка і збирали пікові фракції. Зміну буфера здійснювали шляхом ультрафільтрації з використанням 50 кДа відтинає мембрани або знесолювальної колонки з буфером, що містить 50 мМ фосфату натрію, 150 мМ NaCl і 0,01 % Tween-80, pH 7,2. Чистоту обох білків перевіряли за допомогою SDS-PAGE і зберігали їх при -80 °C до використання (див. наступні приклади).

55 Приклад 2: Імунізація лами і сироваткова відповідь

Для виділення V_HH, націлених на позаклітинний домен IGF1R, лама була імунізована рекомбінантним IGF1R933-His фрагментом, отриманим в Прикладі 1.

60 Одного самця лами (Lama glama) імунізували шляхом підшкірної ін'єкції IGF1R933-His рекомбінантного антигену (Приклад 1) у нижню частину спини. В 1 добу 200 мкг антигену,

розведеного в PBS до 1 мл вводили разом з 1 мл повного ад'юванта Фройнда (Sigma, St. Louis, MO). Ще три ін'єкції 100 мкг IGF1R933-His антигену з неповним ад'ювантом Фройнда (Sigma) були виконані на 22, 36 і 50 добу. Остаточну ін'єкцію 100 мкг антигену без ад'юванта проводили на 77 добу. Преїмунізовану кров відбиралась до першої ін'єкції на 1 добу і слугувала в якості негативного контролю. Проби крові (10-15 мл) збирали на 29, 43, 57 і 84 добу. Кров, взята на 84 добу, була оброблена негайно з виділенням мононукліарних клітин периферичної крові (PBMC). Кров розводили 1:1 з PBS і PBMC виділяли з крові за допомогою Lymphoprep Tube (Axis Shield). Клітини підраховували і зберігали у вигляді аліквот приблизно 1×10^7 клітин при температурі -80 °C для подальшого використання.

Преїмунізовану і постімунізаційну загальну сироватку аналізували на специфічний відповідь на IGF1R⁹³³-His антиген за допомогою ELISA на 57 добу. Сироватка лами з 84 діб була фракціонована як описано раніше (Doyle et al, 2008). Отримані фракції A1 (HCAb), A2 (HCAb), G1 (HCAb) і G2 (clgG) аналізували на специфічне зв'язування з IGF1R933-His антигеном за допомогою ELISA. Якщо коротко, 5 мкг IGF1R933-His рекомбінантного антигену, розведеного в PBS, інкубували протягом ночі (100 мкл/лунку, 18 ч, 4 °C) в 96-лункових планшетах Maxisorp (Nalgene, Nunc) для покриття планшетів. Планшети блокували бичачим сироватковим альбуміном (BSA), промивали PBS-T (PBS+0,05 % (об/об) Tween-20) і наносили серійні розведення преїмунізованої загальної сироватки, постімунізованої загальної сироватки (57 доба) і фракціонованої сироватки (84 добу). Після інкубації при кімнатній температурі протягом 1,5 год. планшети промивали PBS-T перед додаванням козячого анти-лама IgG (1: 1,000 в PBS) і інкубацією протягом 1 год. при 37° C. Після промивання PBS-T додавали свинячий анти-козячий IgG HRP (пероксидаза хрому) кон'югат (1:3,000 в PBS) і планшети інкубували протягом 1 год. при 37 °C. Остаточну PBS-T промивку проводили перед додаванням 100 мкл/лунку субстрату TMB (тетраметілбензідіновий субстрат) (KPL, Gaithersburg, MD); субстрат інкубували протягом 10 хв. Реакцію зупиняли за допомогою 100 мкл/лунку 1 M H₃PO₄. Оптичну щільність зчитували при довжині хвилі 450 нм.

Приклад 3: Побудова бібліотеки і вибір IGF1R зв'язують V_HH

Бібліотека V_HH гіперімунізованих лами була побудована на основі РНК, виділеної з PBMC в Прикладі 2.

Побудова бібліотеки і пеннінг проводили по суті як описано раніше (Arbabi-Ghahroudi et al, 2009a, 2009b; Tanha et al, 2003). Загальну РНК виділяли з приблизно 107 PBMC, зібраних на 84 добу постімунізації (Приклад 2) за допомогою QIAamp міні набору для виділення РНК з крові (Qiagen). Приблизно 5 мкг загальної РНК використовували як матрицю для синтезу першого ланцюга кДНК з оліго dT праймерами з використанням набору для синтезу першого ланцюга синтезу кДНК (GE Healthcare). кДНК ампліфікували за допомогою еквімолярної суміші трьох смислових праймерів, специфічних до варіабельної області:

MJ1: 5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCSMKGTGCAGCTGGTGGAKTCTGGGGGA-3' (SEQ ID NO:16)

MJ2:5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGA-3' (SEQ ID NO:17)

MJ3:5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGCTCAGGTACAGCTGGTGGAGTCT-3' (SEQ ID NO:18),

і двох антисмислових CH2-специфічних праймерів:

CH2: 5'-CGCCATCAAGGTACCAAGTTGA-3' (SEQ ID NO:19)

CH₂b₃: 5'-GGGGTACCTGTCTATCCACGGACCAGCTGA-3' (SEQ ID NO:20).

Якщо коротко, реакційна суміш ПЛР була створена в загальному обсязі 50 мкл з наступними компонентами: 1-3 мкл кДНК, 5 пмоль суміші MJ1-3 праймерів, 5 пмоль CH2 або CH2b3 праймерів, 5 мкл 10x реакційного буфера, 1 мкл 10 мМ дНТФ, 2,5 одиниці Таq ДНК полімерази (Hoffmann-La Roche). Протокол ПЛР складався з (I) початкової стадії при 94 °C протягом 3 хв, (II) потім 30 циклів при 94 °C протягом 1 хв, 55 °C протягом 30 сек, 72 °C протягом 30 сек і (III) кінцевої стадії елонгації при 72 °C протягом 7 хв. Ампліфіковані продукти ПЛР проганяли в 2 % агарозному гелі і спостерігали дві основні смуги: смугу приблизно 850 п.о. (пара основ), що відповідає звичайному IgG, і другу смугу приблизно 600 п.о., відповідну V_HH-CH2 області важкого ланцюга верблужого антитіла. Менші смуги вирізали і очищали з використанням набору для гель екстракції QIAquick (Qiagen) і повторно ампліфікували в другій ПЛР в загальному обсязі 50 мкл з використанням 1 мкл (30 нг) матричної ДНК, 5 пмоль кожного з MJ7 (5'-CATGTGTAGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC-3' SEQ ID NO: 21) і MJ8 праймерів (5'-CATGTGTAGATTCTGGCCGGCCTGGCCTGAGGAGACGGTGACCTG G-3' SEQ ID NO: 22), 5 мкл 10x реакційного буфера, 1 мкл 10 мМ дНТФ, 2,5 одиниці Таq ДНК полімерази. Протокол ПЛР складався з (I) початкової стадії при 94 °C протягом 3 хв, (II) 30 циклів при 94 °C протягом

30 сек, 57 °C протягом 30 сек і 72 °C протягом 1 хв і (III) кінцевої стадії елонгації при 72 °C протягом 7 хв. Ампліфіковані продукти ПЛР в діапазоні від 340 п.о. до 420 п.о., відповідні V_HH фрагментами важкого ланцюга антитіла, очищали з використанням набору для очищення ПЛР Qiagen QIAquick (Qiagen), розщеплювали рестриктазою SfiI (New England Biolabs) і знову очищали з використанням такого ж набору.

80 мкг фагмідного вектора pMED1 (Arbabi-Ghahroudi et al, 2009b) розщеплювали за допомогою SfiI протягом ночі при 50 °C. Для того, щоб звести до мінімуму самолігування, додавали 20 одиниць рестриктаз XhoI і PstI, щоб відсікти вирізані фрагменти, і реакцію розщеплення інкубували протягом ще 2 год. при 37 °C. 60 мкг розщепленої фагмідної ДНК лігували з 6 мкг розщеплених (SfiI протягом 5 год. при 50 °C) V_HH фрагментів (мольне співвідношення 1:1) протягом 3 год. при кімнатній температурі з використанням системи швидкого ДНК лігування LigaFast (Promega) відповідно до інструкції виробника. Лігоровані плазмиди очищали з використанням набору для очищення ПЛР QIAquick (Qiagen), елюювали в кінцевому обсязі 100 мкл і трансформували в електрокомпетентні TG1 E.coli (Stratagene), використовуючи 5 мкл аліквоти лігорованої ДНК на реакцію трансформації, як описано раніше (Arbabi-Ghahroudi et al, 2009b). Розмір бібліотеки було визначено як 5×10^7 , як описано в Arbabi-Ghahroudi et al, 2009b. 20 клонів були секвеніровані і містили всі унікальні послідовності V_HH. E.coli, що містять бібліотеку, культивували протягом 2-3 г при 37 °C, 250 оборотів в хвилину в присутності 2 % (маса/об'єм) глюкози. Потім бактерії осаджували, знову суспендували в 2xYT/Amp/Glu (2xYT середовище (екстракт дріжджів + триптон) з 100 мкг/мл ампіциліну і 2 % (маса/об'єм) глюкози) з 35 % (об/об) гліцерину і зберігали при - 80 °C в невеликих аліквотах.

Пеннінг експерименти по суті проводили як описано у Arbabi et al, 1997. Два мілілітра бібліотеки ($2,0 \times 10^{10}$ бактерій) розморожували на льоду і вирощували в 2xYT/Amp/Glu протягом приблизно 2 годин при 37 °C (A600=0, 4-0,5). E.coli були згодом інфіковані 20x надлишком M13K07 хелпер-фага (New England Biolabs) протягом 1 год. при 37 °C. Потім культуру центрифугували при 4 °C і гранули інфікованих бактерій повторно суспендували в 200 мл 2xYT/Amp з 50 мкг/мл канаміцину і інкубували при 37 °C і 250 оборотах в хвилину. Частинки фага в супернатанті культури інкубували з 1/5 об'єму 20 % ПЕГ (поліетиленгліколь) 8000/2,5M NaCl на льоду протягом 1 год. і центрифугували при 10000 оборотах на хвилину протягом 15 хв. Гранули фага повторно суспендували в 1,5 мл стерильному PBS, титрували і використовували в якості вхідного фага для пеннінга. Для раунду пеннінга 1 96-лункові планшети Maxisorp™ покривали 10 мкг рекомбінантного IGF1R⁹³³-His на лунку в 100 мкл PBS протягом ночі при температурі 4 °C. Лунки промивали PBS і блокували PBS з 1 % (маса/об'єм) казеїном протягом 2 годин при температурі 37 °C PBS і блокували PBS з 1 % (маса/об'єм) казеїном протягом 2 годин при температурі 37 °C. Приблизно 10^{12} фагів були додані в лунки після блокування і інкубовані протягом 2 год. при 37 °C. Після 10-кратного промивання PBS/0,1 % (об/об) Tween-20 зв'язані фаги елюювали за допомогою 0,1 M триетиламіну, нейтралізували (50 мкл 1M Tris-HCl, pH 7,4) і змішували з експоненціально зростаючою TG1 E.coli. Проводили титрування елюйованого фага і інфіковані бактерії повторно інфікували M13K07 і вирощували протягом ночі при 37 °C. Очищений фаг вирощеної протягом ночі культури використовували в якості вхідного для наступного раунду пеннінга. Пеннінг продовжували ще протягом трьох раундів. Використовували той же самий протокол, як описано вище, за винятком того, що кількість рекомбінантного антигену, використаного для покриття чашок, було зменшено до 7 мкг, 5 мкг і 5 мкг для другого, третього і четвертого раундів пеннінга відповідно.

Окремі колонії TG1, отримані після четвертого раунду пеннінга, були піддані фаговому ELISA скринінгу, по суті як описано в іншому документі (Doyle et al, 2008), за винятком того, що 5 мкг/мл IGF1R⁹³³-His рекомбінантного антигену, що використовували для покриття мікротитраційних планшетів. Всі позитивні клони були спрямовані на секвенування ДНК. Унікальні клони, які давали високі фагові ELISA сигнали, були обрані для великомасштабної експресії і очищення з використанням відомих методів (Приклад 4). Клон з дубльованим IGF1R-3 був ідентифікований для подальшого вивчення; його послідовність показана нижче.

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFVGHITWSRGTTTRVASS VKDRFTISRDSAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAASTFLRLPEESAYTYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5)

Приклад 4: Гуманізація IGF1R-4

Для того щоб уникнути потенційної імуногенності IGF1R-4, отриманого від лами, при застосуванні в якості переносника терапевтичних агентів через ГЕБ, отримані від верблюда sdAb були "гуманізовані" мутацією "верблюжих" залишків в V_HH. Слід зазначити, що з метою гуманізації нумерацію за Kabat (Kabat et al, 1991) використовували для ідентифікації CDR залишків.

3D-моделювання структури верблужих V_HH. Матричні структури, аналогічні IGF1R-4 V_HH, були ідентифіковані за допомогою пошуку BLAST в Protein Data Bank (PDB). 3D структура IGF1R-4 була апроксимована за допомогою моделювання гомології, заснованого на 4KRPJB (код PDB | ID ланцюга) в якості основної матриці, з додатковими даними від 4FHBID. Структура IGF1R-4 V_HH була потім побудована шляхом введення мутації основної структури матриці послідовності IGF1R-4; це включало 35 мутації в різних позиціях. Модель IGF1R-4 V_HH була потім вдосконалена шляхом енергетичної мінімізації за допомогою AMBER силового поля і ступеневої звільнення обмежень, починаючи від CDR петель, які були послаблені в першу чергу, і до важких атомів основного ланцюга каркасної області, яка була повністю розслаблена лише на останній стадії. CDR-H3 петля моделі V_HH потім була доопрацьована шляхом конформаційної вибірки Монте-Карло-мінімізації (MCM), в якій двогранні кути в CDR-H3 області відбиралися з подальшою мінімізацією енергії.

Вибір каркасу людських важких ланцюгів для верблужої CDR. Каркас людського важкого ланцюга був обраний стандартним порівнянням гомології послідовностей в базах даних зародкової лінії людини (VBASE), в порівнянні з іншими базами даних послідовностей (GenBank і SwissProt), а також в порівнянні з консенсусними людськими каркасними послідовностями. Пошуки BLAST були проведені, щоб отримати збіги послідовностей з найвищою гомологією тільки в каркасній області (тобто, виключаючи CDR), з зіставленням довжини CDR. Найближчі людські каркаси, певні для IGF1R-4 V_HH, відповідали людській VH-3 підгрупі. Кілька людських зародкових каркасних VH-3 послідовностей, які найбільш близькі до IGF1R-4 V_HH, також були збережені на додаток до людській VH-3 консенсусної послідовності. У IGF1R-4 V_HH каркасних послідовностях 18 мутацій необхідно для того, щоб прийти до людській VH-3 консенсусної послідовності для 100 % гуманізації каркасу.

Визначення каркасних залишків для зворотних мутацій. Модель IGF1R-4 V_HH і її повністю гуманізований аналог характеризувалися для оцінки індексу людяності, індексу схильності до контакту з антигеном, для визначення CDR, канонічних залишків, незвичайних каркасних залишків, потенційних сайтів глікозилювання, прихованих залишків, залишків зони верньєри, а також близькості до CDR. Аналіз цих даних дозволив сконструювати кілька гуманізованих варіантів для анти-IGF1R V_HH, причому кожен варіант мав різну кількість зворотних мутацій до батьківських верблужих залишків в різних позиціях. 6 гуманізованих варіантів були розроблені для IGF1R-4 V_HH (IGF1R-4_H1-IGF1R-4_H6), де варіанти містять до 10 зворотних мутацій. Деякі з цих верблужих залишків із зворотними мутаціями були приховані всередині ядра домену V_HH і, отже, не індукували імунну відповідь.

Приклад 5: Експресія і очищення обраних конструктів V_HH

IGF1R-4, визначені в Прикладі 3, і гуманізовані варіанти, сконструйовані в Прикладі 4 (спільно іменовані тут "V_HH конструкти") субклонували в експресуючі плазміди для білкової експресії і очищення.

Очищали р фагмідний вектор, що містить ДНК V_HH IGF1R-4 клону, з використанням набору Miniprep (Qiagen). IGF1R-зв'язуючий V_HH IGF1R-4 був ампліфікований шляхом ПЛР з фагмідного вектора pMED1 з додаванням N-термінального сайту розщеплення BbsI і сайту розщеплення BamHI на C-кінці, з використанням праймерів:

5'-TATGAAGACACCAGGCCAGGTAAAGCTGGAGGAGTCT-3" (прямий; SEQ ID NO:23)

5'-TTGTTTCGGATCCTGAGGAGACGGTGACCTG-3" (зворотній; SEQ ID NO:24)

ПЛР-фрагмент і експресійний вектор pSJF2H розщеплювали рестриктазами BbsI і BamHI (NEB) у відповідності з інструкцією виробника. Після розщеплення кожен розщеплений IGF1R-4 V_HH фрагмент лігували з розщепленим експресійним вектором pSJF2H з використанням способів, аналогічних тим, які описані у Arbabi-Ghahroudi et al. (2009b); Продукти лігування були потім трансформовані в електрокомпетентні TG1 E.coli. Клоні були відібрані на LB-чашках з агаром + 100 мкг/мл ампіциліну і верифіковані секвенуванням ДНК.

Гуманізовані клони були синтезовані і безпосередньо клоновані в pSJF2H аналогічно тому, як описано вище, і потім трансформовані в TG1 E.coli і відібрані, як описано вище.

Експресія білка. Всі конструкти IGF1R-4 V_HH експресували в TG1 E.coli. Отриману протягом ночі культуру в LB/Amp/Glu середовищі (LB середовищі з додаванням 100 мкг/мл ампіциліну і 1 % глюкози) пересівали при розведенні 1:100 в 1 л LB/Amp/Glu. Експресію білка індукували при OD₆₀₀ (оптична щільність) 0,8-0,9 додаванням IPTG (ізопропілтіоґалактозид) до кінцевої концентрації 0,2 мМ. Культуру вирощували при 220 оборотів в хвилину протягом ночі при температурі 37 °С. Бактерії гранулювали центрифугуванням при 6000 обертах на хвилину протягом 12 хв; гранули повторно суспендували в 35 мл холодного буфера TES (0,2 М Трис-Cl pH 8,0, 20 % сахарози, 0,5 мМ ЕДТА (етилендіамінтетраоцтової кислоти)). Суспензію інкубували на льоду і струшували через кожні 10 хв протягом 1 години. Потім додавали 45 мл холодного

TES (1/8 обсягу від загального обсягу) і негайно струшували протягом 1 хвилини і протягом 15 секунд кожні 10 хв після цього протягом 1 години для вилучення білка з періплазми. Отриманий супернатант, що містить V_HH , фільтрували через 0,22 мкм мембрану і діалізували протягом ночі за допомогою буфера А іммобілізаційної метал-афінної хроматографії (IMAC) (10 mM HEPES(4-

5 (2-гідроксиетил)піперазин-1-етансульфонової кислота) pH 7,0, 500 mM NaCl). Білок очищали з використанням колонки HiTrap Chelating HP (GE Healthcare), як описано раніше (Arbabi-Ghahroudi 2009b). Елюйовані білкові фракції аналізували за допомогою SDS-PAGE і вестерн-блот, перш ніж діалізували проти PBS, як описано раніше (Arbabi-Ghahroudi 2009b). Очищені білкові фракції об'єднували і діалізували проти PBS+3 mM EDTA, і визначали концентрацію білка.

Приклад 6: Біофізична характеристика анти-IGF1R V_HH IGF1R-4

Анти-IGF1R V_HH IGF1R-4 конструкти, експресовані і очищені в Прикладі 4, були охарактеризовані за допомогою ексклюзійної хроматографії (SEC), аналізу температури плавлення і поверхневого плазмонного резонансу.

15 Ексклюзійна хроматографія: ексклюзійна хроматографія з використанням Superdex™ 75 (GE Healthcare) була проведена для усунення будь-яких можливих агрегатів до початку аналізу поверхневого плазмонного резонансу (SPR). В якості робочого буфера використовували 10 mM HEPES, pH 7,4, що містить 150 mM NaCl, 3 mM EDTA і 0,005 % P20. Ексклюзійна хроматографія: ексклюзійна хроматографія з використанням Superdex™ 75 (GE Healthcare) була проведена для

20 усунення будь-яких можливих агрегатів до початку аналізу поверхневого плазмонного резонансу (SPR). В якості робочого буфера використовували 10 mM HEPES, pH 7,4, що містить 150 mM NaCl, 3 mM EDTA і 0,005 % P20. Концентрації фракцій, використовуваних для SPR аналізу, визначали шляхом вимірювання оптичної щільності при довжині хвилі 280 нм. За результатом аналізу SEC все IGF1R-4 V_HH конструкти крім H1 були мономірними в розрахунку на елююючий обсяг у порівнянні зі стандартами (Фіг. 3 А). IGF1R-4 H1 був виключений з подальших оцінок.

Температура плавлення: Термічну стабільність IGF1R-4 V_HH і гуманізованих конструктів оцінювали з використанням вимірювання температури плавлення (T_m) за допомогою CD-спектроскопії. Спектрополяриметр Jasco J-815, оснащений термоелектричною системою контролю температури типу Peltier (Jasco, Easton, MD, USA), був використаний для проведення експериментів. Використовувалася CD-кювету з довжиною шляху 1 мм. Спектри реєстрували в діапазоні довжин хвиль від 180 до 260 нм зі швидкістю сканування 50 нм/хв, цифровий час інтегрування (DIT) 4 сек, ширина смуги 1 нм, крок даних 1 нм і час інтегрування 1 сек. Для вимірювання температури плавлення або T_m (Greenfield, 2006a; 2006b) спектри CD були записані в температурному діапазоні від 30 °C до 96 °C. Всі спектри CD були відняті з бланкового значення, відповідного спектрами буфера. Виміри проводилися з концентрацією 50 мкг/мл V_HH в 100 mM натрій-фосфатному буфері, pH 7,4. Денатурацію білка, викликану нагріванням, контролювали при 210 нм для всіх варіантів. Фракція фолдинга (ff) була отримана за формулою, описаною в (Greenfield, 2006a; 2006b);

40 $ff = ([\Theta]_T - [\Theta]_U) / ([\Theta]_F - [\Theta]_U)$ формула I

де $[\Theta]_T$ є молярною еліптичністю при будь-якій температурі, $[\Theta]_F$ являє собою молярну еліптичність повністю укладеного білка при температурі 30 °C і $[\Theta]_U$ є молярна еліптичність розгорнутого білка при 90 °C. Температуру плавлення (T_m) отримували в середній точці кривої розгортання (фракція фолдинга (ff) в залежності від температури) за допомогою підбору кривої нелінійної регресії (сигмовидне рівняння Больцмана) з використанням графічного програмного забезпечення GraphPad Prism (версія 4.02 для Windows). Температури плавлення (T_m) V_HH були визначені на основі даних еліптичності, які передбачають два стану системи, що знаходиться у відповідності з кривими денатурації, що спостерігаються, відповідними до різкого переходу до денатурації. Значення T_m були взяті в середній точці сигмоїдальних кривих денатурації фракції фолдинга (ff) в залежності від температури.

Результати показані на Фіг. 3 В. Температури плавлення гуманізованих V_HH H3, H4 і H5 були покращені (підвищені) в порівнянні з IGF1R-4 V_HH , що передбачає поліпшені біофізичні властивості. Гуманізовані конструкти H2 і H6 мали нижчу температуру плавлення в порівнянні з IGF1R-4 V_HH . На відміну від IGF1R-4 V_HH жоден з гуманізованих V_HH не зазнавав рефолдингу після теплового впливу.

Поверхневий плазмонний резонанс (SPR): Зв'язування мономірних IGF1R-4 V_HH конструктів з іммобілізованим рекомбінантним людським IGF1R (Приклад 1) визначали за допомогою SPR з використанням BIACORE 3000 (GE Healthcare). Приблизно 3000 резонансних одиниць (RU) рекомбінантного людського IGF1R іммобілізували на сенсорному чіпі CM5. Іммобілізацію проводили при концентрації 10 мкг/мл в 10 mM ацетат при pH 4,0 з використанням набору для

- зв'язування аміну, що поставляється виробником. Решта сайтів зв'язування блокували за допомогою 1 М етаноламіну з pH 8,5. Блокована етаноламіном поверхня була використана в якості референсної поверхні. Для досліджень зв'язування аналізи проводилися при 25 °C в 10 мМ HEPES, pH 7,4, що містить 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA і 0,005 % поверхнево-активна речовина P20 (поліоксиетіленсорбітан; GE Healthcare). Різні концентрації IGF1R-4 V_{HH} вводили через іммобілізований людський IGF1R і референсні поверхні при швидкості потоку 20 мкл/хв. Поверхню регенерували 10 мМ гліцином, pH 2,0, з часом контакту 24 секунди. Дані були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення BIAevaluation 4.1 (GE Healthcare). Сенсограмми на Фіг 3C показують, що дані співвідносяться з моделлю 1:1, що дає K_D і "швидкості дисоціації", показані в Таблиці 1. Це вказує на те, що IGF1R-4 і гуманізовані варіанти є високоафінними однодоменими антитілами, які зв'язуються з позаклітинним доменом людського IGF1R.

Таблиця 1

Афінність IGF1R-4 конструктів до людського IGF1R, визначена за допомогою SPR

	K _D (нМ)	k _d (с ⁻¹)
IGF1R-4	0,32	2,9 × 10 ⁻⁴
IGF1R-4 H2	1,07	6,1 × 10 ⁻³
IGF1R-4 H3	0,39	3,4 × 10 ⁻⁴
IGF1R-4 H4	0,45	3,9 × 10 ⁻⁴
IGF1R-4 H5	0,52	4,6 × 10 ⁻⁴
IGF1R-4 H6	0,52	3,8 × 10 ⁻⁴

- Аналізи SPR були в подальшому використані для демонстрації того, що IGF1R-4 V_{HH} не зв'язується з тим же епітопом на рецепторі що і природний ліганд IGF-1 (Фіг. 3D). Експеримент планували, проводили і аналізували, як описано вище. Зв'язування з поверхнею свіжоіммобілізованого людського IGF1R вивчалось шляхом ін'єкції людського ліганду IGF1 при концентрації 25xK_D з подальшої спільної ін'єкцією IGF1R-4 при концентраціях 25xK_D при швидкості потоку 20 мкл/хв і часом ін'єкції 5 хвилин. Поверхні регенерували промиванням робочим буфером. Природний ліганд IGF1 зв'язував рецептор з насиченням, що досягає 70RU; IGF1R-4 V_{HH} зв'язувався з комплексом IGF1R-IGF1 з очікуваним -265RU (в відносних одиницях; насичення зв'язування). Одночасне зв'язування IGF1R-4 V_{HH} і IGF1 з рецептором показує, що вони обидва зв'язуються з різними епітопами.
- Перефрмувавши реактивність зв'язування IGF1R-4 з людським інсуліновим рецептором також оцінювали за допомогою SPR. Експеримент планували, проводили і аналізували, як описано вище. Якщо коротко, крім людського IGF1R, приблизно 4000 резонансних одиниць (RU) рекомбінантного людського інсулінового рецептора (R & D Systems) іммобілізували на окремій клітці на сенсорному чіпі CM5. Поверхні обробляли різними концентраціями IGF1R-4 (0,5-50нМ). У той час як зв'язування з IGF1R можливо було спостерігати вже при 0,5нМ IGF1R-4, зв'язування з поверхнею інсулінового рецептора не спостерігалось навіть при 50 нМ (Фіг. 3 E), що передбачає, що IGF1R-4 не може зв'язуватися з інсуліновим рецептором.

Приклад 7: Поглинання IGF1R-4 ендотеліальними клітинами головного мозку

- Для того, щоб визначити, поглинається чи IGF1R-4 клітинами, клітини svARBEC інкубували з Су5-5-міченим IGF1R-4.

- IGF1R-4 V_{HH} мітили NHS-Cy5.5. Мічення проводилося через стійкий амінний зв'язок між первинними амінами (на N-кінці і/або на лізінових бічних ланцюгах білка) і NHS складного ефіру. Як правило, 10 % об/об 1М карбонатного/бікарбонатного буфера (759 мМ бікарбонату, 258 мМ карбонату) pH 9,3 додавали в 4 мг V_{HH}, приготованого в PBS (1,06 мМ KH₂PO₄, 154 мМ NaCl, 5,6 мМ Na₂HPO₄), pH 7,4, і доводили до кінцевої концентрації 4 мг/мл. NHS-Cy5.5, розчинений в DMSO (диметилсульфоксид) при 10 мг/мл, додавали при 2X мольному співвідношенні барвника до білка. Суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 2 год. з декількома інверсіями в 1,5 мл мікроцентрифужній трубці. Після інкубації незв'язаний барвник і бі-продукти реакції фільтрували за допомогою знесолювальних колонок для центрифугування Zeba, 7K MWCO (Pierce) і вимірювали за допомогою спектрофотометра Beckman DU530 (компанії Beckman Coulter). Cy5.5-мічені IGF1R-4 або FC5 як позитивний контроль (1 мг/мл) інкубували з SV40 імморталізованих ендотеліальними клітинами мозку щура (svARBEC) при 4 °C (Фіг. 4, верхні блоки), що дозволяло протікати тільки пасивному, неспецифічному транспортному механізму, або при температурі 37 °C (Фіг. 4, нижні блоки) для протікання активного транспорту, такого як

рецепторно-опосередкований ендоцитоз. Спільне фарбування агглютинином зародків пшениці і DAPI проводили для візуалізації поверхні клітини і ядра відповідно. Клітини спостерігали під флуоресцентним мікроскопом і отримували зображення.

У разі інкубації при 4 °C IGF1R-4 був виявлений поза клітинами, спільно локалізується з клітинною мембраною, пофарбованої агглютинином зародків пшениці. На противагу цьому, при інкубації при 37 °C IGF1R-4 накопичувався в везикулах всередині клітин, ймовірно ендосомах, що передбачає, що поглинання антитіл клітинами відбувається шляхом активного транспортного механізму. Подібна поведінка спостерігалася і для FC5, для якого раніше було показано, що він потрапляє в клітини за допомогою енергозалежного ендоцитозу за допомогою везикул з клатриновим покриттям (Abulrob *et al.* 2005).

Приклад 8: Отримання IGF1R-4-mFc конструктору

Конструктори, які містять IGF1R-4 V_{HH}, злиті з кристалізуємим фрагментом мишачого антитіла (Fc; mFc2b), отримували, експресували і виділяли. Послідовність IGF1R-4-mFc конструктору показана на Фіг. 5A, схема молекули показана на Фіг. 5B. Злитий білок також містив N-термінальний сигнальний пептид (MEFGLSWVFLVAILKGVQC; SEQ ID NO: 37), який не показаний в послідовності на Фіг. 5A.

IGF1R-4 кДНК клонували в експресійний вектор ссавців рТТ5 (Durocher, 2002), що містить мишачий фрагмент Fc2b. Поліплекси отриманого вектора були попередньо отримані змішуванням 25 мл розчину плазмідної ДНК, що містить 187,5 мкг рТТ5-IR5mFc2b, 56,25 мкг рТТ-АКТdd (активоване мутант протеїнкінази В), 18,75 мкг рТТo-GFP (для контролю ефективності трансфекції) і 112,5 мкг ДНК яєчок лосося (Sigma-Aldrich); і 25 мл розчину PEI (поліетиленімін), що містить 1,125 мг PEIproTM (PolyPlus Transfection), обидва зроблені в F17 середовищі. Суміш інкубували протягом 10 хвилин перед додаванням до культури клітин. 450 мл культури клітин CHO, стабільно експресують усичений білок EBNA1 (CHO-3E7), вирощених в середовищі F17 (Invitrogen), трансфіковані з 50 мл поліплексів. Через двадцять чотири години після трансфекції в культуру додавали 12,5 мл 40 % (маса/об'єм) розчину триптону N1 (Organotechnie) і 1,25 мл 200 мМ розчину вальпроєвої кислоти. Культуру збирали через 8 діб після трансфекції і очищали центрифугуванням. Очищену середу фільтрували через 0,22 мкм мембрану перед нанесенням на колонку, заповнену 5 мл смоли протеїну-A MabSelect SuRe (GE Healthcare). Після завантаження колонку промивали 5 об'ємами натрій-фосфатного буфера рН 7,1 (PBS) і антитіла елюївали 100 мМ буфером з цитратом натрію рН 3,0. Фракції, що містять елюйовані антитіла, об'єднували і зміну буфера здійснювали шляхом завантаження на знесолювальних колонку Econo-Pac (BioRad), калібровану в PBS. Знесолені антитіла потім стерильно фільтрували при пропусканні через Millex GP (Millipore) фільтр (0,22 мкм) і аліквотували.

Приклад 9: Транспорт IGF1R-4 через модель гематоенцефалічного бар'єру in vitro

Для того, щоб оцінити, чи проходить IGF1R-4 V_{HH}, його гуманізовані версії (H2-H6) і IGF1R-4-mFc (Приклад 8) через гематоенцефалічний бар'єр, було проведено аналіз in vitro, як описано нижче. Блок-схема експерименту показана на Фіг. 6A.

SV40-іморталізовані ендотеліальні клітини мозку дорослого щура (Sv-ARBE) були використані для створення моделі гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) in vitro, як описано раніше (Garberg *et al.*, 2005; Haqqani *et al.*, 2012). Sv-ARBE (80000 клітин/мембрану) висівали на 0,1 мг/мл вставки культури тканини, покриті кологеном типу I хвоста щурів (розмір пір - 1 мкм; площа поверхні 0,9 см², Falcon) в 1 мл середовища росту. Нижня камера вузла вставки містила 2 мл середовища росту, доповненої кондиціонованим середовищем іморталізованих неонатальних щурячих астроцитів в співвідношенні 1:1 (об/об). Еквімолярні кількості (5,6 мкм) позитивних (FC5) або негативних контролів (A20.1, Clostridium difficile токсин А що зв'язуючих V_{HH}; і EG2, EGFR зв'язуючих V_{HH}), IGF1R-4 V_{HH}, гуманізувані версії (H2-H6) або IGF1R-4-mFc тестували на їх здатність проникати через цю щурячу модель ГЕБ in vitro. Після експозиції еквімолярних кількостей sdAb на люмінальному боці ГЕБ, через 15, 30 і 60 хв з аблюмінального боку були взяті зразки. Вміст sdAb в кожному зразку потім кількісно оцінювали за допомогою мас-спектрометрії (MRM-ILIS), як описано у Haqqani *et al.* (2012)) (див. опис методу нижче).

Визначення коефіцієнту ефективної проникливості: кількісні значення можуть бути безпосередньо нанесені або значення P_{app} (коефіцієнт ефективної проникності) можуть бути визначені за заданою формулою (Фіг. 6 A) і нанесені на графік. Значення P_{app} зазвичай використовується для визначення здатності молекули до проходження гематоенцефалічного бар'єру. $[Q]/dt$ = загальна сума в приймальному відділенні в залежності від часу; A = площа моношару клітин; CO = початкова концентрація дозованого розчину, значення P_{app} є мірою питомої проникності зв'язування через ендотеліальний моношар мозку.

Результати показані на Фіг. 6 B-D. Наведені результати є середніми значеннями P_{app} , отриманими з декількох незалежних експериментів. Обидва негативних контролю мають дуже низьке значення P_{app} , вказуючи, що неспецифічний транспорт або парацелюлярне перенесення цих $V_{H}H$ через модель ГЕБ мінімальні. IGF1R-4 $V_{H}H$ має високе значення P_{app} , що вказує на високу швидкість перенесення в *in vitro* моделі ГЕБ. P_{app} для IGF1R-4 $V_{H}H$ був в 4 рази вище, ніж у позитивного контролю - ГЕБ-проникного $V_{H}H$ FC5 (WO02/057445). Результати показують, що IGF1R-4 піддається полегшеному міжклітинному транспорту через ендотеліальні клітини мозку *in vitro* і може мати аналогічні властивості *in vivo*. Гуманізовані IGF1R-4 $V_{H}H$ варіанти H3, H4 і H5 показали схожі (H3) або злегка знижені значення P_{app} в порівнянні з IGF1R-4 $V_{H}H$; H2 варіант демонстрував значне зниження здатності проходити ГЕБ модель *in vitro*, тоді як H6 варіанти повністю втратили цю здатність, демонструючи значення P_{app} як у внутрішнього контролю $V_{H}H$ A20.1 (Фіг. 6 C), і були виключені з подальших досліджень. Значення P_{app} для IGF1R-4mFc (Фіг. 6 D) було схоже зі зниженим в 6 разів значенням IGF1R-4 $V_{H}H$ (Фіг. 6 B), бо свідчить про те, що IGF1R-4 може переносити великі (розміром з антитіло) молекули через ГЕБ. Значення P_{app} позитивного контролю FC5mFc було в 3 рази нижче, ніж значення для IGF1R-4 mFc. Варто відзначити, що конструкти, які містять IGF1R-5 або гуманізовану версію, зв'язані з молекулою вантажу (молекулярна маса ~ 110 кДа або 180 кДа), також перетинали гематоенцефалічний бар'єр (дані не показані).

Абсолютна визначення кількості $V_{H}H$ з використанням способу MRM-ILIS. Дані способи описані у Haqqani et al. (2012). Якщо коротко, для проведення SRM (моніторингу селективних реакцій, також відомого як моніторинг множинних реакцій (MRM)) аналізу $V_{H}H$ кожен $V_{H}H$ спочатку аналізували за допомогою nanoLC-MS/MS з використанням залежного від даних збору для ідентифікації всіх іонізуючих пептидів. Для кожного пептиду були обрані від 3 до 5 найбільш інтенсивних іонних фрагментів. Початковий аналіз SRM проводили для моніторингу цих фрагментів в аттомольних кількостях розщеплення (приблизно 100-300 Амол). Фрагменти, які показали співвідношення інтенсивності при низьких кількостях (тобто мали $r^2 \geq 0,95$ по Пірсону в порівнянні з більш високими кількостями), вважалися стабільними і були обрані для кінцевого аналізу SRM. Для подальшої оптимізації аналізу час елювання для кожного пептиду було також включено, причому пептиди, які мали близькі m/z (відношення маси до заряду) і час елювання не вибирали.

Типовий мультиплексований аналіз SRM $V_{H}H$ в клітинних середовищах або біологічних рідинах (сироватці або спинномозкової рідини (CSP)) включав в себе впорскування відомої кількості ILIS (ін'єкція інсуліну лізпро) (0,1-10 нМ) з наступною ін'єкцією 100-400 нг CSP або білків культурального середовища (0,3-1 мкл) або приблизно 50-100 нг сироваткових білків (1-3 нанолітра) в систему nanoLC-MS. Попередник m/z кожного цільового пептидного іона був обраний з іонної пастки (а решта незв'язані іони були відкинуті) у вказане для мішені час елювання, з подальшою індукованою зіткненнями дисоціацією (CID) фрагментацією і вибором тільки потрібних іонних фрагментів в іонної пастці для моніторингу за допомогою детектора. Для кількісного аналізу необроблені файли, створені LTQ (ThermoFisher), перетворювали в стандартний формат даних мас-спектрометрії mzXML і інтенсивності витягували за допомогою програмного забезпечення Q-MRM (Quantitative-MRM; see Haqqani et al. 2012), яке є модифікованою версією програмного забезпечення MatchRx. Для кожного $V_{H}H$ витягнуті іонні хроматограми генерували для кожного з його іонних фрагментів, які складалися з об'єднаних інтенсивностей в межах 0,25 Да фрагмента m/z протягом всього часу елювання. Для того, щоб отримати остаточне значення інтенсивності для кожного фрагмента, були підсумовані всі інтенсивності протягом 0,5 хв очікуваного часу утримування. $V_{H}H$ був визначений як виявляється в зразку, якщо фрагменти щонайменше одного з його пептидів показали очікувані співвідношення інтенсивності, тобто кінцеві значення інтенсивності показали сильну кореляцію Пірсона $r \geq 0,95$ і p менше 0,05 у порівнянні з кінцевими значеннями інтенсивностей відповідного чистого $V_{H}H$.

Зразки, що містять суміші $V_{H}H$ (середа, сироватка, CSP) відновлювали, алкілювали і розщеплювали трипсином, як описано раніше (Haqqani et al., 2012; Gergov et al., 2003). Продукти розщеплення (триптичні пептиди) підкислюють оцтовою кислотою (кінцева концентрація 5 %) і аналізували на зворотно-фазовому nanoAcquity UPLC (надефективну рідинний хроматограф) (Waters, Milford, MA) в поєднанні з мас-спектрометром LTQ XL ETD або LTQ Orbitrap ETD (ThermoFisher, Waltham, MA). Потрібні аліквоти зразка ін'єктували і завантажували в 300 мкм I.D. * 0,5 мм 3 мкм RepMaps C18 пастку (ThermoFisher), потім елювали на 100 мкм I.D. * 10 см 1:07 мкм BEH130C18 nanoLC колонці (Waters) з використанням градієнта 0 % - 20 % ацетонітрилу (в 0,1 % форміат) протягом 1 хвилини, 20 % - 46 % в 16 хв, і 46 % - 95 % протягом 1 хв при швидкості потоку 400 нл/хв. Елюйовані пептиди іонізували в мас-

спектрометрі з іонізацією електророзпиленням (ESI) для MS/MS і SRM аналізів з використанням CID для фрагментації пептидних іонів. CID проводили з гелієм в якості газу зіткнення при нормованій енергії зіткнення 35 % і 30 мс часом активації. Час іонної ін'єкції в лінійну іонну пастку було скориговано за допомогою інструменту з цільовим значенням автоматичного контролю посилення (AGC) 6×10^3 і максимальним часом акумуляції 200 мс.

Дані $V_{H/H}$ -специфічні пептиди, які використовуються для детектування та кількісного визначення кожного $V_{H/H}$ в мультиплексному аналізі, наведені в Таблиці 2.

Таблиця 2

Пептиди, що використовуються при nanoLC-SRM детектуванні FC5, FC5-ILIS, EG2, A20.1, IGF-1R-5 і альбуміну. (A) в різних описаних дослідженнях аналізи були мультиплексовані в різних комбінаціях для одночасного спостереження в одному і тому ж зразку; (B) важко-мічений пептид; (C) межі детектування та кількісного визначення SRM для кожного пептиду становили 1,5-2,5 нг/мл. 1 нг/мл відповідає приблизно 60-70 пМ $V_{H/H}$. A20-1, як описано у in Hussack et al, 2011 b; EG2 як описано у Iqbal et al, 2010 року.

Білок	Сигнатури	SEQ ID NO:	Унікальний
IGF1R-4	EFVGHITWSR	25	Так
	LSCEVSGGTVSPTAMGWFR	26	Так
FC5	ITWGGDNTFYNSVK	27	Так
FC5-ILIS	ITWGGDNTFYNSVK ^(b)	27	Так
A20.1	TTYADSVK	28	Так
	EFVAAGSSTGR	29	Так
	TFSMDPMAWFR	30	Так
	DEYAYWGQGTQVTVSSGQAGQGSEQK	31	Так
EG2	DFSDYVMGWFR	32	Так
	LEESGGGLVQAGDSLRL	33	Так
	NMVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVNSAGTYVSPR	34	Так
Альбумін	APQVSTPTLVEAAR	35	Так

Приклад 10: In vivo і ex-vivo оптична візуалізація

Для визначення того, чи накопичується IGF1R-4 $V_{H/H}$ в мозку після внутрішньовенного (iv) введення, IGF1R-4 $V_{H/H}$ і негативний контроль A20.1 $V_{H/H}$ кон'юговані з флуоресцентним індикатором ближньої інфрачервоної області Cy5.5 і очищали як описано в Прикладі 7. 2,5 мг/кг IGF1R-Cy5.5 або A20.1 Cy5.5 (в 150 мкл обсязі) вводили в хвостову вену CD-1 голих мишей, і живих тварин досліджували в положенні лежачи на преклінічному візуалізаторі eXplore Optix MX2 (Advanced Research Technologies, QC) через 30 хв після ін'єкції. Через годину після ін'єкції тварини були анестезовані 2 % ізофлураном (Baxter Canada, Mississauga, ON, Canada), була проведена серцева пункція і 10 мл фізіологічного розчину (Baxter Canada, Mississauga, ON, Canada), доповненого 1 ЕУ/мл гепарину (Organon, Toronto, ON, Canada) перфузували з тієї ж голки зі швидкістю 2 мл/хв для видалення крові (що було встановлено появою рідини, вільної від крові, на місці розрізу правого шлуночка). Мозок після перфузії видаляли і візуалізували ex-vivo з використанням eXplore Optix. Протоколи візуалізації докладно описані в Iqbal et al., 2011 року.

Результати показані на Фіг 7. миші, яким вводили Cy5.5-IGF1R-4, показали підвищений оптичний сигнал в області голови in vivo (верхні блоки, стрілка) і ex-vivo в мозку після перфузії (нижні блоки, стрілки), в той час як Cy5.5-A20.1-ін'єктування миші показали тільки низький фоновий сигнал. Ці дані свідчать про те, що IGF1R-4 $V_{H/H}$ може доставляти візуалізуючий засіб (Cy5.5, 1 кДа) через гематоенцефалічний бар'єр in vivo.

Приклад 11: Кон'югація IGF1R-4 з галаніном

Для того, щоб визначити, чи здатний IGF1R-4 $V_{H/H}$ перетинати гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) в in vivo і 'переносити' через ГЕБ молекулу, яка не може перетнути ГЕБ самостійно, нейропептид Галанін був хімічно кон'югованими з IGF1R-4 $V_{H/H}$ або з IGF1R-4-mFc і системно введений. Галанін є нейроактивним пептидом, який виробляє знеболюючу дію шляхом зв'язування GalR1 і GalR2, що експресуються в тканини головного мозку. При периферійному

введенні Галанін не має знеболювальної дії, оскільки він не може перетнути ГЕБ сам по собі (Robertson et al., 2011).

IGF1R-4 V_HH був кон'югований з фрагментом щурячого Галаніну (Gal) з модифікованим цистеамідом С-кінцем (Biomatic) (GWTLNSAGYLLGPHAIDNHRFSFSDKHGLT-цистеамід, SEQ ID NO: 36). Схема кон'югації зображена на Фіг. 8А.

Якщо коротко, 5 мг IGF1R-4 V_HH (Приклад 4) в 0,5X PBS, 2,5 мМ ЕДТА при [2 мг/мл] змішували з 436,4 мкл 2,5 мг/мл сульфосукцинімідил-4- (N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилату (сульфо-SMCC) (7,5х надлишкове мольне відношення). Потім суміш продували газоподібним азотом і інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (RT) для реагування ефірного NHS залишку сульфо-SMCC з аміногрупами V_HH. Згодом, непрореагувавший сульфо-SMCC був видалений з активованого малеїмідом IGF1R-4 V_HH з використанням 10 мл колонки 7K Zeba (Pierce). До завантаження зразка колонку промивали 3 рази 5 мл PBS і центрифугували при 1000 g протягом 2 хв. Після завантаження зразка колонку заповнювали 200 мкл PBS і центрифугували протягом 2 хв при 1000 g. Що стосується конструктів IGF1R-Fc, 5 мг піддавали взаємодії з ~ 68 мкл сульфо-SMCC (6,5х надлишкове мольне відношення) таким же чином, як описано вище.

Окремо і одночасно, Галанін з модифікованим цистеамідом С-кінцем (Gal-суа) отримували шляхом розчинення 10 мг порошку в 10 мл води без ендотоксинів, щоб отримати 1 мг/мл матковий розчин (порошок Gal-суа містив невелику кількість DTT (дітіотрієтол) для запобігання утворення дисульфідних містків під час очищення). Нарешті, додавали 100 мкл 0,5 М ЕДТА (кінцева концентрація 5мМ).

Очищені активовані малеїмідом IGF1R-4 V_HH і IGF1R-4-Fc конструкти (2,6 мл) розбавляли до 5 мл 0,5X PBS, 2,5 мМ ЕДТА, а потім 5 мл або 1 мл Gal-суа, відповідно, був доданий під час вортексування. Зразки продували азотом, герметизували і інкубували протягом ночі при температурі 4 °С. На наступний день, непрореагований Gal-суа був вилучений за допомогою колонок Amicon-15 10K і 30K (Millipore) відповідно. Зразок додавали в колонку і центрифугували при 4000 g протягом 7 хвилин до тих пір, поки об'єм не був зменшений до 5 мл. 5 мл 0,5X PBS, 2,5 мМ ЕДТА додавали до решти 5 мл зразка у вставці колонки і центрифугували знову, поки обсяг зразка не був зменшений до 4 мл. Потім кон'юговані зразки додавали в 10 мл колонку 7K Zeba (Pierce), приготувану, як описано вище, а потім центрифугували протягом 2 хв при 1000 g.

Кон'юговані зразки IGF1R-4-Gal і IGF1R-4-Fc-Gal потім проганяли в 16 % або 10 % SDS-PAGE гелі, не відновлюються та фарбували сріблом, щоб підтвердити зміни молекулярної маси після кон'югації. Реакцію титрували до досягнення співвідношення ~ від 1 до 2 молекул Галаніну на V_HH або IGF1R-Fc конструкти. Результати підтверджували приєднання Галаніну до IGF1R-4 V_HH (див. Фіг. 8 В).

Видалення ендотоксину і визначення рівнів ендотоксину: ендотоксини були видалені за допомогою Amicon Ultra колонок для центрифугування з целюлозної мембраною (Millipore), відсікаючих молекулярну масу (MWCO). В першу чергу 15 мл зразка V_HH пропускали через колонку Amicon-15-50K MWCO центрифугуванням при 4000 g протягом 10 хвилин; елюювали і збирали. Даний продукт елюювання потім додавали в колонку Amicon-15-10K MWCO і центрифугували при 4000 g 7-10 хвилин, що призводило до зменшення обсягу супернатанта з 15 мл до 7,5 мл. Обсяг супернатанта в колонці регулювали зворотно до 15 мл, додаючи PBS. Колонку центрифугували знову, як описано вище. Супернатант збирали і рівні ендотоксину вимірювали системою EndoSafe-PTS з використанням картриджів з діапазоном чутливості 10-0,1 EU/мл (одиниць ендотоксину на одиницю) (Charles River Laboratories International). 25 мкл зразка завантажували в кожну з 4 лунок на картриджі і розбавляли при необхідності. Тільки зразки з EU менше 1 на 1 мг були використані для досліджень на тваринах.

Приклад 12: Транспорт IGF1R-4-Gal з використанням моделі Харгрівса

Для того, щоб оцінити, чи переноситься IGF1R-4-Gal або IGF1R-4-mFc-Gal (Приклад 11) через гематоенцефалічний бар'єр, був використаний раніше описаний в міжнародну патентну публікації WO2011/127580 аналіз in vivo.

Була використана щуряча модель запальної гіперальгезії, схожа з описаною у Hargreaves et al. (1988). Тварин утримували в групах по три (модель Харгрівса) в поліпропіленовій клітці і надавали вільний доступ до їжі і води. Експерименти проводилися в 12 г світло-темному циклі при температурі 24 °С і відносній вологості 50±5 %. Всі процедури на тварин були схвалені Комітетом з догляду за тваринами і знаходилися відповідно до посібників Канадської ради з догляду за тваринами.

У цій моделі самцям щурів лінії Wistar 6-8 тижневого віку (діапазон ваги 230-250 г) вводили невеликі обсяги (100 мкл голкою 30-го калібру) ад'юванта Фройнда (CFA, убиті нагріванням М.

tuberculosis (Sigma), суспендовані в емульсії масло: фізіологічний розчин 1:1) в праву задню лапу під неглибокої ізофлурановою анестезією (3 %). CFA індукував вивільнення прозапальних речовин, які активували ноцірецептори і створювали стан хронічного болю і гіперальгезію (підвищена чутливість до шкідливого тепла). Затримку відсмикування лапи вимірювали за допомогою застосування теплового подразника на плантарній поверхні обох задніх лап (запалена і незапалений контрольна лапа), використовуючи плантарний пристрій Анальгезіометр для стимуляції лапи (IITC Model # 336TG Life Science, Inc.). Час, витрачений тваринам на відповідь облизування або струшування лапи, було інтерпретовано як позитивну відповідь (Затримка відсмикування лапи). Інтенсивність світла лампи була скоригована, щоб виявити базові затримки відсмикування лапи від 17 до 20 с в обох задніх лапах перед введенням CFA. Якщо відповідь не відбувався протягом 20 секунд, світловий промінь автоматично вимикався щоб уникнути пошкодження тканин і лапі присвоювався максимальний бал.

Через два дні після ін'єкції CFA і до введення сполук, тварин акліматизували в пристрої анальгезіометра протягом щонайменше 60 хв з метою зменшення стресу і запобігання помилкових позитивних відповідей. Базові умови були виміряні в обох лапах, щоб перевірити розвинений біль (теплова гіперальгезія); незапалена лапа була використана в якості контролю в порівнянні з ін'єктованою лапою. Тварини з затримкою відсмикування лапи більш ніж 6 с для "запаленої лапи" і менш ніж 17 с для "нормальної лапи", були виключені з експерименту.

Для того, щоб визначити, чи переноситься IGF1R-4-Gal через гематоенцефалічний бар'єр і чи може зв'язуватися з рецепторами-мішенями (GalR1 і 2) в паренхімі головного мозку, щури отримували одну ін'єкцію в хвостову вену IGF1R-4-Галаніну (3мг/кг) або IGF1R-4-mFc-Галаніну (2 мг/кг або 5 мг/кг) або контрольного з'єднання через три дні після ін'єкції CFA. Затримку відсмикування лапи (PWL) тестували для кожної задньої лапи (запалених і незапалених) кожні 15 хв протягом 3-х годин. Збільшення затримки відсмикування лапи вказувало на успішну індукцію анальгезії, яка може бути досягнута тільки шляхом успішної доставки Галаніну в паренхіму головного мозку за допомогою IGF1R-4. Галанін може викликати анальгезію, тільки коли присутній в паренхімі головного мозку і сам по собі не може перетнути неушкоджений ГЕБ (Robertson et al., 2011).

Результати були проаналізовані як тимчасові динаміки затримок відсмикування лапи (PWL, сек) в залежності від часу (хв або г) (Фіг. 9A і C). Фіг. 9B зображує ті ж результати у вигляді площі під кривою (AUC) і порівнює їх з % від максимально можливого ефекту (% MPE). Фіг. 9D зображує результати у вигляді відсотка інгібування (теплової гіперальгезії) на піку відповіді (Emax).

Результати показують, що внутрішньовенне введення Галаніну не зменшувало біль у порівнянні з PBS. На відміну від цього, одна ін'єкція FC5-Gal або IGF1R4-Gal виробляло вимірний анальгетичний ефект, даючи підставу вважати, що V_{HH} переносив Галанін через ГЕБ для створення анальгетичного впливу шляхом зв'язування з GalR1 і/або 2 в паренхімі головного мозку. Ефект IGF1R-4-Галаніну залежить від його дози і значно більш вираженим, ніж ефект, індукований FC5-Gal, що дає підставу вважати, що рецептор IGF1R має більш високу швидкість ГЕБ транспорту, ніж передбачуваний FC5 рецептор. Результати показують, що IGF1R-3 V_{HH} може "переносити" молекули щонайменше 3000 Да через ГЕБ з використанням шляху рецепторно-опосередкованого транцитозу (комбінована MW кон'югату антитіло-пептид становить приблизно 18 кДа). Активний рецепторно-опосередкований транспорт необхідний, так як відомо, що ГЕБ запобігає проходженню всіх гідрофільних молекул більше 0,5 кДа. Аналогічно, IGF1R4-mFc-Галанін виробляє дозозалежне придушення теплової гіперальгезії, тоді як A20.1-mFc-Галанін є неефективним. Це дає підставу вважати, що IGF1R-4 V_{HH} може переносити молекули, схожі за розміром з антитілами (приблизно 80 кДа) через ГЕБ. IGF1R4-mFc-Галанін був приблизно в 5 разів активніший в придушенні теплової гіперальгезії, ніж IGF1R4-Галанін, що вказує на те, що бівалентності відображення і збільшений період напіввиведення з плазми призводять до поліпшеної ефективності доставки в мозок.

Приклад 13. Рівні IGF1R-4 в спинномозковій рідині і плазмі

Аналіз *in vivo* проводили, щоб визначити, чи здатний IGF1R-4-mFc проходити в мозок і зокрема в спинномозкову рідину (CSF), а також для кількісного визначення присутності в спинномозковій рідині та сироватці.

Тварин утримували поодиночки в поліпропіленових клітинах і давали вільний доступ до їжі і води. Експерименти проводилися в 12 годинному світло-темному циклі при температурі 24 °C і відносній вологості 50±5 %. Всі процедури на тварин були схвалені Комітетом з догляду за тваринами і знаходилися відповідно до посібників Канадської ради з догляду за тваринами.

Використовували самців щурів лінії Wistar 8-10-тижневого віку (діапазон ваги 230-250 г). Для отримання зразка СМР хутро в області шиї і голови тварин виголювали і потім їх поміщали в камеру з плексигласу і помірно анестезували 3 % ізофлураном; СМР була зібрана по суті як описано у Nirogi et al (2009). Анестезованих щурів поміщали в установку з металевим каркасом (люб'язно надану доктором Vinicio Granados-Soto; CINVESTAV, Мексика) і іммобілізували з використанням ручок для вух. Положення голови тварини підтримували нахиленим під кутом приблизно 45°. Поверхня у вигляді ромба між потиличним бугром і шийним хребцем була зроблена видимою шляхом протирання ватою, просоченою етанолом (75 %) з цієї поверхні. 27G голка, покрита ПЕ-10 трубкою (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) 10 см в довжину і поєднана зі 100 см³ інсуліновим шприцом, була вставлена горизонтально і по центру в мостомозжечкового цистерну для збору СМР без надрізу. Дві точки опору (клацання) уздовж шляху голки можна легко відчутти через розрив шкіри і розпушення атланта-потиличної мембрани. Коли голка проходила другу точку опору, СМР збирали (40-100 мкл) через голку, застосовуючи обережне всмоктування інсуліновим шприцом. Після відбору зразків спинномозкової рідини відповідну кров збирали пункцією серця після торакотомії і поміщали в вакуумні контейнери-пробірки (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) з активатором згустків і гелем, а потім центрифугували при 3,000 g протягом 15 хв. Сироватка була видалена за допомогою мікропіпетки і зразок швидко заморожували до -80 °C до подальшого аналізу.

Зразки сироватки та зразки спинномозкової рідини аналізували за допомогою мас-спектрометрії і на основі кількісної оцінки nanoLC-SRM, як описано в Прикладі 9.

Збір СМР є делікатною процедурою, під час якої СМР може легко забруднитися кров'ю. Так як кількості V_HN, як очікується, будуть значно менше в спинномозковій рідині (менше 0,1 %), ніж в крові, навіть незначне забруднення кров'ю може поставити під загрозу цінність окремого зразка спинномозкової рідини. У зв'язку з цим необхідно було розробити суворі критерії виключення зразків спинномозкової рідини, забруднених кров'ю. Для оцінки співвідношення альбуміну в крові-спинномозкову рідину метод nanoLC-SRM був розроблений для кількісного визначення рівня альбуміну в плазмі крові і спинномозкової рідини. Пептид альбумін APQVSTPTLVEAAR (SEQ ID NO: 37) був обраний на підставі свого унікального часу утримування і значення m/z (Mol Pharm) для досягнення мінімальної інтерференції з іншими піками пептидів в мультиплексному аналізі. Інтенсивність пептиду визначали кількісно в обох зразках спинномозкової рідини і плазми з використанням SRM аналізу, як описано вище. Співвідношення альбуміну розраховувалося в такий спосіб для кожної щури:

Співвідношення Альбуміну = Інтенсивність на нл проаналізованої плазми/
Інтенсивність на нл проаналізованої СМР

Співвідношення 1500 і нижче розглядалося як забруднення кров'ю.

Результати зображені на Фіг. 10. Тваринам одночасно вводили 6 мг/кг кожного з IGF1R-4, FC5 або A20.1, та СМР і сироватку збирали через 30 хв після ін'єкції. На фігурі зображено, що співвідношення СМР/сироватка для IGF1R-4 становить 1,2 % в порівнянні з 0,98 % для FC5 і 0,017 % для A20.1, що дає підставу вважати, що обидва IGF1R-4 і FC5 мають вищу проникнення в спинномозковій рідині та вплив на мозок в порівнянні з спільно введеним контрольним антитілом A20.1.

Приклад 14: Імунодетектування IGF1R-4-mFc

Для того, щоб переконатися, що високі рівні IGF1R-4-mFc, виявлені в спинномозковій рідині після периферичного введення, відбуваються щонайменше частково з позаклітинного простору паренхіми, іншими словами, що неушкоджений конструктор перетинає ГЕБ, була проведена імунодетекції IGF1R-4-mFc в мозку щура.

Якщо коротко, мозок тварин збирали відразу після перфузії тварин PBS через 24 годин після введення 6 мг/кг в хвостову вену IGF1R-4-mFc або A20.1mFc. Мозок заморожували і розрізали на кріотомі на 12 мкм секції. Секції витримували протягом 10 хв при RT в 100 % метанолі, відмивали 3 рази в PBS і інкубували протягом 1 год. в 10 % нормальної козячої сироватці (NGS), що містить 0,3 % Тритон X-100 в 1x PBS. Козій анти-M-IgG Fcy- γ 3 (Cat # 115-165-071, Jackson Immuno Research, lot # 106360) 1: 200 в 5 % NGS, що містить 0,3 % Тритон X-100 в 1x PBS, інкубували протягом ночі при 4 °C. Секції промивали три рази в 1x PBS, потім додавали лектин для фарбування судинної системи RCAI (Cat # FL-1081, Vector) 1: 500 в 1xPBS протягом 10 хв. Після промивання тричі 1xPBS секції покривали покривним склом у флуоресцентному закріплюючому середовищі Dako (Cat # S3023, Dako) і до них додавали 2 мкг/мл Hoechst (Cat # H3570, Invitrogen) для фарбування ядер. Фотографії робили за допомогою флуоресцентного мікроскопа Olympus 1 × 81 з використанням 10X і 60X об'єктивів і каналів, як показано в Таблиці 3.

Об'єктиви та канали, використані під флуоресцентної мікроскопії

	Флуоресцентна молекула	Збудження (нм)	Емісія (нм)
RCAI-судини	FITC	495	518
Hoechst33342 -ядра	Hoechst	350	461
IGF1R-3-m-Fc	Cy3	531	593

Результати показані на Фіг. 11. імунодетекції мишачого Fc показала сильне фарбування судин головного мозку в різних ділянках головного мозку, а також фарбування периваскулярної паренхіми мозку, що вказує на те, що IGF1R-4-mFc накопичувався в судинах головного мозку, а також переносився через ГЕБ в навколишню паренхіму мозку. Навпаки, mFc-специфічне забарвлення не було виявлено у A20.1mFc ін'єктованих тварин. Отримані результати підтверджують твердження, що підвищені рівні IGF1R-4-mFc в спинномозковій рідині свідчать про проходження конструктору через ГЕБ. Це додатково істотно підтверджується спостереженням, що Галанін, зв'язаний з IGF1R-4, індукував фармакологічну реакцію (аналгезія) на паренхімальних GalR1 і GalR2 рецепторах. В сукупності, результати проходження через ГЕБ *in vitro*, результати фармакокінетики *in vivo* (рівні в сироватці/CMP) і результати фармакодинамики (модель Харгрівса) показують, що IGF1R-4 V_HH переноситься через неушкоджений ГЕБ значно вищими темпами, ніж інші V_HH шляхом активного рецепторно-опосередованого трансцитозу, викликаного його зв'язуванням з епітопами IGF1R, і що він може "переносити" нездатні в іншому випадку проникати через ГЕБ молекули (1-80 кДа).

Приклад 15: Вплив IGF1R-4 на "фізіологічну" функцію IGF1R

З точки зору безпеки важливо показати, що антитіло відповідно до винаходу не заважають фізіологічній функції рецептора - тобто передачі сигналу, індукованої його природним лігандом, IGF-1 при зв'язуванні його рецептора для доставки лікарських засобів за допомогою рецепторно-опосередованого трансцитозу. З огляду на це, важливо продемонструвати, що IGF1R-4 V_HH або IGF1R-4-mFc не заважають фізіологічній передачі сигналів через IGF1R або інсуліновий рецептор (IR), індукованої їх природними лігандами.

Для того, щоб визначити, індукує чи IGF1R-4 передачу сигналу через IGF1R або IR окремо, або заважає передачі сигналу, що стимулюється природними лігандами рецептора, IGF-1 або інсуліном, було визначено їх вплив на фосфорилування самих рецепторів або рецептор-стимульованої прямий кінази, протеїнкінази B, в SV-ARBEC клітинах.

SV-ARBEC клітини вирощували для злиття в основному середовищі M199, доповненому пептоном, D-глюкозою, BME (основне живильне середовище Голка), амінокислотами, BME вітамінами, розчином антибіотика/антимікотика і фетальної бичачої сироваткою відповідно до відомих способів. Клітини переносили в безсироваткове середовище за 18 год. до обробки. IGF1R-4 V_HH або IGF1R-4-Fc злиття (100 нМ або 500 нМ) додавали до клітин за 1 год. до додавання 200 нг/мл IGF-1, 10 мкл/мл інсуліну або носія. Клітини інкубували з лігандами або носієм протягом 20 хвилин, а потім двічі промивали в збалансованому сольовому розчині Хенка. Потім клітини лізували з використанням буфера 1x RIPA (буфер для радіоіммунопреципітації) (Cell Signaling Technology), доповненого 1 % Тритон-Х 100 і інгібіторами протеаз (Sigma). Клітини піддавали 2×20 з імпульсам в водяній бані ультразвуковому і лизати очищали центрифугуванням при 14,000 об/хв протягом 10 хвилин. Концентрацію білка визначали за допомогою системи аналізу білка DC (Bio-Rad Laboratories). Рівні по мкм зразки білка розділяли в 4-20 % градієнтному SDS поліакриламідному гелі при 125 В і переносили на PVDF (полівініліден фторид) мембрану. Фосфо-протеїн B (Ser 473) визначали за допомогою інкубації протягом ночі при розведенні 1:1000 первинного антитіла проти даної мішені (технологія клітинної передачі сигналу), з подальшою інкубацією з вторинним козячим антитілом проти кролячого IgG-HRP, з подальшим взаємодією з ECL Plus реагентом і візуалізацією на авторадіографічній плівці. Значення денситометрії були визначені з використанням програмного забезпечення Un-Scan-LT (Silk Scientific Inc.).

Результати зображені на Фіг. 12. Вестерн-блот фосфорилування протеїнкінази B показав, що IGF1R-4 не пригнічує фосфорилування протеїнкінази B, індуковане 10 мкг/мл інсуліну або 200 нг/мл IGF-1 при спільному застосуванні з 100 нМ IGF1R-4 або IGF1R-4-mFc або 500 нМ IGF1R-4-mFc. V_HH або Fc злиття теж індукували самі по собі передачу сигналу протеїнкіназою B (Фіг. 12A, 12B і 12C, з написом "-4"). Результати показують, що навіть в бівалентному

відображенні в форматі Fc злиття IGF1R-4 не викликає димеризацію рецептора і пряму передачу сигналу, і, отже, не порушує функцію рецептора в присутності природного ліганда. Дана особливість IGF1R-4 ("мовчазне зв'язування") має важливе значення для його застосування в якості переносника терапевтичних агентів через ГЕБ, тому, що вона забезпечує сприятливий

5

профіль безпеки. Варіанти здійснення і приклади, описані тут, є ілюстративними і не призначені для обмеження обсягу винаходу, як заявлено. Варіації вищеописаних варіантів здійснення, включаючи альтернативи, модифікації та еквіваленти, охоплюються за наміром авторів винаходу формулою винаходу. Крім того, описана сукупність ознак може не бути необхідною для винахідницької рішення.

10

Посилання

Всі патенти, патентні заявки і публікації, згадані в цьому документі і у всій заявці, включені в даний опис як посилання.

15

Abbott NJ (2013) Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inher Metab Dis.* 36(3):437-49.

Abulrob A, Sprang H, Van Bergen en Henegouwen P, Stanimirovic D (2005) The blood-brain barrier transigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J Neurochem.* 2005 Nov;95(4):1201-14.

20

Arbabi-Ghahroudi, M. Desmyter A, Wyns L, Hamers R., and Muyldermans S (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies, *FEBS Lett* 414, 521-526

Arbabi-Ghahroudi, M., To, R., Gaudette, N., Hiram, T., Ding, W., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2009a) *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 59-66.

Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2009b) *Methods Mol. Biol.* 525, 187-216.

25

Bell, A., Wang, Z.J., Arbabi-Ghahroudi, M., Chang, T.A., Durocher, Y., Trojahn, U., Baardsnes, J., Jaramillo, M.L., Li, S., Baral, T.N., O'Connor-McCourt, M., Mackenzie, R., and Zhang, J. (2010) *Cancer Lett.* 289, 81-90.

Broussau, s., Jabbour, N., Lachapelle, G., Durocher, Y., Tom, R., Transfiguracion, J., Gilbert, R. and Massie, B. (2008) *Mol Ther* 16, 500-507.

30

Chothia, C., and Lesk, A.M. (1987) *J. Mol. Biol.* 196, 901-917.

Davies J., and L. Riechmann, Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding. *Immunotechnology* 2 (1996) 169-179

De Kruif, J., and Logtenberg, T. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 7630-7634.

35

Demeule, M.; Currie, J. C.; Bertrand, Y.; Che, C.; Nguyen, T.; Regina, A.; Gabathuler, R.; Castaigne, J. P.; Beliveau, R. Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2, *J. Neurochem.* 2008, 106, 1534-1544.

Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaighe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L.G., Muyldermans, S., Wyns, L., and Matagne, A. (2002) *Protein Sci* 11, 500-515.

40

Durocher, Y., S. Perret, et al. (2002). "High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells." *Nucleic Acids Res* 30(2): E9.

Doyle, P.J., Arbabi-Ghahroudi, M., Gaudette, N., Furzer, G., Savard, M.E., Gleddie, S., McLean, M.D., MacKenzie, C.R., and Hall, J.C. (2008) *Mol. Immunol.* 45, 3703-3713.

Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., and Wall, R. (1984) *J. Mol. Biol.* 179, 125-142

45

Erdlenbruch B, Alipour M, Fricker G, Miller DS, Kugler W, Eibl H, Lakomek M (2003) Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries. *Br J Pharmacol.* 140(7): 1201-10.

Fenner, L., Widmer, A.F., Goy, G., Rudin, S., and Frei, R. (2008) *J. Clin. Microbiol.* 46, 328-330.

Gaillet, B., Gilbert, R., Broussau, S., Pilotte, A., Malenfant, F., Mullick, A., Gamier, A., and Massie, B. (2010) *Biotechnol Bioeng* 106, 203-215.

50

Gan Y, Jing Z, Stetler RA, Cao G (2013) Gene delivery with viral vectors for cerebrovascular diseases. *Front Biosci (Elite Ed).* 5:188-203. Review.

Garberg, P.; Ball, M.; Borg, N.; Cecchelli, R.; Fenart, L.; Hurst, R. D.; Lindmark, T.; Mabondzo, A.; Nilsson, J. E.; Raub, T. J.; Stanimirovic, D.; Terasaki, T.; Oberg, J. O.; Osterberg, T. In vitro models for the blood-brain barrier, *Toxicol. In Vitro* 2005, 19, 299-334.

55

Gergov, M.; Ojanpera, I.; Vuori, E. Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003, 795, 41-53.

Gaillet B, Gilbert R, Amziani R, Guilbault C, Gadoury C, Caron AW, Mullick A, Gamier A, Massie B (2007) High-level recombinant protein production in CHO cells using an adenoviral vector and the

60

cumate gene-switch. *Biotechnol Prog.* Jan-23(1):200-9

Gottesman et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 62, 385-427 (1993)

Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993) *Nature* 363, 446-448.

5 Haqqani AS, Caram-Salas N, Ding W, Brunette E, Delaney CE, Baumann E, Boileau E, Stanimirovic D (2012) Multiplexed evaluation of serum and CSF pharmacokinetics of braintargeting single-domain antibodies using a NanoLC-SRM-ILIS method. *Mol Pharm.* 2013 May 6; 10(5): 1542-56.

10 Hargreaves KM, Troullos ES, Dionne IRA, Schmidt EA, Schafer SC, Joris JL (1988) Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin Pharmacol Ther.* 44(6):613-21.

Huang YL, Saljo A, Suneson A, Hansson HA (1995) A new approach for multiple sampling of cisternal cerebrospinal fluid in rodents with minimal trauma and inflammation. *J Neurosci Methods.* 63(1-2): 13-22.

15 Hussack, G., Hirma, T., Ding, W., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2011) *PLoS ONE* 6, e28218.

Hussack G, Arbabi-Ghahroudi M, van Faassen H, Songer JG, Ng KK, MacKenzie R, Tanha J (2011b) Neutralization of *Clostridium difficile* toxin A with single-domain antibodies targeting the cell receptor binding domain. *J Biol Chem.* 286(11): 8961-76.

20 Iqbal U. Abulrob A. Stanimirovic D B (2011) Integrated platform for brain imaging and drug delivery across the blood-brain barrier. *Methods Mol. Biol.* 686, 465-481.

Iqbal, U., Trojahn, U., Albaghdadi, H., Zhang, J., O'Connor, M., Stanimirovic, D., Tomanek, B., Sutherland, G., and Abulrob, A. (2010) *Br. J. Pharmacol.* 160, 1016-1028.

Jespers, L., Schon, O., Famm, K., and Winter, G. (2004) *Nat. Biotechnol.* 22, 1161-1165.

25 Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol.* 1991;147:1709-19.

Kim, D.Y., Kandalaf, H., Ding, W., Ryan, S., van Fassen, H., Hirma, T., Foote, S.J., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2012) *PEDS* advance access August 30, 2012, 1-9.

30 Kornhuber ME, Kornhuber J, Cimniak U (1986) A method for repeated CSF sampling in the freely moving rat. *J Neurosci Methods.* 17(1):63-8.

Lefranc, M.-P. et al., (2003) *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77.

35 Li S, Zheng W, Kuolee R, Hirma T, Henry M, Makvandi-Nejad S, Fjallman T, Chen W, Zhang J. Pentabody-mediated antigen delivery induces antigen-specific mucosal immune response. *Mol Immunol* 2009;46:1718-26.

Merritt, E.A., and Hoi, W.G. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 165-171.

Muruganandam A, Tanha J, Narang S, Stanimirovic D (2001) Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmute across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J.* 2002 Feb;16(2):240-2.

40 Musher, D.M., Manhas, A., Jain, P., Nuila, F., Waqar, A., Logan, N., Marino, B., Graviss, E.A. (2007) *J. Clin. Microbiol.* 45, 2737-2739.

Nhan T, Burgess A, Cho EE, Stefanovic B, Lilge L, Hynynen K. (2013) Drug delivery to the brain by focused ultrasound induced blood-brain barrier disruption: Quantitative evaluation of enhanced permeability of cerebral vasculature using two-photon microscopy. *J Control Release.* 172(1):274-280.

45 Nicaise M, Valeio-Lepiniec M, Minard P, Desmadril M. (2004) Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold. *Protein Sci.* 13(7): 1882-1891.

Nielsen, U.B., Adams, G.P., Weiner, L.M., and Marks, J.D. (2000) *Cancer Res.* 60, 6434-6440.

50 Nirogi, R.; Kandikere, V.; Mudigonda, K.; Bhyrapuneni, G.; Muddana, N.; Saralaya, R.; Benade, V. (2009) A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system, *J. Neurosci. Methods*, 178, 116-119.

Nuttall, S.D., Krishnan, U.V., Doughty, L., Pearson, K., Ryan, M.T., Hoogenraad, N.J., Hattarki, M., Carmichael, J.A., Irving, R.A., and Hudson, P.J. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554.

Pardridge, W. M.; Buciak, J. L.; Friden, P. M. Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier in vivo, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991, 259, 66-70.

55 Pardridge, W.M., *Adv. Drug Delivery Reviews*, 15, 5-36 (1995)

Pardridge, W. M. Drug and gene delivery to the brain: the vascular route, *Neuron.* 2002, 36, 555-558.

Planche, T., Aghaizu, A., Holliman, R., Riley, P., Poloniecki, J., Breathnach, A., and Krishna, S. (2008) *Lancet Infect. Dis.* 8, 777-784.

60 Preston E, Slinn J, Vinokourov I, Stanimirovic D. (2008) Graded reversible opening of the rat

- blood-brain barrier by intracarotid infusion of sodium caprate. *J Neurosci Methods*. 168(2):443-9.
- Ridgway, J.B., Presta, L.G., and Carter, P. (1996) *Protein Eng*. 9, 617-621.
- Robertson CR, Flynn SP, White HS, Bulaj G (2011) Anticonvulsant neuropeptides as drug leads for neurological diseases. *Nat Prod Rep*. 28(4):741-62.
- 5 Russmann, H., Panthel, K., Bader, R.C., Schmitt, C., and Schaumann, R. (2007) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 26, 115-119.
- Samani, A.A., Chevet, E., Fallavollita, L., Galipeau, J., and Brodt, P. (2004) *Cancer Research* 64, 3380-3385.
- Samuels B.L., *J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 54, 421-429 (1993)
- 10 Sloan, L.M., Duresko, B.J., Gustafson, D.R., and Rosenblatt, J.E. (2008) *J. Clin. Microbiol*. 46, 1996-2001.
- Sumbria RK, Zhou QH, Hui EK, Lu JZ, Boado RJ, Pardridge WM.(2013) Pharmacokinetics and brain uptake of an IgG-TNF decoy receptor fusion protein following intravenous, intraperitoneal, and subcutaneous administration in mice. *Mol Pharm*. 10(4): 1425-31.
- 15 Tanha, J., Muruganandam, A., and Stanimirovic, D. (2003) *Methods Mol. Med*. 89, 435-449.
- To, R., Hirama, T., Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., Wang, P., Xu, P., Ni, F., and Tanha, J. (2005) *J. Biol. Chem*. 280, 41395-41403.
- Turgeon, D.K., Novicki, T.J., Quick, J., Carlson, L., Miller, P., Illness, B., Cent, A., Ashley, R., Larson, A., Coyle, M., Limaye, A.P., Cookson, B.T., and Fritsche, T.R. (2003) *J. Clin. Microbiol*. 41, 667-670.
- 20 Watanabe, T., *Acta Oncol.*, 34, 235-241 (1995)
- Xiao G, Gan LS.(2013) Receptor-mediated endocytosis and brain delivery of therapeutic biologics. *Int J Cell Biol*, doi: 10.1155/2013/703545. Epub 2013 Jun H.Yaksh TL, Rudy TA (1976) Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav*. 17(6): 1031-6.
- 25 Yu, Y. J.; Zhang, Y.; Kenrick, M.; Floyte, K.; Luk, W.; Lu, Y.; Atwal, J.; Elliott, J. M.; Prabhu, S.; Watts, R. J.; Dennis, M. S. Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target, *Sci. Transl. Med*. 2011, 3, 84ra44.
- Zhang, J., Li, Q., Nguyen, T.-D., Tremblay, T.-L., Stone, E., To, R., Kelly, J., and MacKenzie, C.R. (2004a) *J. Mol. Biol*. 341, 161-169.
- 30 Zhang, J., Tanha, J., Hirama, T., Khiew, N.H., To, R., Tong-Sevinc, H., Stone, E., Brisson, J.R., and MacKenzie, C.R. (2004b) *J. Mol. Biol*. 335, 49-56.
- Zhu et al., *Immunology and Cell Biology* (2010) 88:667-675.
- Европейський патент № 519596
- Европейський патент № 626390
- 35 Патент США № 5693761
- Патент США № 5766886
- Патент США № 5821123
- Патент США № 5859205
- Патент США № 5869619
- 40 Патент США № 6054297
- патент США № 6180370
- WO 02/057445
- WO 2011/127580
- WO 95/04069
- 45 WO/2004/076670
- WO2003/046560

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA
ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> НЕШНЛ РІСЕЧ КАУНСІЛ ОФ КАНАДА
СТАНІМІРОВІЧ, Даніка
КЕММЕРІЧ, Крістін
СУЛІ, Трайан
АРБАБІ-ГАРУДІ, Меді
ХАККАНІ, Арсалан С.
ЖІЛЬБЕР, Рено
МАССІ, Бернар

<120> АНТИТИЛА, СПЕЦИФІЧНІ ДО РЕЦЕПТОРА ІНСУЛІНОПОДІБНОГО ФАКТОРА РОСТУ 1, І ЇХ
ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 12599-98

<150> 61/948,818

<151> 2014-03-06

<160> 38

<170> Версія PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IGF1R-4 CDR1

<400> 1

Gly Gly Thr Val Ser Pro Thr Ala
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IGF1R-4 CDR2

<400> 2

Ile Thr Trp Ser Arg Gly Thr Thr
1 5

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<210> 3
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> IGF1R-4 CDR3

<400> 3

Ala	Ala	Ser	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Leu	Pro	Glu	Glu	Ser	Ala	Tyr	Thr
1				5				10						15	

Tyr

<210> 4
 <211> 124
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> IGF1R-4 консенсус

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа є Glu або Gln

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (3)..(3)
 <223> Хаа є Lys або Gln

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа є Val або Glu

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (14)..(14)
 <223> Хаа є Ala або Pro

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (23)..(23)
 <223> Хаа є Ala або Glu

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa є Val або Ala

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (37)..(37)
 <223> Xaa є Val або Phe

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (44)..(44)
 <223> Xaa є Gly або Glu

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa є Leu або Arg

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (47)..(47)
 <223> Xaa є Phe або Trp

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (49)..(49)
 <223> Xaa є Gly або Ser

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (60)..(60)
 <223> Xaa є Val або Tyr

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (66)..(66)
 <223> Xaa є Asp або Gly

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (74)..(74)
 <223> Xaa є Asn або Ser

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (75)..(75)
 <223> Xaa є Ala або Ser

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<222> (79)..(79)

<223> Xaa € Leu або Val

<220>

<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ

<222> (87)..(87)

<223> Xaa € Lys або Arg

<220>

<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ

<222> (88)..(88)

<223> Xaa € Ala або Ser

<220>

<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ

<222> (119)..(119)

<223> Xaa € Leu або Gln

<400> 4

Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Xaa Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Xaa Xaa Ser Gly Gly Thr Val Ser Pro Thr
20 25 30

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

Xaa His Ile Thr Trp Ser Arg Gly Thr Thr Arg Xaa Ala Ser Ser Val
50 55 60

Lys Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Xaa Xaa Lys Asn Thr Xaa Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Thr Phe Leu Arg Ile Leu Pro Glu Glu Ser Ala Tyr Thr
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
115 120

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<210> 5
 <211> 124
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> IGF1R-4 VHH

<400> 5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Gly Thr Val Ser Pro Thr
 20 25 30

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

Gly His Ile Thr Trp Ser Arg Gly Thr Thr Arg Val Ala Ser Ser Val
 50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Ser Thr Phe Leu Arg Ile Leu Pro Glu Glu Ser Ala Tyr Thr
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 <211> 124
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> IGF1R-4_H2

<400> 6

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Thr Val Ser Pro Thr
20 25 30

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

Gly His Ile Thr Trp Ser Arg Gly Thr Thr Arg Tyr Ala Ser Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Thr Phe Leu Arg Ile Leu Pro Glu Glu Ser Ala Tyr Thr
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 124
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IGF1R-4_H3

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Thr Val Ser Pro Thr
20 25 30

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

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

Gly His Ile Thr Trp Ser Arg Gly Thr Thr Arg Tyr Ala Ser Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Thr Phe Leu Arg Ile Leu Pro Glu Glu Ser Ala Tyr Thr
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 124
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IGF1R-4_H4

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Thr Val Ser Pro Thr
20 25 30

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

Gly His Ile Thr Trp Ser Arg Gly Thr Thr Arg Tyr Ala Ser Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Thr Phe Leu Arg Ile Leu Pro Glu Glu Ser Ala Tyr Thr
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9

<211> 124

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IGF1R-4_H5

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Thr Val Ser Pro Thr
20 25 30

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

Gly His Ile Thr Trp Ser Arg Gly Thr Thr Arg Tyr Ala Ser Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Thr Phe Leu Arg Ile Leu Pro Glu Glu Ser Ala Tyr Thr
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<210> 10
 <211> 370
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> IGF1R-4 консенсус-Fc злиття

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа є Glu або Gln

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (3)..(3)
 <223> Хаа є Lys або Gln

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа є Val або Glu

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (14)..(14)
 <223> Хаа є Ala або Pro

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (23)..(23)
 <223> Хаа є Ala або Glu

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (24)..(24)
 <223> Хаа Val или Ala

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (37)..(37)
 <223> Хаа є Val або Phe

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (44)..(44)
 <223> Хаа є Gly або Glu

<220>

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (45)..(45)
<223> Xaa є Leu або Arg

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (47)..(47)
<223> Xaa є Phe або Trp

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (49)..(49)
<223> Xaa є Gly або Ser

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (60)..(60)
<223> Xaa є Val або Tyr

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (66)..(66)
<223> Xaa є Asp або Gly

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (74)..(74)
<223> Xaa є Asn або Ser

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (75)..(75)
<223> Xaa є Ala або Ser

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (79)..(79)
<223> Xaa є Leu або Val

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (87)..(87)
<223> Xaa є Lys або Arg

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (88)..(88)
<223> Xaa є Ala або Ser

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (119)..(119)

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<223> Xaa e Leu a6o Gln

<400> 10

Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Xaa Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Xaa Xaa Ser Gly Gly Thr Val Ser Pro Thr
20 25 30

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

Xaa His Ile Thr Trp Ser Arg Gly Thr Thr Arg Xaa Ala Ser Ser Val
50 55 60

Lys Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Xaa Xaa Lys Asn Thr Xaa Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Thr Phe Leu Arg Ile Leu Pro Glu Glu Ser Ala Tyr Thr
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser Met Thr Val Asp
115 120 125

Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro
130 135 140

Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly
145 150 155 160

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
165 170 175

Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
180 185 190

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
195 200 205

Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg
210 215 220

Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
225 230 235 240

Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu
245 250 255

Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
260 265 270

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

Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp
290 295 300

Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val
305 310 315 320

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys
325 330 335

Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His
340 345 350

Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro
355 360 365

Gly Lys
370

<210> 11
<211> 370
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<220>

<223> IGF1R-4-Fc элиття

<400> 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Gly Thr Val Ser Pro Thr
20 25 30

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

Gly His Ile Thr Trp Ser Arg Gly Thr Thr Arg Val Ala Ser Ser Val
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Thr Phe Leu Arg Ile Leu Pro Glu Glu Ser Ala Tyr Thr
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Met Thr Val Asp
115 120 125

Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro
130 135 140

Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly
145 150 155 160

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
165 170 175

Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
180 185 190

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
195 200 205

Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg
210 215 220

Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
225 230 235 240

Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu
245 250 255

Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
260 265 270

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

Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp
290 295 300

Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val
305 310 315 320

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys
325 330 335

Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His
340 345 350

Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro
355 360 365

Gly Lys
370

<210> 12
<211> 1367

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IGF1R

<400> 12

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
355 360 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
420 425 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
485 490 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
500 505 510

Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
515 520 525

Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
530 535 540

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545 550 555 560

Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
565 570 575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
580 585 590

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
595 600 605

Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
610 615 620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625 630 635 640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
645 650 655

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735

Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
755 760 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
915 920 925

Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val
930 935 940

Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg
945 950 955 960

Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val
965 970 975

Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp
980 985 990

Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly
995 1000 1005

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys
1010 1015 1020

Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala
1025 1030 1035

Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val
1040 1045 1050

Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val
1055 1060 1065

Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr
1070 1075 1080

Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met
1085 1090 1095

Glu Asn Asn Pro Val Leu Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile
1100 1105 1110

Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala
1115 1120 1125

Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val
1130 1135 1140

Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg
1145 1150 1155

Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu
1160 1165 1170

Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val
1175 1180 1185

Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp
1190 1195 1200

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Asn
1205 1210 1215

Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp Lys
1220 1225 1230

Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met Cys
1235 1240 1245

Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile
1250 1255 1260

Ser Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser
1265 1270 1275

Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Pro Glu Glu Leu
1280 1285 1290

Asp Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser
1295 1300 1305

Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His
1310 1315 1320

Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala
1325 1330 1335

Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg
1340 1345 1350

Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys
1355 1360 1365

<210> 13

<211> 4

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Сайт розщеплення фурином

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<400> 13

Arg Lys Arg Arg
1

<210> 14

<211> 33

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Прямий праймер

<400> 14

cgggatccgc caccatgaag tctggctccg gag

33

<210> 15

<211> 34

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Зворотній праймер

<400> 15

gctctagatc agaagttttc atatcctgtt ttgg

34

<210> 16

<211> 45

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> MJ1 праймер

<400> 16

gccccgccgg ccatggccsm kgtgcagctg gtggaktctg gggga

45

<210> 17

<211> 45

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> MJ2 праймер

<400> 17

gccccgccgg ccatggccca ggtaaagctg gaggagtctg gggga

45

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<210> 18
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> MJ3 праймер

 <400> 18
 gccagccgg ccatggccca ggctcaggta cagctggtgg agtct 45

 <210> 19
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CH2 праймер

 <400> 19
 cgccatcaag gtaccagttg a 21

 <210> 20
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CH2b3 праймер

 <400> 20
 ggggtacctg tcatccacgg accagctga 29

 <210> 21
 <211> 34
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> MJ7 праймер

 <400> 21
 catgtgtaga ctgcggccc agccggccat ggcc 34

 <210> 22
 <211> 47

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> MJ8 праймер

<400> 22

catgtgtaga ttcctggccg gcctggcctg aggagacggt gacctgg

47

<210> 23

<211> 38

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Прямий праймер

<400> 23

tatgaagaca ccaggcccag gtaaagctgg aggagtct

38

<210> 24

<211> 30

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Зворотній праймер

<400> 24

ttgttcggat cctgaggaga cggtgacctg

30

<210> 25

<211> 10

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IGF1R-4 пептид

<400> 25

Glu Phe Val Gly His Ile Thr Trp Ser Arg

1

5

10

<210> 26

<211> 19

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<220>

<223> IGF1R-4 пептид

<400> 26

Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Gly Thr Val Ser Pro Thr Ala Met Gly
1 5 10 15

Trp Phe Arg

<210> 27

<211> 15

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> FC5 i FC5-ILIS пептид

<400> 27

Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 28

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> A20.1 пептид

<400> 28

Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5

<210> 29

<211> 11

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> A20.1 пептид

<400> 29

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

Glu Phe Val Ala Ala Gly Ser Ser Thr Gly Arg
1 5 10

<210> 30
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> A20.1 пептид

<400> 30

Thr Phe Ser Met Asp Pro Met Ala Trp Phe Arg
1 5 10

<210> 31
<211> 26
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> A20.1 пептид

<400> 31

Asp Glu Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

Gly Gln Ala Gly Gln Gly Ser Glu Gln Lys
20 25

<210> 32
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> EG2 пептид

<400> 32

Asp Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg
1 5 10

<210> 33
<211> 16

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> EG2 пептид

<400> 33

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

<210> 34

<211> 32

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> EG2 пептид

<400> 34

Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
1 5 10 15

Val Tyr Tyr Cys Ala Val Asn Ser Ala Gly Thr Tyr Val Ser Pro Arg
20 25 30

<210> 35

<211> 14

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Пептид альбуміна

<400> 35

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

<210> 36

<211> 29

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Галанін-цистеамід

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<400> 36

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro His Ala Ile
1 5 10 15

Asp Asn His Arg Ser Phe Ser Asp Lys His Gly Leu Thr
20 25

<210> 37

<211> 19

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Сигнальний пептид

<400> 37

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 38

<211> 371

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Fc-IGF1R-4 консенсус злиття

<220>

<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ

<222> (248)..(248)

<223> Хаа є Glu або Gln

<220>

<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ

<222> (250)..(250)

<223> Хаа є Lys або Gln

<220>

<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ

<222> (252)..(252)

<223> Хаа є Val або Glu

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (261)..(261)
 <223> Xaa є Ala або Pro

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (270)..(270)
 <223> Xaa є Ala або Glu

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (271)..(271)
 <223> Xaa є Val або Ala

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (284)..(284)
 <223> Xaa є Val або Phe

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (291)..(291)
 <223> Xaa є Gly або Glu

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (292)..(292)
 <223> Xaa є Leu або Arg

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (294)..(294)
 <223> Xaa є Phe або Trp

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (296)..(296)
 <223> Xaa є Gly або Ser

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (307)..(307)
 <223> Xaa є Val або Tyr

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
 <222> (313)..(313)
 <223> Xaa є Asp або Gly

<220>
 <221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

<222> (321)..(321)
<223> Xaa є Asn або Ser

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (322)..(322)
<223> Xaa є Ala або Ser

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (326)..(326)
<223> Xaa є Leu або Val

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (334)..(334)
<223> Xaa є Lys або Arg

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (335)..(335)
<223> Xaa є Ala або Ser

<220>
<221> ОБЛАСТЬ ИНТЕРЕСУ
<222> (366)..(366)
<223> Xaa є Leu або Gln

<400> 38

Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys
1 5 10 15

Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val
20 25 30

Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr
35 40 45

Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
50 55 60

Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
65 70 75 80

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser
85 90 95

Page 30

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
100 105 110

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile
115 120 125

Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro
130 135 140

Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu
145 150 155 160

Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn
165 170 175

Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser
180 185 190

Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys
195 200 205

Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu
210 215 220

Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Leu Val Gln Xaa Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Xaa Xaa Ser
260 265 270

Gly Gly Thr Val Ser Pro Thr Ala Met Gly Trp Xaa Arg Gln Ala Pro
275 280 285

Gly Lys Xaa Xaa Glu Xaa Val Xaa His Ile Thr Trp Ser Arg Gly Thr
290 295 300

IN-39335 - PCT-CA2014-000861- UA

Thr Arg Xaa Ala Ser Ser Val Lys Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
305 310 315 320

Xaa Xaa Lys Asn Thr Xaa Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Xaa Xaa Glu
325 330 335

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Thr Phe Leu Arg Ile Leu
340 345 350

Pro Glu Glu Ser Ala Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr
355 360 365

Val Ser Ser
370

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Виділений або очищений антигензв'язуючий фрагмент антитіла, що містить послідовність області, яка визначає комплементарність (CDR) 1 GGTVSPTA (SEQ ID NO: 1), послідовність CDR2 ITWSRGTT (SEQ ID NO: 2) і послідовність CDR3 AASTFLRILPEESAYTY (SEQ ID NO: 3),

де антигензв'язуючий фрагмент антитіла є специфічним для рецептора інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF1R).

2. Виділений або очищений антигензв'язуючий фрагмент антитіла за п. 1, що містить послідовність

5 X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCX₅X₆SGGTVSPTAMGWX₇RQAPGKX₈X₉EX₁₀VX₁₁HITWSRGTT
RX₁₂ASSVKX₁₃RFTISRDX₁₄X₁₅KNTX₁₆YLMNSLX₁₇X₁₈EDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT
X₁₉VTVSS (SEQ ID NO: 4), де X₁ є E або Q; X₂ є K або Q; X₃ є V або E; X₄ є A або P; X₅ є A або E;
X₆ є V або A; X₇ є V або F; X₈ є G або E; X₉ є L або R; X₁₀ є F або W; X₁₁ є G або S; X₁₂ є V або Y;
X₁₃ є D або G; X₁₄ є N або S; X₁₅ є A або S; X₁₆ є L або V; X₁₇ є K або R; X₁₈ є A або S; i X₁₉ є L або
10 Q.

3. Виділений або очищений антигензв'язуючий фрагмент антитіла за п. 1 або п. 2, що містить послідовність, вибрану з групи, що складається з:

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFEVGHITWSRGTTTRVASSVK
DRFTISRDSAKNTVYLMNSLKS EDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:
15 5),

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWVRQAPGKGLEWVGHITWSRGTTTRYASSV
KGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID
NO: 6),

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRGTTTRYASSVK
GRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:
20 7),

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRGTTTRYASSVK
GRFTISRDSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:
8),

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFEVGHITWSRGTTTRYASSVK
GRFTISRDSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:
25 9),

або послідовність, на 90 % їм ідентичну.

4. Виділений або очищений антигензв'язуючий фрагмент антитіла за будь-яким з пп. 1-3, який
30 **відрізняється** тим, що антигензв'язуючий фрагмент антитіла є однодоменим антитілом (sdAb).

5. Виділений або очищений антигензв'язуючий фрагмент антитіла за п. 4, який **відрізняється**
тим, що sdAb має верблуже походження.

6. Виділений або очищений антигензв'язуючий фрагмент антитіла за будь-яким з пп. 1-5, який
35 **відрізняється** тим, що антигензв'язуючий фрагмент антитіла знаходиться в форматі
мультивалентного відображення.

7. Виділений або очищений антигензв'язуючий фрагмент антитіла за п. 6, який **відрізняється**
тим, що антигензв'язуючий фрагмент антитіла зв'язаний з фрагментом Fc.

8. Молекула нуклеїнової кислоти, що кодує виділений чи очищений антигензв'язуючий фрагмент
40 антитіла за будь-яким з пп. 1-7.

9. Вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 8.

10. Виділений або очищений антигензв'язуючий фрагмент антитіла за будь-яким з пп. 1-7, де
антигензв'язуючий фрагмент антитіла іммобілізований на поверхню.

11. Виділений або очищений антигензв'язуючий фрагмент антитіла за будь-яким з пп. 1-7, де
45 антигензв'язуючий фрагмент антитіла зв'язаний з молекулою вантажу.

12. Виділений або очищений антигензв'язуючий фрагмент антитіла за п. 11, який **відрізняється**
тим, що молекула вантажу має молекулярну масу в діапазоні від приблизно 1 до приблизно
200 кДа.

13. Виділений або очищений антигензв'язуючий фрагмент антитіла за п. 11 або п. 12, який
50 **відрізняється** тим, що молекула вантажу є детектованим агентом, терапевтичним агентом,
лікарським засобом, пептидом, фактором росту, цитокином, пасткою рецептора, хімічною
сполукою, вуглеводним фрагментом, ферментом, антитілом або його фрагментом, молекулою
на основі ДНК, вірусним вектором або цитотоксичним агентом, однією або кількома ліпосомами
або наноносієм, завантаженими детектуючим агентом, терапевтичним агентом, лікарським
55 засобом, пептидом, ферментом, антитілом або його фрагментом, молекулою на основі ДНК,
вірусним вектором або цитотоксичним агентом, або однією або більше наночастинкою,
нанопроводом, нанотрубкою або квантовими точками.

14. Композиція, що містить один або більше ніж один антигензв'язуючий фрагмент антитіла за
будь-яким з пп. 1-7 і 10-13 і фармацевтично прийнятний носій, розчинник або ексципієнт.

60 15. *In vitro* спосіб детектування IGF1R, що включає:

а) контактування зразка тканини з одним або більше ніж одним виділеним або очищеним антигензв'язуючим фрагментом антитіла за будь-яким з пп. 1-7, зв'язаним з детектованим агентом, і

5 б) детектування детектуючого агента, зв'язаного з антигензв'язуючим фрагментом антитіла, зв'язаним з IGF1R, в зразку тканини.

16. *In vivo* спосіб детектування експресії IGF1R у суб'єкта, що включає:

а) введення одного або більше ніж одного виділеного або очищеного антигензв'язуючого фрагмента антитіла за будь-яким з пп. 1-7, зв'язаного з детектуючим агентом, суб'єкту; і

10 б) детектування детектуючого агента, зв'язаного з антигензв'язуючим фрагментом антитіла, зв'язаним з IGF1R.

17. Спосіб перенесення молекули вантажу через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ), що включає:

а) введення одного або більше ніж одного виділеного або очищеного антигензв'язуючого фрагмента антитіла за п. 1, зв'язаного з молекулою вантажу, суб'єкту,

15 де один або більше ніж один антигензв'язуючий фрагмент антитіла переносить молекулу вантажу через ГЕБ.

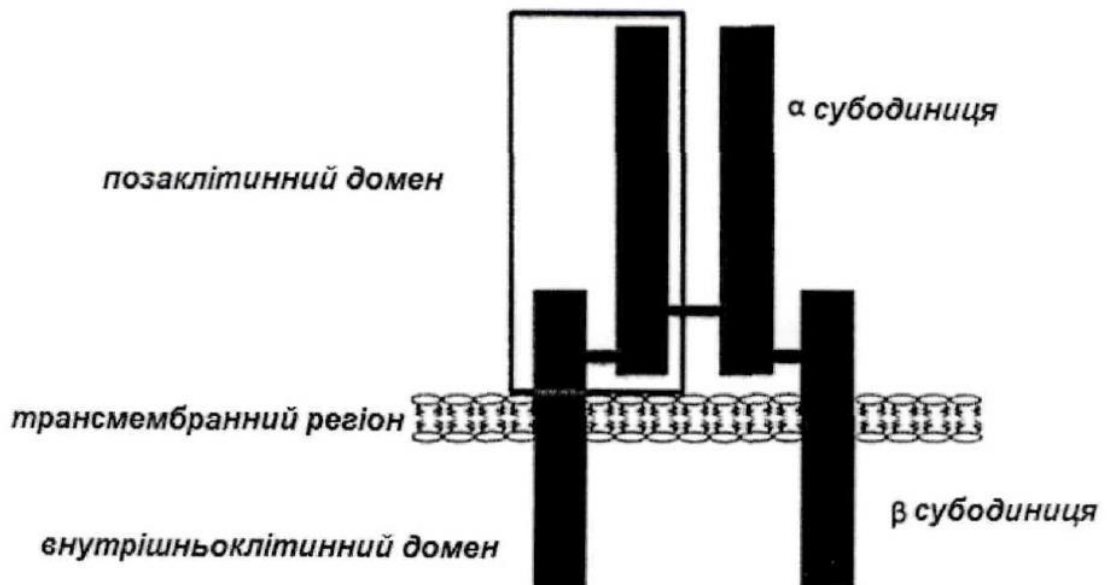
18. Спосіб за п. 17, де молекула вантажу має молекулярну масу в діапазоні від приблизно 1 до приблизно 200 кДа.

19. Спосіб за п. 17 або п. 18, де молекула вантажу є детектуючим агентом, терапевтичним агентом, лікарським засобом, пептидом, фактором росту, цитокіном, пасткою рецептора, хімічною сполукою, вуглеводним фрагментом, ферментом, антитілом або його фрагментом, молекулою на основі ДНК, вірусним вектором або цитотоксичним агентом, однією або кількома ліпосомами або наноносіями, завантаженими детектуючим агентом, терапевтичним агентом, лікарським засобом, пептидом, ферментом, антитілом або його фрагментом, молекулою на основі ДНК, вірусним вектором або цитотоксичним агентом, або однією або більше наночастинкою, нанопроводкою, нанотрубкою або квантовими точками.

20. Спосіб кількісного визначення кількості молекули вантажу, що доставляється через ГЕБ суб'єкта, де молекула вантажу зв'язана з одним або більше ніж одним виділеним або очищеним антигензв'язуючим фрагментом антитіла за п. 1, причому спосіб включає:

30 а) збір спинномозкової рідини (СМР) у суб'єкта, і

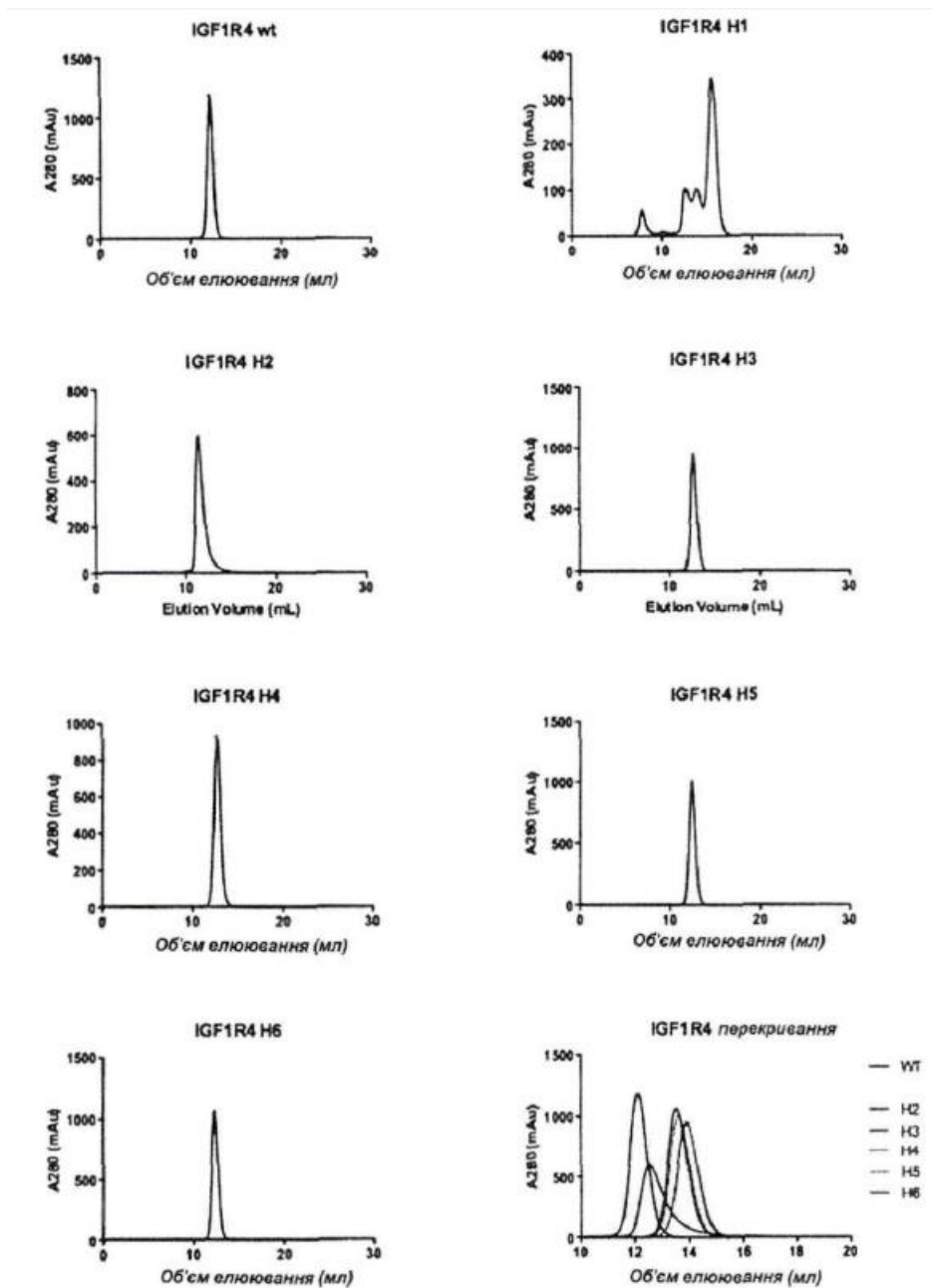
б) використання цільових методів протеоміки для визначення кількості молекули вантажу, зв'язаної з одним або більше ніж одним виділеним або очищеним антигензв'язуючим фрагментом антитіла, в спинномозковій рідині.



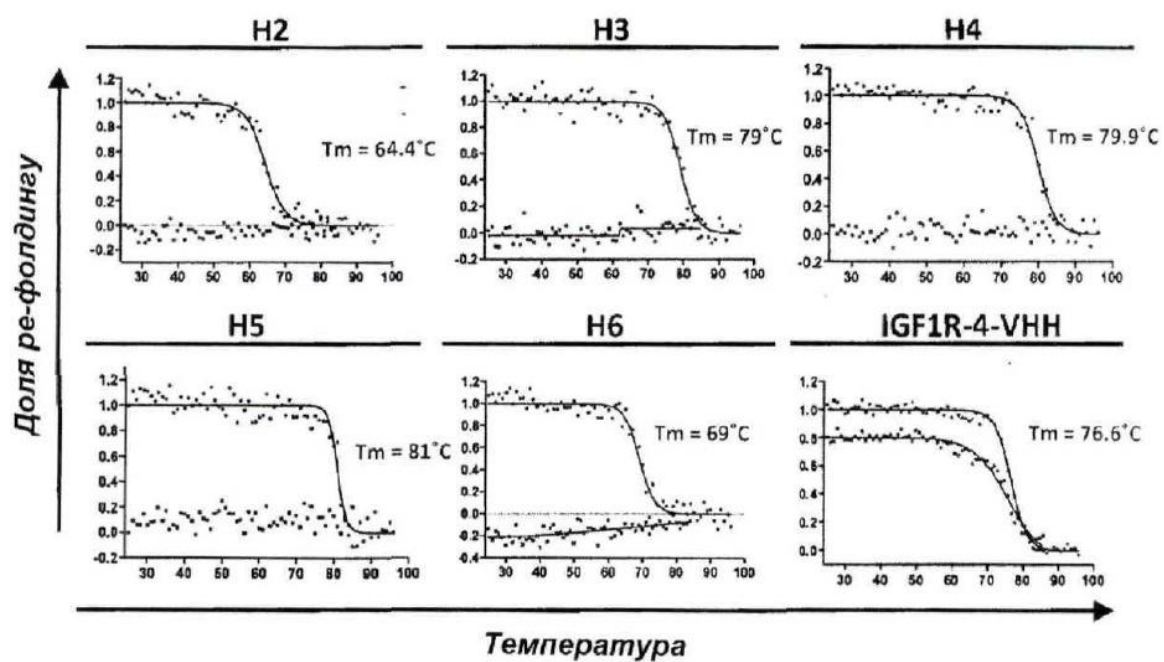
ФІГ. 1

MKSGSGGGSP	TSLWGLLFLS	AALSLWPTSG	EICGPGIDIR	NDYQQLKRLE	NCTVIEGYLH	60
ILLISKAEDY	RSYRFPKLTV	ITEYLLLFV	AGLESIGDLF	PNLTVIRGWK	LFYNYALVIF	120
EMTNLKDIGL	YNLRNITRGA	IRIEKNADLC	YLSTVDWSLI	LDAVSNNYIV	GNKPPKECGD	180
LCPGTMECKP	MCEKTTINNE	YNRCWTTNR	CQKMCPTCG	KRACTENNEC	CHPECLGSCS	240
APDNDTACVA	CRHYYYAGVC	VPACPPNTYR	FEGWRCVDRD	FCANILSAES	SDSEGFVIHD	300
GECMQECPSG	FIRNGSQSMY	CIPCEGPCPK	VCEEEKTKTK	IDSVTSAQML	QGCTIFKGNL	360
LINIRRGNNI	ASELENFMGL	IEVVTGYVKI	RHSHALVSL	FLKNLRLILG	EEQLEGNYSF	420
YVLNQNLQQ	LWDWDHRNLT	IKAGKMYFAF	NPKLCVSEIY	RMEEVTGKTG	RQSKGDINTR	480
NNGERASCES	DVLHFTSTTT	SKNRIITWH	RYPDPYRDL	ISFTVYYKEA	PFFKNVTEYDG	540
QDACGSNSWN	MVDVDLPPNK	DVEPGILLHG	LKPWTQYAVY	VKAVTLTMVE	NDBIRGAKSE	600
ILYIRTNASV	PSIPLDVLSA	SNSSSQLIVK	WNPPSLPNGN	LSYYIVRWQR	QPQDGYLYRH	660
NYCSKDKIPI	RKYADGTIDI	EEVTENPKTE	VCGGEGGPCC	ACPKTEAEKQ	AEKEEAERYK	720
VFENFLHNSI	FVPRPERkrr	DVMQVANTTM	SSRSRNTTAA	DTYNITDPEE	LETEYPPFFES	780
RVDNKERTVI	SNLRPFTLYR	IDIHSCNHEA	EKLGCASANF	VFARTMPAEG	ADDIPGPVTW	840
EPRPENSIFL	KWPEPENPNG	LILMYEIKYG	SQVEDQRECV	SRQEYRKYGG	AKLNRLNPGN	900
YTARIQATSL	SGNGSWTDPV	FFYVQAKTGY	ENFIHLIAL	PVAVLLIVGG	LVIMLYVFHR	960
KRNNSRLGNG	VLYASVNPEY	FSAADVYPD	EWEVAREKIT	MSRELGGQSF	GMVYEGVAKG	1020
VVKDEPETRV	AIKTVNEAAS	MRERIEFLNE	ASVMKEFNCH	HVVRLLGVS	QGQPTLVIME	1080
LMTRGDLKSY	LRSLRPENEN	NPVLAPPSLS	KMIQMAGEIA	DGMAYLNANK	FVHRDLAARN	1140
CMVAEDFTVK	IGDFGMTRDI	YETDYRKGG	KGLLPVRWMS	PESLKDGVFT	TYSVDVWSFGV	1200
VLWEIATLAE	QPYQGLSNEQ	VLRFVMEGGL	LDKPDNCPDM	LFELMRMCWQ	YNPKMRPSFL	1260
EIISSEKEEM	EPGFREVSFY	YSEENKLPEP	EELDLEPENM	ESVPLDPSAS	SSSLPLPDRH	1320
SGHKAENGP	PGVLVLRASF	DERQPYAHMN	GGRKNERALP	LPQSSTC		1367

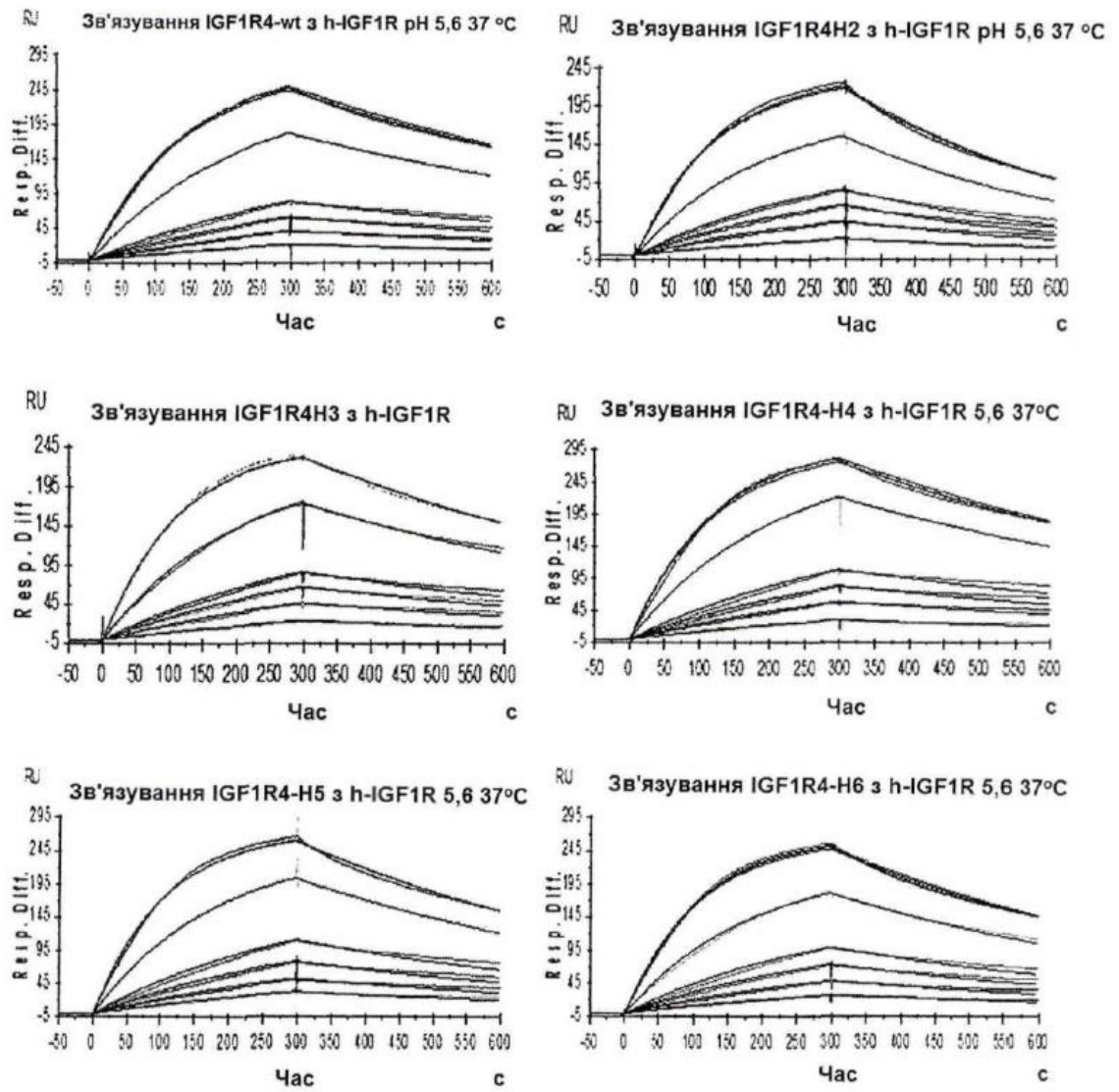
ΦΙΓ. 2



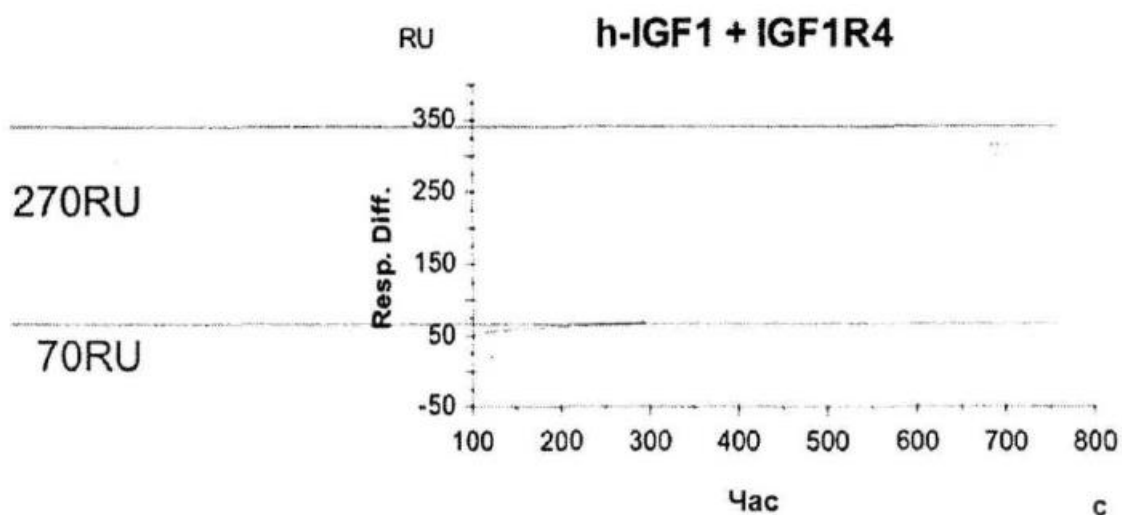
ФІГ. 3 А



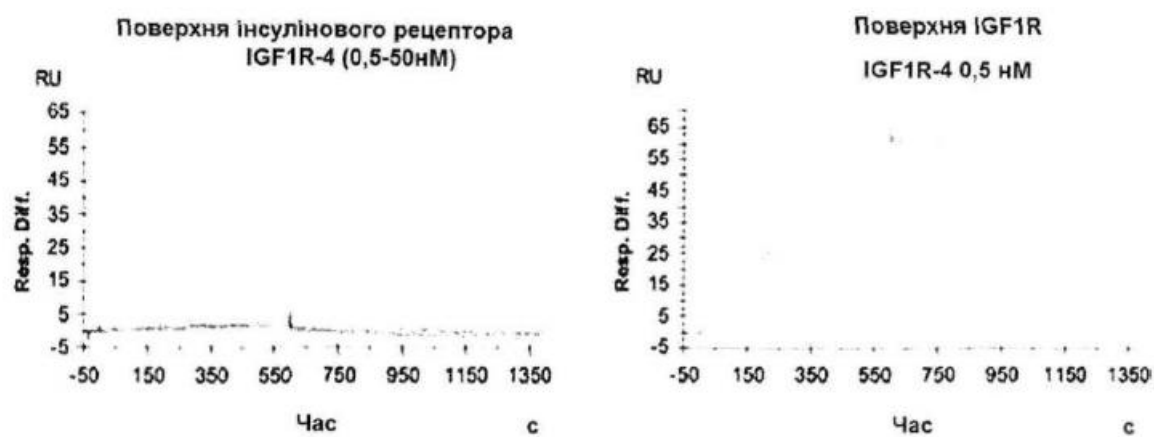
ФІГ. 3 В



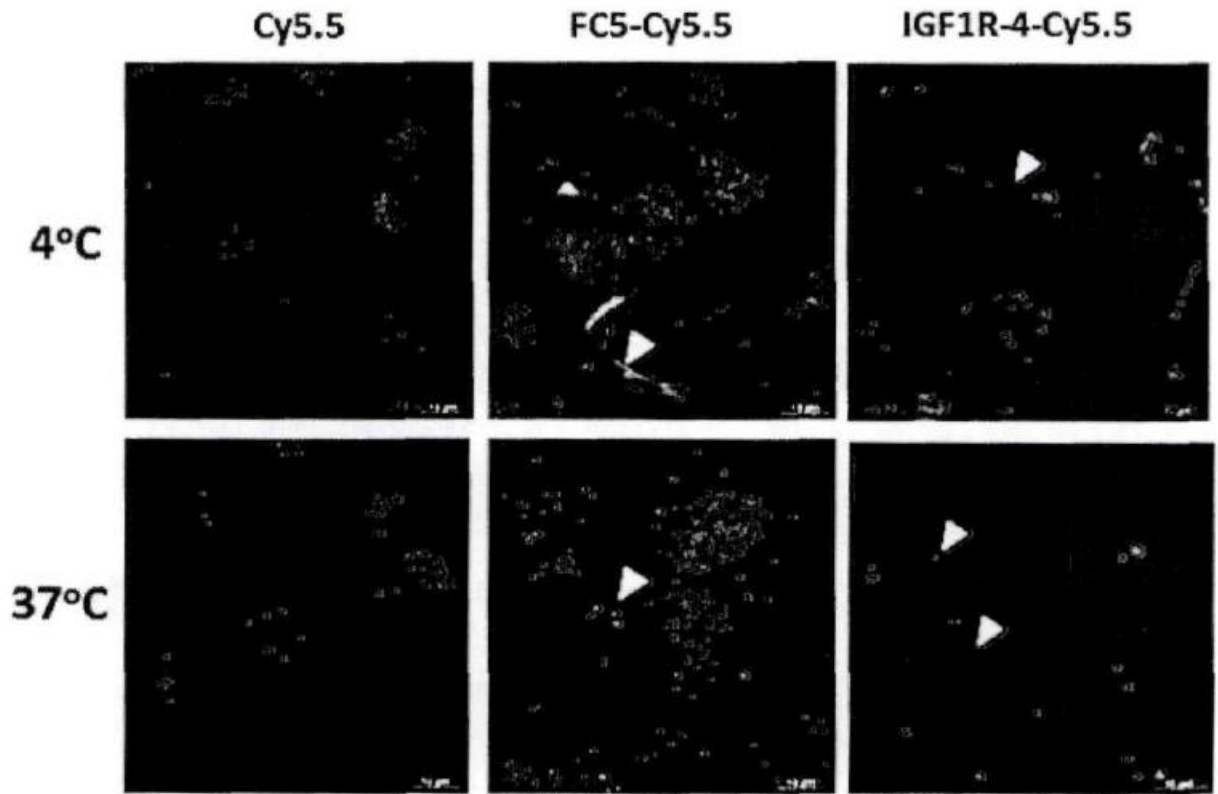
ФІГ. 3 С



ФІГ. 3 D



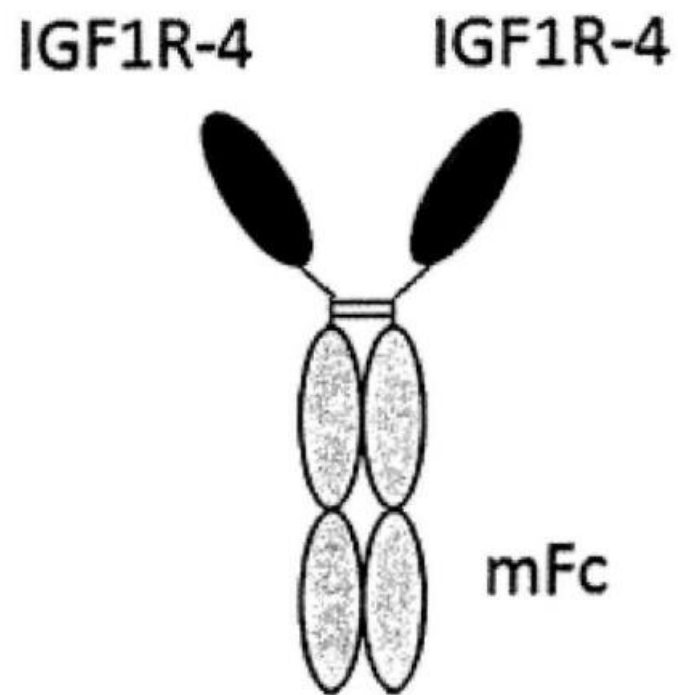
ФІГ. 3 E



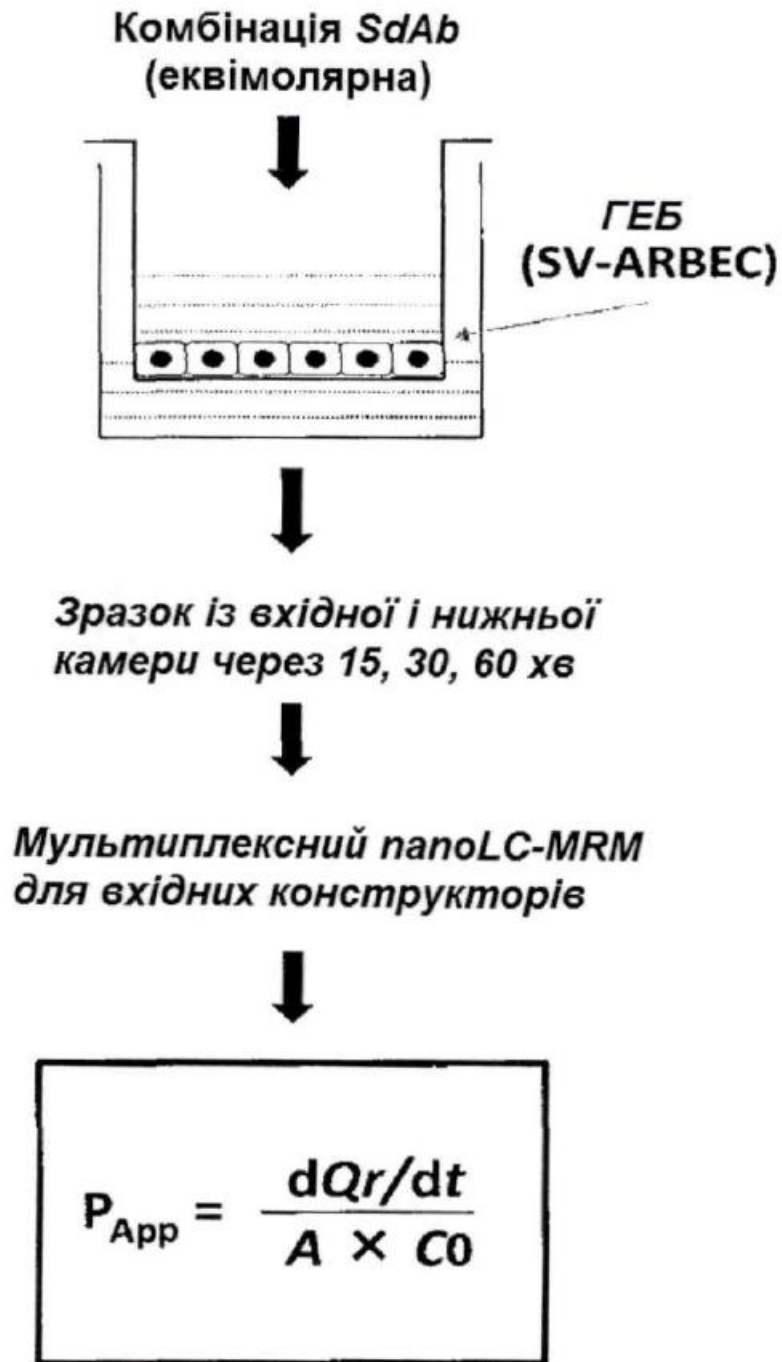
ФИГ. 4

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFVGHITWSRGTTTRVASS
 VKDRFTISRDSAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGTQVTVSSMTVD
 KKLEPSGPISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVTCTVVDVSEDDPDV
 QISWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISK
 IKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSGGSY
 FIYSKLNMKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK

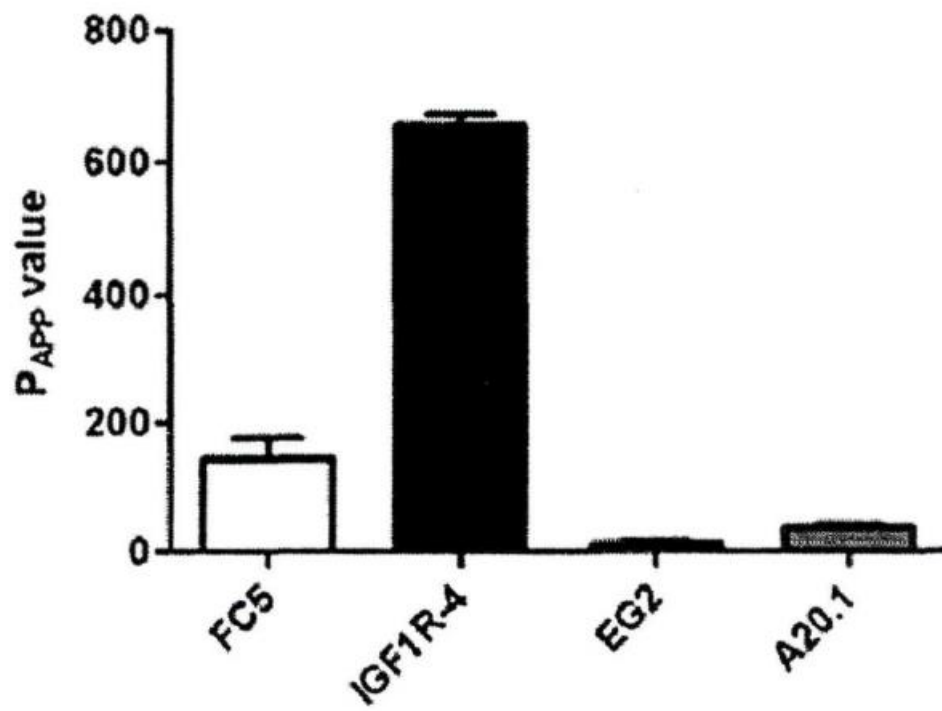
ФИГ. 5 A



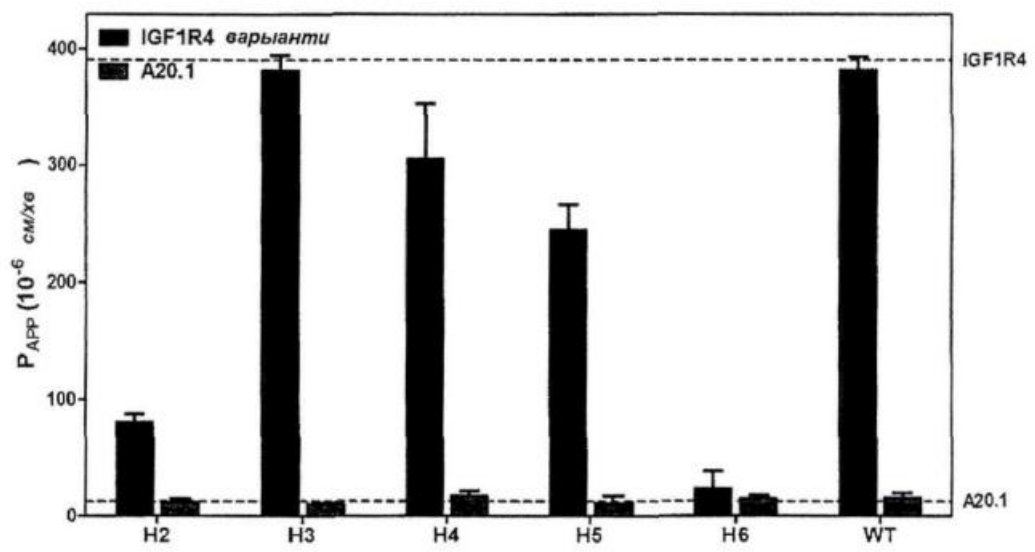
ΦΙΓ. 5 Β



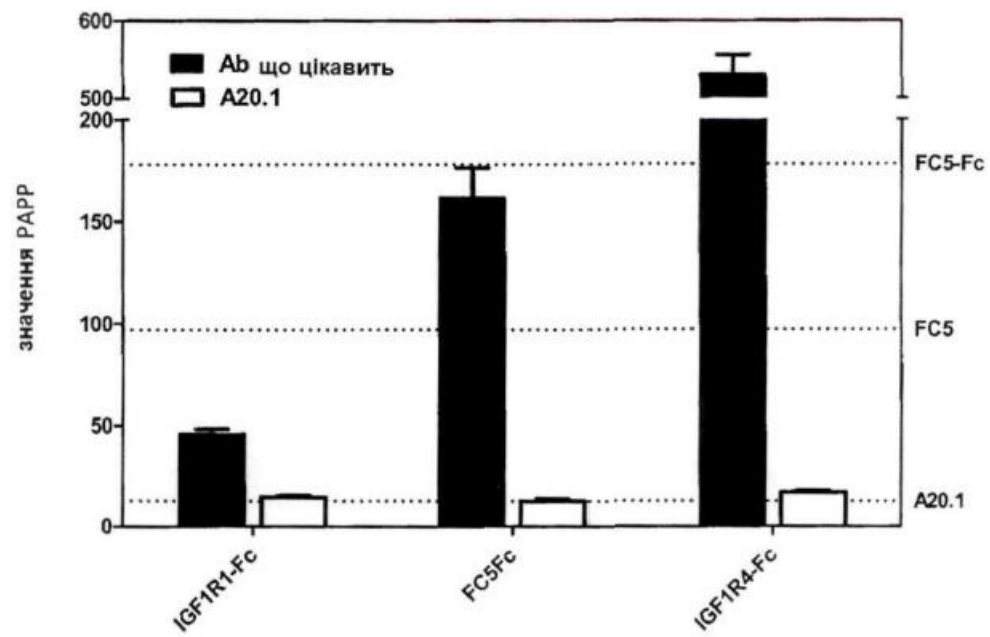
ФІГ. 6 А



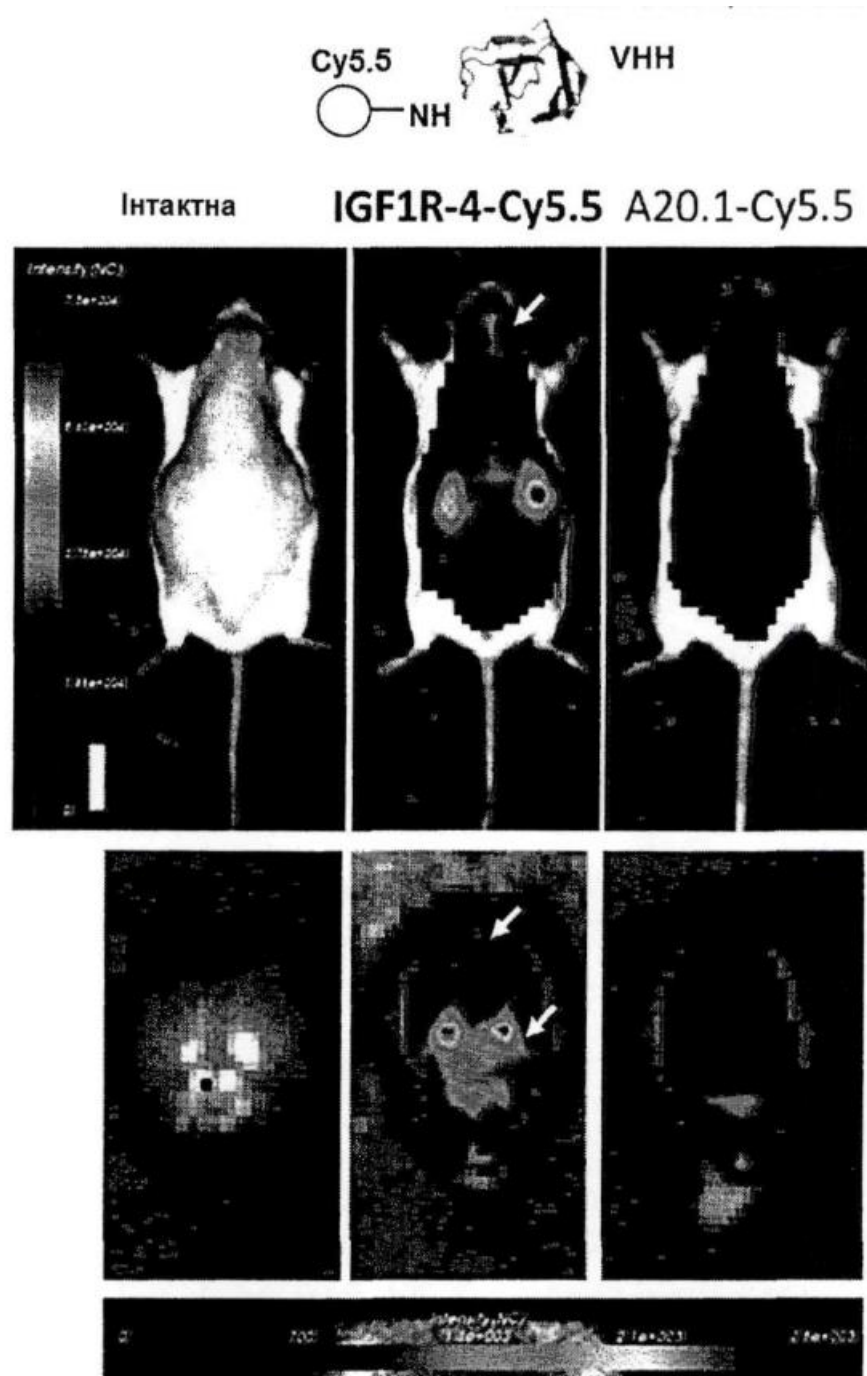
ФІГ. 6 В



ФІГ. 6 С

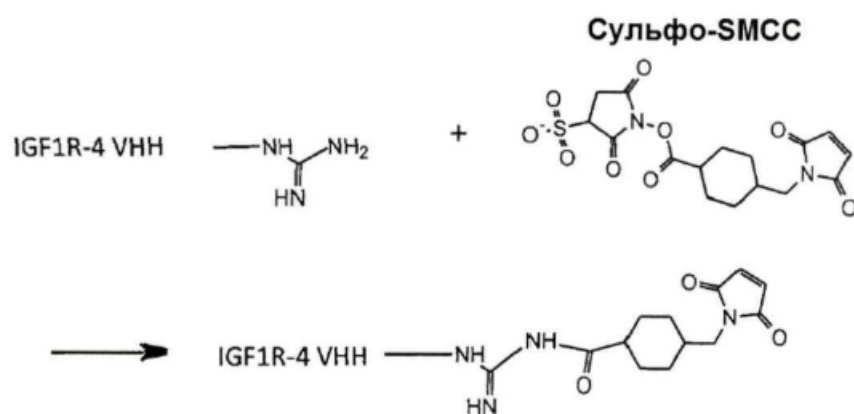


ФІГ. 6 D

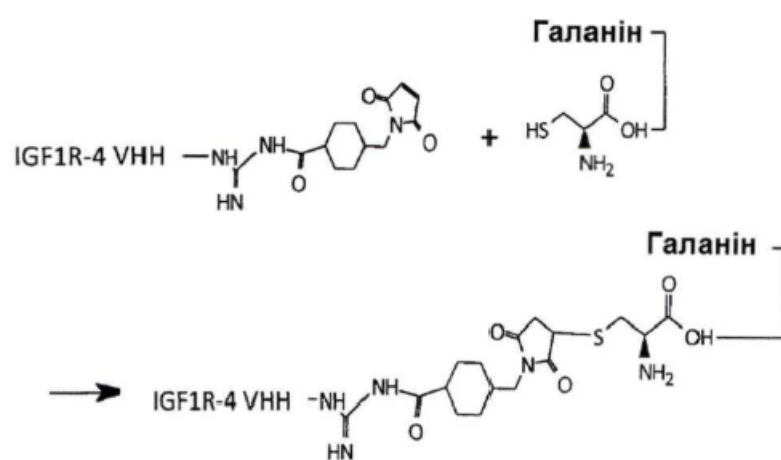


ФІГ. 7

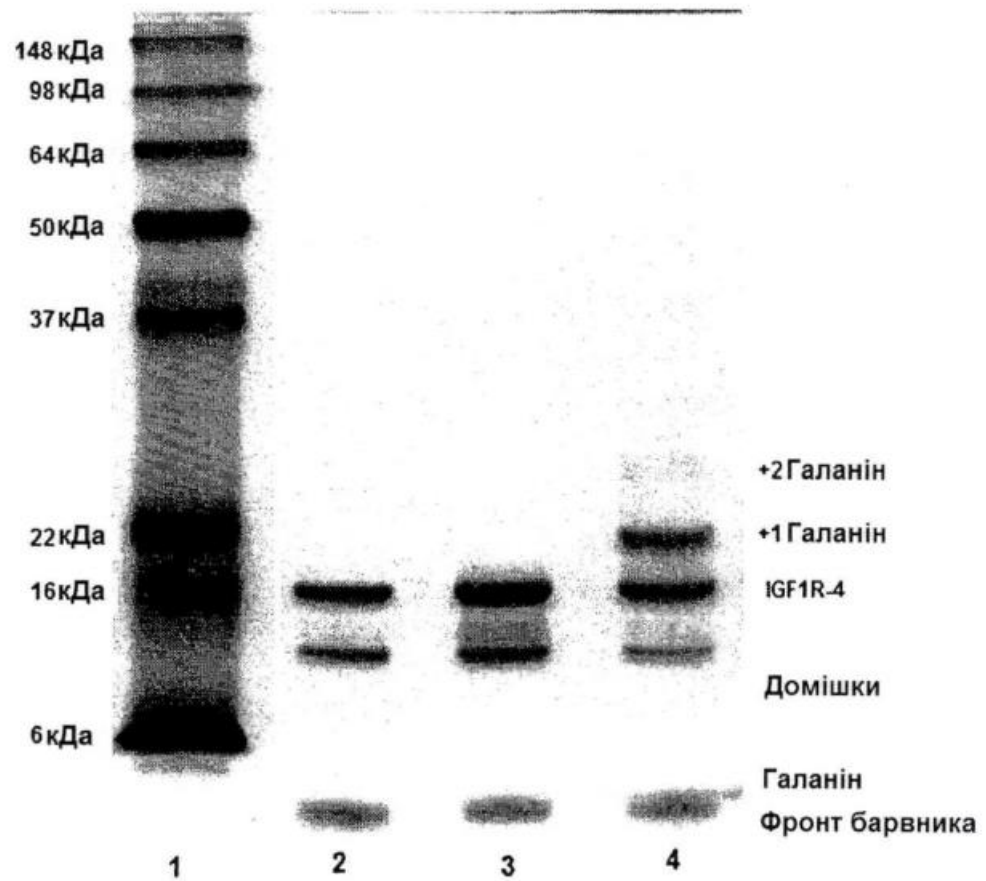
1)



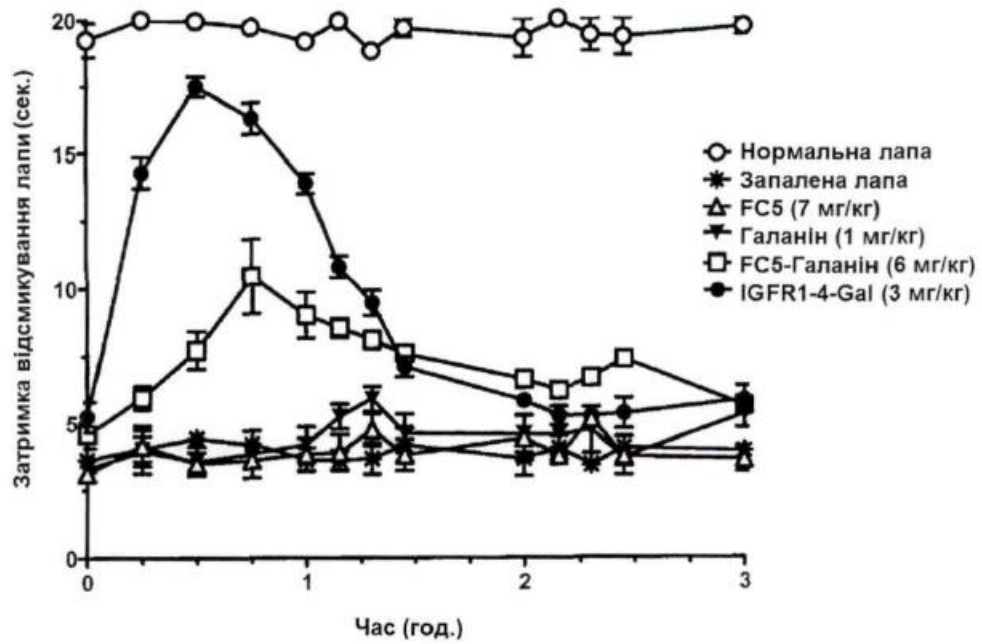
2)



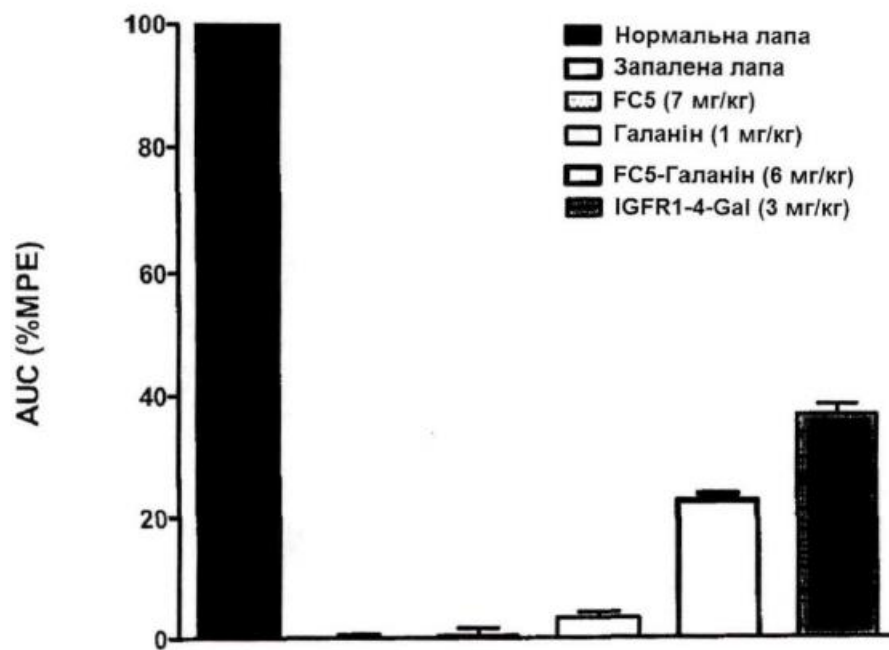
ФІГ. 8 А



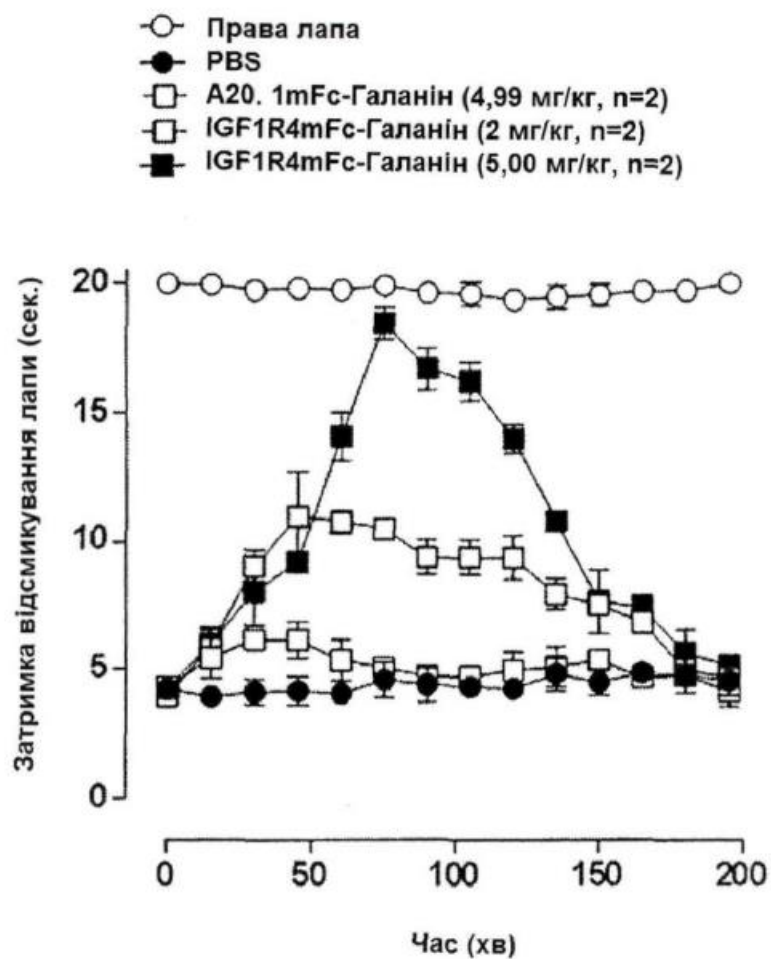
ФІГ. 8 В



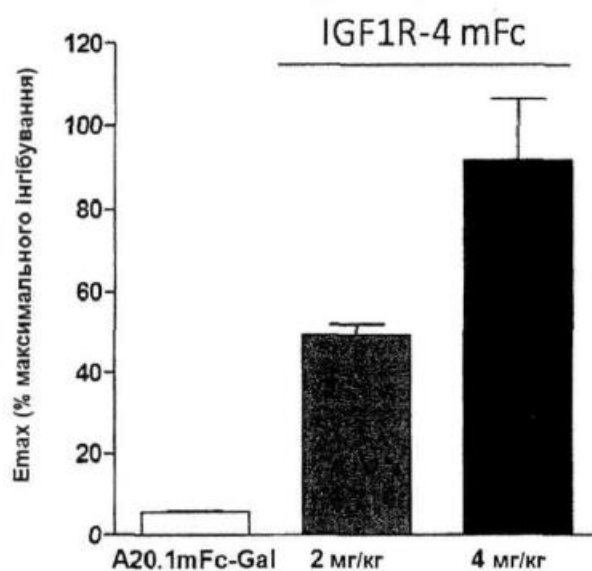
ФІГ. 9 А



ФІГ. 9 В



ФІГ. 9 С



ФІГ. 9 D

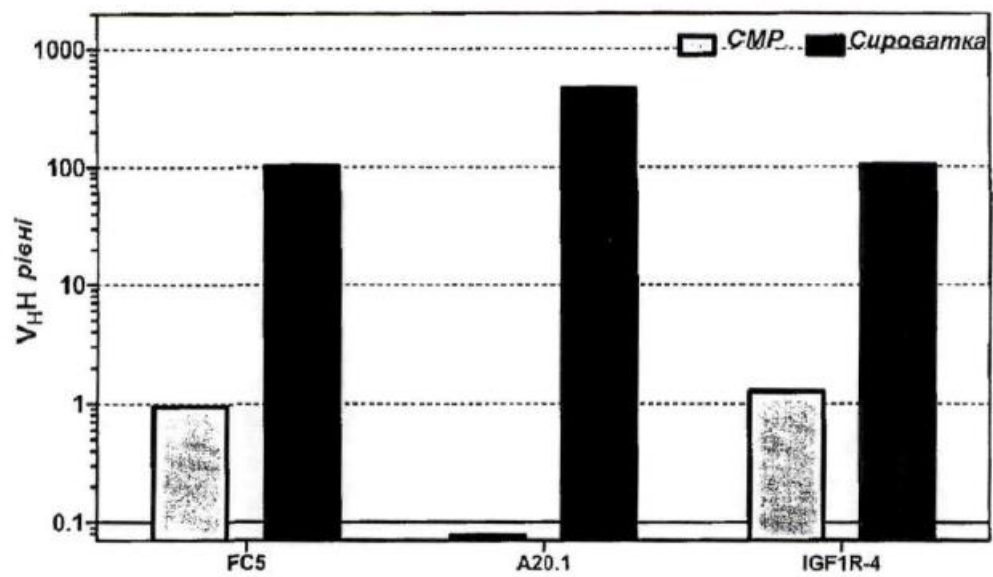
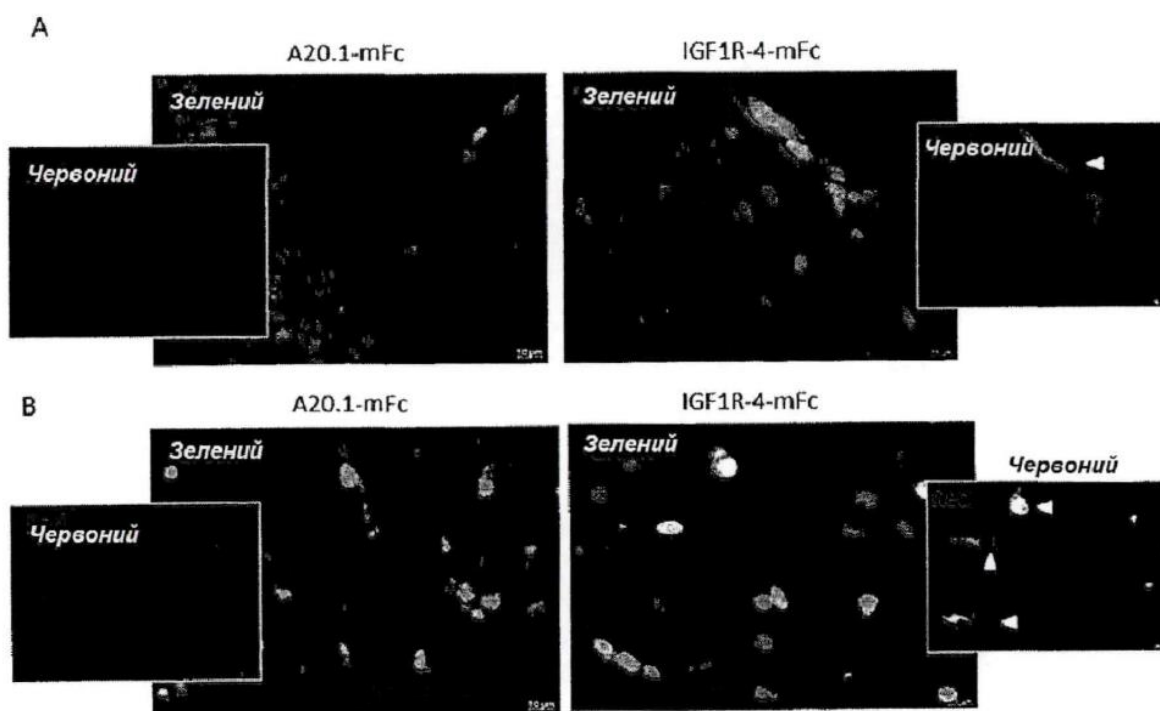
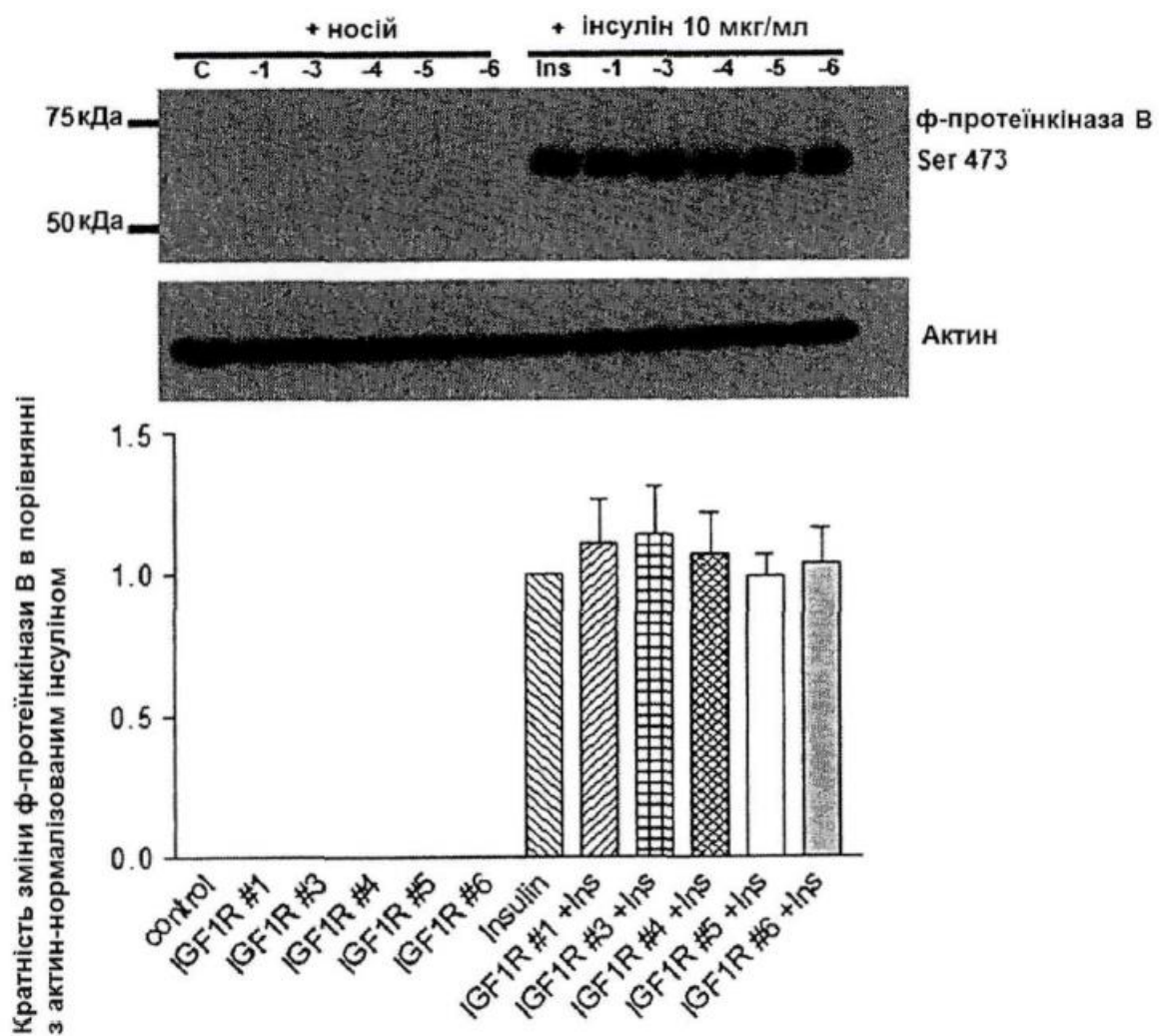


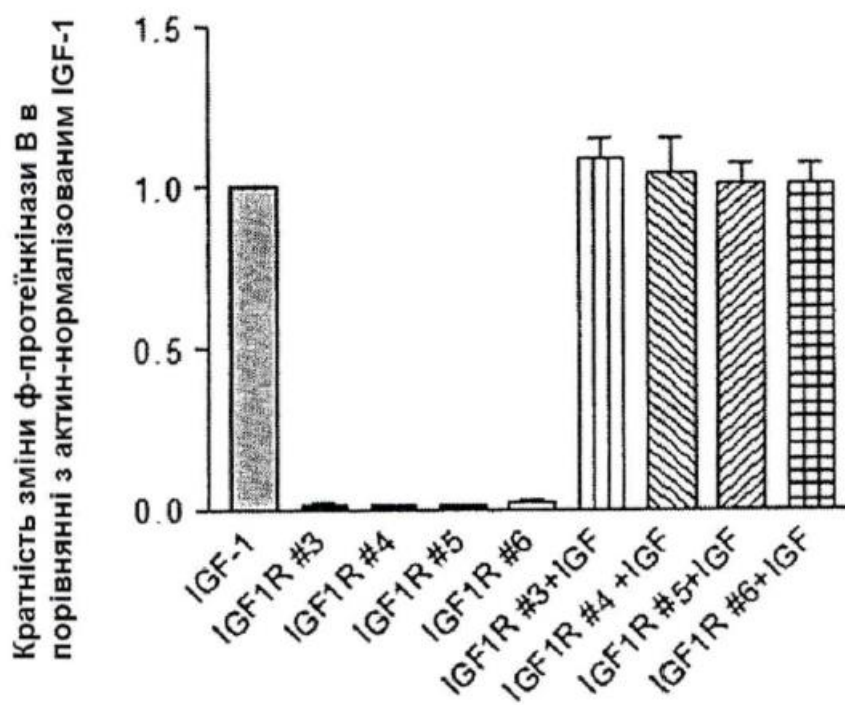
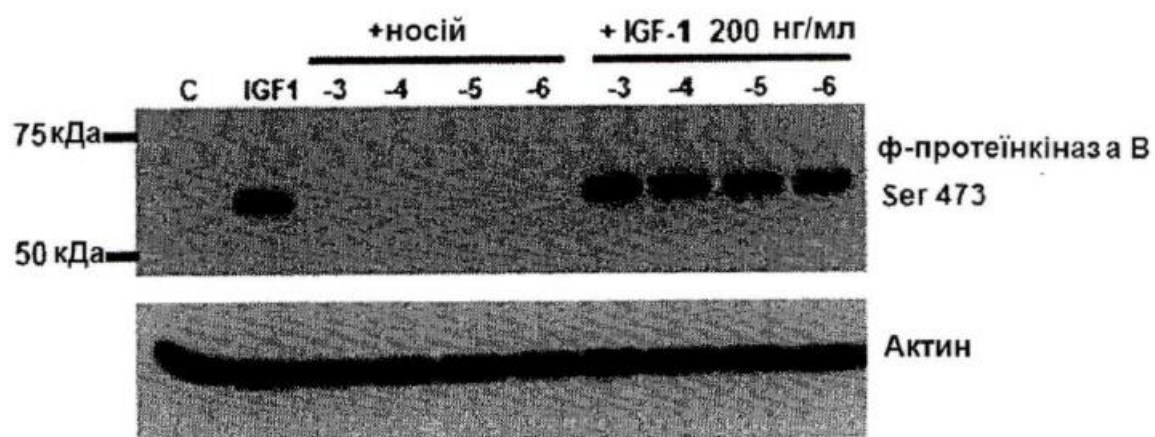
FIG. 10



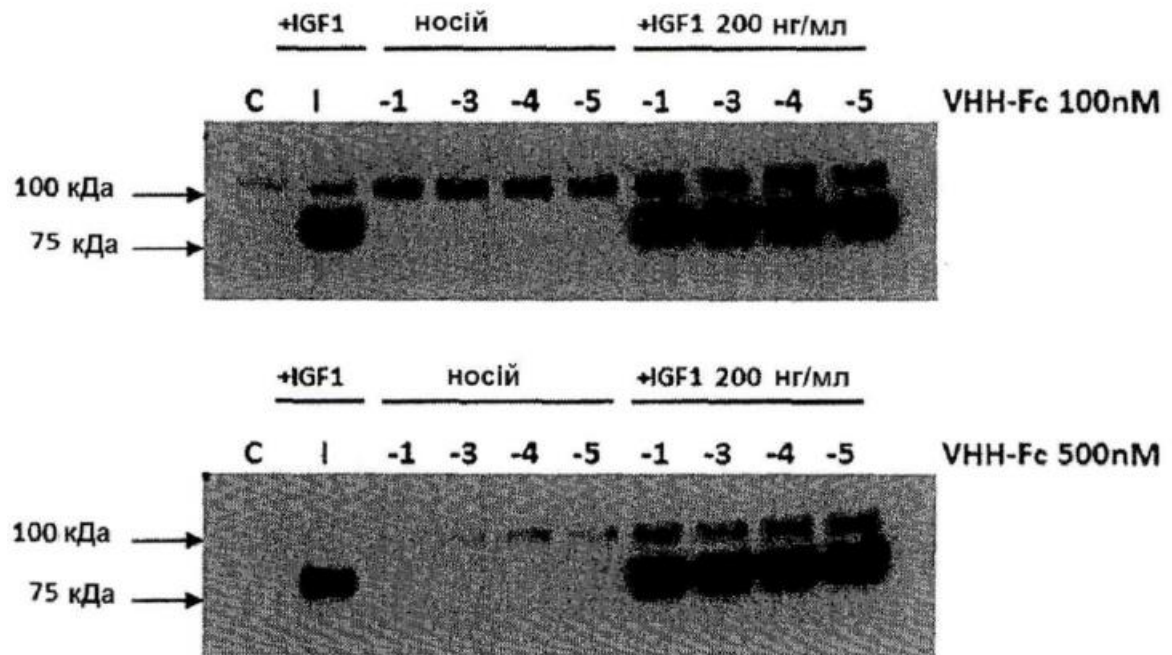
ΦΙΓ. 11



ФІГ. 12 А



ФІГ. 12 В



ФІГ. 12 С